ANALYSE DE COMPOSES PERFLUORES DANS L'EAU NATURELLE PAR EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EN LIGNE COUPLEE A DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE/ SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM

I-A-02

Claudine Chatellier et Francois Lestremau
Janvier 2013

Programme scientifique et technique
Année 2012

Document final

Avec l'approbation de ONEMA Office national de l'eau et des milieux aquatiques

et le soutien de Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2012.

Auteur (s) : Claudine Chatellier et François Lestremau

Claudine Chatellier
INERIS
claudine.chatellier@ineris.fr

Francois Lestremau
INERIS
francois.lestremau@ineris.fr

Vérification du document :

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

Les correspondants

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

Etablissement : François Lestremau, INERIS, francois.lestremau@ineris.fr

Référence du document : François LESTREMAU – Analyse de composés perfluorés dans l'eau naturelle par extraction sur phase solide en ligne couplée à de la chromatographie liquide/ spectrométrie de masse en tandem – Rapport AQUAREF 2012 – 55 p.

Droits d'usage :	*Accès libre*
Couverture géographique :	***International***
Niveau géographique :	***National***
Niveau de lecture :	***Professionnels, experts***
Nature de la ressource :	***Document***

1. GLOSSAIRE 13
2. CONTEXTE ET OBJECTIFS 13
3. MATERIEL ET METHODES 15
3.1 Composés cibles 15
3.2 Rappel des précautions analytiques pour la mesure des composés perfluorés 15
3.3 Contamination lors de l'analyse instrumentale (HPLC-MS) 15
3.4 Contamination par les bouchons à septum des flacons de passeur 16
3.5 Adsorption des PFCs sur les parois des récipients contenant les echantillons 16
4. INSTRUMENTATION ET CONDITIONS ANALYTIQUES 17
4.1 L'extraction sur phase solide en ligne (SPE-OL) 17
4.2 Système analytique et conditions expérimentales 17
5. RESULTATS 19
5.1 Etude de la contamination analytique 19
5.1.1 Détermination de la contamination analytique 19
5.1.2 Essais avec colonne de rétention 19
5.1.3 Test de matrices d'eau simples 20
5.1.4 Test de différentes colonnes SPE 20
5.2 Résultats des extractions par SPE-OL 21
5.2.1 Essais sur de l'eau filtrée (sans matières en suspension) 21
5.2.1.1 Gamme d'étalonnage dans de l'eau de source 21
5.2.1.2 Gamme d'étalonnage avec du méthanol dans de l'eau de source 21
5.3 Etude des effets de mémoire 22
5.4 Evaluation des performances de la méthode sur une eau naturelle 23
5.5 Essais sur de l'eau brute 24
6. CONCLUSION 27
7. REFERENCES 29
8. ANNEXES 31

Figure 1 Contamination analytique en PFOA par analyse en SPE-OL/LC/MS/MS - analyse avec un flacon vide 19
Figure 2 Dispositif de rétention des composés d'intérêt provenant du système analytique 19
Figure 3 Rendements obtenus avec différents taux de MeOH dans l'échantillon (n=3) 22
Figure 4 Exactitude des mesures pour un niveau de confiance de 95 % (k=2) pour le PFOA (LQ=11,9 ng/L). 23
Figure 5 Exactitude des mesures pour un niveau de confiance de 95 % (k=2) pour le PFOS (LQ=13,4 ng/L) 24
Figure 6 Schéma explicatif de la démarche d'extraction des composés perfluorés dans de l'eau brute 25
Figure 7. Rendements d'extraction dans l'eau de l'Oise brute pour des ajouts équivalents à la valeur de LQ, 20% et 80% de la gamme d'étalonnage (n=3) 25

Tableau 1 Liste des composés cibles 15
Tableau 2 : Liste des étalons internes 39
Tableau 3. Méthode chromatographique avec injection SPE et méthode de lavage par acétonitrile 47

Liste des annexes :

Annexe 1 : Structure des composés étudiés,

Annexe 2 : Conditions expérimentales utilisées pour l'analyse des composés perfluorés par SPE en ligne,

Annexe 3 : Système de pré concentration SPE en ligne

Annexe 4 : Méthode chromatographique par injection directe avec préconcentration SPE en ligne LC/MS/MS,

Annexe 5 : Gamme d'étalonnage avec et sans ajout de 20 % de MeOH.

Annexe 6 : Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de l'Oise.

ANALYSE DE COMPOSES PERFLUORES DANS L'EAU NATURELLE PAR EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EN LIGNE COUPLEE A DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE/ SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM

CLAUDINE CHATELLIER ET FRANÇOIS LESTREMAU

RESUME

L'analyse de composés perfluorés candidats à la révision de la DCE (PFOS et PFOA) par extraction par phase solide en ligne couplée à de la chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem a été évaluée.

Les composés alkyles perfluorés (PFCs : PerFluorinated organic Compounds) sont des substances chimiques d'origine exclusivement anthropique. Les PFCs ont des propriétés tensio-actives et sont utilisés pour de nombreuses applications très diverses (agents tensio-actifs, de détergents, d'émulsifiants, démouillants, de dispersants et de mousses extinctrices…).

Ils sont principalement introduits dans les eaux de surface via les effluents des stations d'épuration. Ils sont particulièrement persistants et de par leurs propriétés hydrophiles et lipophiles, ils peuvent se lier à de nombreuses protéines, entrainant un effet toxique.

La préoccupation liée à l'effet de ces substances dans les milieux aquatiques a d'ailleurs amené à considérer l'intégration de l'acide perfluoro octanoïque (PFOS) dans la liste des substances prioritaires de la DCE.

Pour la mesure dans les eaux, plusieurs méthodes sont possibles : la norme ISO 25101 :2009, relative à la mesure du PFOA et du PFOS dans l'eau potable, l'eau souterraine et les eaux de surface dans des échantillons non filtrés, ou les méthodes développées dans le cadre d'Aquaref pour les eaux, boues ou biotes. Bien qu'elles soient généralement efficaces, leur utilisation nécessite plusieurs étapes analytiques qui sont longues à mettre en œuvre. De plus, de nombreux matériaux de laboratoire étant composés de matériaux perfluorés, chacune de ces étapes est également susceptible d'apporter une contamination au cours du processus analytique.

Afin de limiter les étapes analytiques, une analyse par extraction sur phase solide, en ligne avec un chromatographe à phase liquide, couplée à un spectromètre de masse a été utilisée. Des contaminations en PFOA provenant du système analytique ont été constatées ainsi que des problèmes d'effets de mémoire pour le PFOS. Des lavages avec de l'acétonitrile de la colonne de préconcentration SPE ont permis de limiter ces problèmes.

L'utilisation de colonne de préconcentration SPE C_8 a permis de piéger les composés cibles. L'ajout de 20 % de méthanol dans les étalons a résolu les problèmes d'adsorption constatés généralement pour ces composés. Ainsi, des fonctions d'étalonnage avec des coefficients de corrélation >0,99 ont été obtenues pour le PFOA et le PFOS.

Des limites de quantifications de 12 ng/L pour le PFOA et 13 ng/L pour le PFOS ont été déterminées pour une eau de surface.

Des tests ont été effectués pour l'analyse de l'eau brute. L'échantillon a été filtré afin de séparer les fractions dissoute et particulaire. La fraction particulaire a été extraite par extraction liquide/solide avec du méthanol. Cet extrait et la fraction dissoute sont réunis pour analyse par SPE en ligne/LC/MS/MS. Des résultats acceptables ont été obtenus pour le PFOS.

Cependant, pour le PFOA, ces tests ont démontré le manque de robustesse du procédé utilisé.

Récapitulatif des caractéristiques de la méthode proposée et comparaison par rapport aux autres méthodes de référence

	Limites de quantification	**Volume échantillon**	**Mise en oeuvre**	**Temps opérateur**	**Possible limitation de la méthode**
Méthode proposée Eau filtrée	PFOS : 13 ng/L PFOA : 12 ng/L	1.5 mL	SPE/ligne	⌛	blanc PFOA LQ>PNEC
Méthode proposée Eau brute	PFOS : 13 ng/L PFOA : 12 ng/L	20 mL	Extraction ELL MES + SPE/ligne	⌛⌛	blanc + robustesse PFOA LQ>PNEC
ISO 25101 :2009	PFOS : 2 ng/L PFOA : 10 ng/L	1000 mL	SPE	⌛⌛	robustesse
MA-09	PFOS : 2 ng/L PFOA : 2 ng/L	1000 mL	Extraction ELL	⌛⌛⌛	

Mots clés (thématique et géographique) :
Perfluorés, SPE en ligne, eau de surface

ANALYSIS OF PERFLUORINATED COMPOUNDS IN NATURAL WATER BY ON LINE SOLID PHASE EXTRACTION COUPLED TO LIQUID CHROMATOGRAPHY/ TANDEM MASS SPECTROMETRY

CLAUDINE CHATELLIER ET FRANÇOIS LESTREMAU

ABSTRACTS

The analysis of perfluorinated compounds candidate to integrate the WFD (PFOA and PFOS) by on line solid phase extraction coupled to liquid chromatography/ tandem mass spectrometry has been evaluated.

Perfluorinated organic Compounds (PFCs) are chemical susbtances which originate exclusively from human activities. PFCs have tensioactives properties and are used in numerous various applications (tensioactives agents, extinguisher foam,…).

They are mainly occurring in surface water via waste water effluent. They are particularly persistent and from both their lipophilic and hydrophilic properties, they can bind to many proteins leading to toxic effect.

Concerns related to the effect produced by these substances in aquatic media resulted to consider PFOS for being included in the list of priority substances.

For their measurement in water, several methods are possible: Standard ISO 25101 : 2009 related to the measure of PFOA and PFOS in drinking water, ground water and surface water in raw water or methods developed in the Aquaref frame for water, sludges or biota. Although they are generally efficient, these methods require several analytical steps which can be tedious to carry out. Moreover, as many analytical equipments contain perfluorinated component, each of these steps can represent a possible contamination source.

To limit analytical steps, analysis using on line solid phase extraction with liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was performed. PFOA contamination originating from analytical system was noticed as well as carry over for PFOS. Acetonitrile wash of the preconcentration SPE column could limit the extend of these problems.

Use of precconcentration C_8 SPE column enabled to extract target compounds from samples. Standard were prepared with 20% of methanol to solve adsorption problems. Therefore, linearity with correlation coefficient >0.99 was obtained for both PFOA and PFOS.

Quantification limits of 12 ng/L for PFOA and 13 ng/L for PFOS were determined for surface water samples.

Tests were performed on raw water. The sample was preliminary filtered to separate both dissolved and particular fractions. The particular fraction was extracted by solid/liquid extraction using methanol. This extract and the dissolved fraction were reunited for analysis by on line SPE/LC/MS/MS analysis. Acceptable results were obtained for PFOS. However, for PFOA, these tests demonstrated the lack of robustness of the attempted approach.

Summary of the characteristics of the proposed method and comparison with reference methods

	Quantification limits	Sample volume	Technique	Operating time	Possible limitation of the method
Proposed method Filtered water	PFOS : 13 ng/L PFOA : 12 ng/L	1.5 mL	SPE on line	⌛	blank PFOA LQ>EQS
Proposed method Whole water	PFOS : 13 ng/L PFOA : 12 ng/L	20 mL	Extraction LLE suspended matter + SPE on ligne	⌛⌛	blank + robustness PFOA LQ>EQS
ISO 25101 :2009	PFOS : 2 ng/L PFOA : 10 ng/L	1000 mL	SPE	⌛⌛	robustness
MA-09	PFOS : 2 ng/L PFOA : 2 ng/L	1000 mL	Extraction LLE	⌛⌛⌛	

For operating time, the more +, the more time is required

Key words (thematic and geographical area) :

Perfluorinated compounds, SPE on line, surface water

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	François LESTREMAU	Marie-Pierre STRUB	Nicolas 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 de Pôle « Caractérisation de l'Environnement » Direction des Risques Chroniques
Visa			

1. GLOSSAIRE

LQ : Limite de quantification,

LC-MS-MS en tandem, : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

MeOH : Méthanol,

MES : Matières en suspension,

MTBE : Méthyl Tert-Butyl Ether,

NQE : Norme de qualité environnementale,

PEEK : Polyétheréthercétone,

PTFE : Polytétrafluoroéthylène,

PFC : Composés alkyles perfluorés ,

PFOA : Acide perfluoro octanoïque,

PFOS : Acide perfluoro octanesulfonique.

SPE : Extraction sur phase solide

SPE-OL : Extraction sur phase solide en ligne

2. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les composés alkyles perfluorés (PFCs : PerFluorinated organic Compounds) sont des substances chimiques d'origine exclusivement anthropique. Chimiquement, les PFCs sont constitués d'une chaîne carbonée (en C_4 à C_{10}) perfluorée hydrophobe, et d'un groupement fonctionnel hydrophile.

Les PFCs ont des propriétés tensio-actives et trouvent ainsi des applications très diverses. Ils sont largement répandus dans la fabrication de substances hydrofuges, oléofuges, anti-salissantes et imperméables aux graisses qui sont appliquées sur les tissus, les emballages, les tapis et les moquettes. Ils participent également à la formulation d'agents tensio-actifs, de détergents, d'émulsifiants, de démouillants, de dispersants et de mousses extinctrices.

Ils sont principalement émis dans les eaux de surface via les effluents des stations d'épuration recevant des eaux industrielles résultant de la fabrication ou de l'utilisation des produits (85 % des émissions), mais aussi domestiques en raison de la dégradation des biens de consommation qui en renferment.

Les propriétés physicochimiques particulières des composés perfluorés tiennent à la solidité des liaisons fluor-carbone (F-C) composant ces molécules, qui les rend résistants à l'hydrolyse acido-basique, à la photolyse, à la dégradation microbienne et à la métabolisation par les vertébrés. Les PFCs sont à la fois hydrophiles et lipophiles ce qui leur permet de se lier à de nombreuses protéines. Cette affinité PFCs-protéines est à la base d'effets toxicologiques : tumeur de la thyroïde et du foie, effets reprotoxiques, réduction du taux de cholestérol, modifications de la perméabilité des membranes cellulaires. Ils sont ainsi particulièrement persistants et bioaccumulés par les organismes aquatiques [1].

Bien que la production des PFCs ait commencé dès l'année 1945, ce n'est qu'au cours des années 1990 que la communauté scientifique s'est souciée de leur persistance, de leur accumulation dans les organismes aquatiques et de leur toxicité potentielle. Ces composés sont d'ailleurs reconnus comme PBT (Persistent, Bioaccumulateur et Toxique).

La préoccupation liée à l'effet de ces substances dans les milieux aquatiques a d'ailleurs amené à considérer l'intégration de l'acide perfluoro octanoïque (PFOS) dans la liste des substances prioritaires de la DCE [2].

En conséquence, des méthodes de caractérisation fiables et répondant aux exigences de la directive QA/QC [3] doivent être mises en œuvre afin de permettre la mesure des PFC dans les milieux environnementaux. Cependant, ce type d'analyse peut être délicat car des contaminations peuvent intervenir de par leur omniprésence dans le matériel analytique généralement employé.

Ils peuvent ainsi être présents dans les appareils chromatographiques (vannes, tuyaux et joints), ou dans le matériel utilisé pour la préparation d'échantillon : les septa étant généralement constitués de polymères perfluorés [1].

Pour la mesure dans les eaux, la norme ISO 25101 :2009 est relative à la mesure du PFOA et du PFOS dans l'eau potable, l'eau souterraine et les eaux de surface dans des échantillons non filtrés [4]. Cette méthode a été considérée comme ne présentant pas suffisamment de garantie en termes de robustesse en terme de performances obtenues, un avis négatif a été émis pour sa reprise en collection française [1].

Dans le cadre d'Aquaref, une méthode a été développée en 2008 pour l'analyse des composés perfluorés PFOA et PFOS dans les eaux [5]. Elle est applicable, dans un domaine de 2 à 120 ng/L, aux eaux douces de surface, aux eaux souterraines ainsi qu'aux eaux brutes (l'influence de la teneur en matières en suspensions n'a cependant pas été testée lors de l'élaboration de cette fiche). Cette méthode implique une extraction liquide/liquide à l'aide de Méthyl Tert-Butyl Ether (MTBE) suivie d'une analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Bien qu'elle soit efficace (méthode validée selon NF T90-210), sa mise en oeuvre nécessite plusieurs étapes de prétraitement chronophages. De plus, de nombreux équipements de laboratoire étant composés de matériaux perfluorés, chacune des ces étapes est également susceptible d'apporter une contamination au cours du processus analytique.

Afin de limiter les étapes analytiques, une analyse par extraction en phase solide en ligne peut être utilisée. Ainsi, le but de cette étude sera d'évaluer l'applicabilité de l'extraction par phase solide en ligne (SPE-OL) couplée à la chromatographie liquide/ spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS) pour l'analyse des composés perfluorés dans l'eau naturelle.

La DCE impose l'analyse des micropolluants organiques en considérant l'eau brute. Cela est d'autant plus justifié pour les composés perfluorés qui présentent un caractère amphiphile ce qui peut entrainer un partage entre la fraction particulaire et dissoute. L'analyse des 2 fractions est donc indispensable afin de déterminer la présence de ces composés dans l'eau brute. Ainsi des essais ont également porté sur la mise au point d'une stratégie analytique afin de pouvoir utiliser l'extraction par SPE en ligne en considérant l'eau brute.

Parmi les PFCs, le PFOA et le PFOS, substance considérée par la révision de la DCE, sont les plus couramment retrouvés dans les milieux environnementaux et sont ainsi considérés lors de cette étude.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1 COMPOSES CIBLES

Le PFOA et le PFOS ont été étudiés. Leurs caractéristiques sont détaillées dans le tableau ci-dessous.

	Formule	Acronyme	Cas N°	Code Sandre
Acide perfluoro octanesulfonique	$C_8HF_{17}O_3S$	PFOS	1763-23-1	6561
Acide perfluoro octanoïque	$C_8HF_{15}O_2$	PFOA	335-67-1	5347

Tableau 1 Liste des composés cibles

La structure moléculaire des composés cibles est représentée en annexe 1. La préparation des solutions étalons ainsi que les échantillons utilisés sont décrits en annexe 2.

3.2 RAPPEL DES PRECAUTIONS ANALYTIQUES POUR LA MESURE DES COMPOSES PERFLUORES

Les traitements de surface impliquant des composés perfluorés sont retrouvés dans de très nombreux équipements de laboratoire. Si leur présence permet généralement d'obtenir de meilleurs résultats analytiques car elle limite les phénomènes d'adsorption et les pertes des composés cibles, cela constitue une difficulté quand il s'agit de les doser.

Ainsi, dans la mesure du possible, l'utilisation de matériaux contenant des polymères fluorés est fortement déconseillée. Les équipements à base de polymères fluorés (ex. PTFE : polytétrafluoréthylène) peuvent ainsi conduire à une surestimation de la quantité réelle de PFOA et de PFOS présente dans l'échantillon.

La réalisation de blancs et leur suivi par carte de contrôle constituent un élément incontournable à la maitrise de leur analyse.

3.3 CONTAMINATION LORS DE L'ANALYSE INSTRUMENTALE (HPLC-MS)

L'appareil HPLC représente la principale source de contamination par les composés perfluorés lors de l'analyse des échantillons environnementaux. En effet, des vannes, des tuyaux et des joints en PTFE sont couramment utilisés dans ces appareils analytiques et représentent une source de contamination potentielle. Afin de remédier à ce problème, les tuyaux en PTFE peuvent être remplacés par des tuyaux en acier inoxydable ou en PEEK (polyétheréthercétone). Les vannes de dégazage et la vanne permettant le lavage de la tête de piston, habituellement fabriquées en PTFE, peuvent également être évitées en optant pour un dégazage des phases mobiles au préalable par ultrasons. D'autres alternatives techniques s'offrent à l'analyse des PFCs dans les échantillons environnementaux : par exemple l'utilisation de vannes en titane exemptes de toutes traces de PFCs.

Un effet mémoire peut également être constaté pour le PFOA et PFOS, surtout dans les blancs d'appareillage consécutifs à l'analyse d'échantillons très concentrés en PFCs. Dans de tels cas, un rinçage de l'ensemble des composants de la chaîne HPLC susceptibles d'accumuler des PFCs (boucle d'injection, vanne d'injection,..), ainsi que de la colonne chromatographique, par une phase mobile composée d'un mélange binaire isopropanol : acide formique (90 : 10, v/v) peut être appliqué [1].

Afin de limiter ce problème de contamination chromatographique, une méthode en mode isocratique peut également être employée ce qui permet de moyenner la contamination dans le bruit de fond et le signal généré par le système chromatographique. C'est cette option qui a été choisie pour cette étude.

Pour les analyses en gradient, une petite colonne chromatographique (ou de garde) peut être placée entre la pompe et l'injecteur. Les composés venant des pompes du système chromatographique vont être retenus sur la tête de cette colonne en début de gradient. Ainsi, l'élution des composés perfluorés piégés sur cette colonne sera décalée par rapport à celle des composés provenant de l'injection des échantillons. Pour le PFOA, par exemple, 2 pics chromatographiques seront observés, le premier correspondant au PFOA contenu dans les échantillons et un second, décalé, correspondant au PFOA provenant des éléments amont du système chromatographique.

3.4 CONTAMINATION PAR LES BOUCHONS A SEPTUM DES FLACONS DE PASSEUR

Les flacons utilisés lors de l'analyse par HPLC-MS peuvent représenter une source non négligeable de contamination par les PFCs. En effet, les bouchons "septum" utilisés pour assurer l'étanchéité des flacons contenant les échantillons à analyser sont souvent constituées de PTFE ou de Viton® (fluoropolymères). L'utilisation de septa en polyéthylène peut permettre de remédier à un éventuel problème de contamination [1].

Dans notre étude, pour les flacons d'échantillonnage, de par la nature de l'injection par SPE en ligne, une seule injection par flacon était effectuée ce qui limite le risque d'introduction de teflon® dans l'échantillon. Aucune contamination provenant des flacons n'a été observée dans ce cadre.

3.5 ADSORPTION DES PFCS SUR LES PAROIS DES RECIPIENTS CONTENANT LES ECHANTILLONS

Beaucoup d'études préconisent la conservation et le traitement des échantillons dans du polypropylène au détriment du verre jugé responsable d'adsorption [6-8]. Pourtant, d'après les conclusions d'un workshop organisé à Stockholm en 2009 sur les composés perfluorés [9], le polypropylène ne serait pas adapté à l'analyse des PFC et participerait à l'adsorption de ces composés même pour des périodes de stockage courtes. L'utilisation de polyéthylène haute densité HDPE ou de verre serait préférable. De plus, afin d'éviter un phénomène d'adsorption sur les parois, il est par ailleurs recommandé de passer les flacons d'échantillonnage aux ultrasons avant extraction, ou d'ajouter un peu de méthanol, et de rincer le récipient avec du méthanol après extraction ou une combinaison de ces procédures [4].

Dans tous les cas, il est indispensable de réaliser des blancs de laboratoire afin de surveiller la contamination par les composés perfluorés provenant des équipements analytiques et d'identifier les sources de pollution. Il est également conseillé, dans la mesure du possible, d'utiliser un matériel qui ne relargue pas de perfluorés.

4. INSTRUMENTATION ET CONDITIONS ANALYTIQUES

4.1 L'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EN LIGNE (SPE-OL)

L'abréviation SPE-OL sera utilisée dans le reste du document pour désigner l'extraction sur phase solide en ligne afin de la différencier de la SPE (extraction en phase solide « classique »). Le matériel de préconcentration associé est désigné par l'appellation colonne SPE pour le distinguer de la cartouche SPE utilisée en mode « classique ».

L'extraction en 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, reconcentrés avant d'être injectés dans l'appareil chromatographique. Cette dernière étape d'injection entraîne une redilution des substances captées par SPE. Ainsi, seulement une fraction de cet extrait (généralement quelques µL sur le 1 mL d'extrait obtenu) est injectée.

La SPE en ligne (SPE-OL) permet de connecter directement une colonne de préconcentration SPE à un chromatographe en phase liquide (LC). Les composés sont piégés sur une colonne contenant un adsorbant et élués directement par la phase mobile. L'avantage de cette technique, outre son caractère automatisable qui permet de réduire les nombreuses étapes de préparation d'échantillon effectuées en SPE « classique », repose sur le fait que 100% de l'extrait est analysé.

L'application de la SPE-OL est relativement récente pour les matrices environnementales comme l'a soulignée une revue dédiée à ce sujet [10].

L'analyse des composés perfluorés par SPE-OL a déjà été rapportée dans quelques études, pour des matrices comme les matrices biologiques (plasma notamment) ou dans les eaux [11-15].

4.2 SYSTEME ANALYTIQUE ET CONDITIONS EXPERIMENTALES

Le chargement de la colonne SPE est effectué avec une phase mobile contenant 0,1 % d'acide formique dans l'eau. Le pH acide (pH=2,6) permet de maintenir les composés perfluorés sous forme non-ionisés et d'augmenter les interactions (et la rétention) avec la colonne SPE.

Les conditions d'utilisation de la SPE-OL pour cette étude sont détaillées en annexe 3.

Le système d'extraction par SPE-OL est couplé avec une LC/MS/MS comprenant pour analyse des étalons et des échantillons :

- un chromatographe en phase liquide Alliance (Waters®),
- un spectromètre de masse triple quadrupole Acquity (Waters®).

La méthode chromatographique est en mode isocratique (70/30 MeOH/H_2O à 20 mM/L acétate d'ammonium).

Le PFOS est élué sous la forme de 2 pics. Le PFOS produit commercialement et vendu sous forme d'étalon est majoritairement composé d'une forme linéaire. Cependant, les formes ramifiées peuvent également être présentes produisant un élargissement du pic chromatographique. L'élution du PFOS sous forme de 2 pics a également été constatée par d'autres études consacrées à l'analyse de ce composé par SPE en ligne [13, 15].

Les conditions analytiques sont détaillées en annexe 4.

5. RESULTATS

5.1 ETUDE DE LA CONTAMINATION ANALYTIQUE

5.1.1 DETERMINATION DE LA CONTAMINATION ANALYTIQUE

L'utilisation du mode isocratique permet de moyenner la contamination provenant du système chromatographique [5]. Cependant, des contaminations supplémentaires peuvent également provenir du système de SPE-OL et se produire lors du chargement de la colonne de préconcentration SPE.

Ainsi, des tests sans échantillon, avec un flacon vide, ont été effectués afin de déterminer la contamination provenant du système analytique.

Une contamination en PFOA est constatée. La contamination est constante après 3 injections successives. Aucune contamination en PFOS n'est observée.

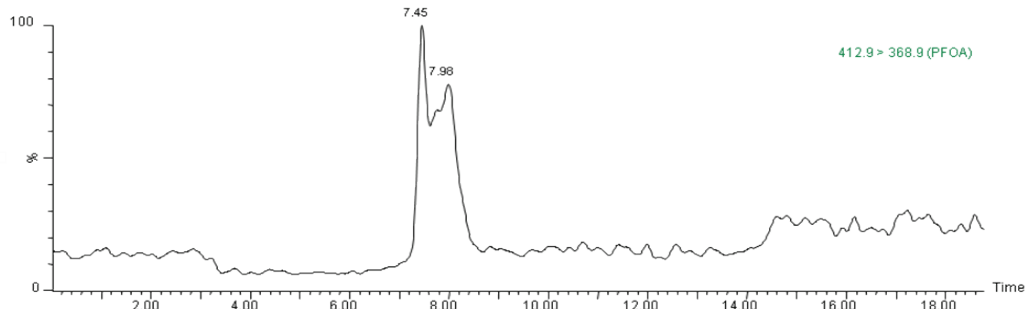


Figure 1 Contamination analytique en PFOA par analyse en SPE-OL/LC/MS/MS - analyse avec un flacon vide

5.1.2 ESSAIS AVEC COLONNE DE RETENTION

Afin de retarder la contamination de la colonne SPE provenant du système analytique et ainsi la différencier des composés perfluorés provenant de l'échantillon, des essais ont été effectués en plaçant un dispositif de rétention entre la pompe analytique et la colonne SPE (figure 2).

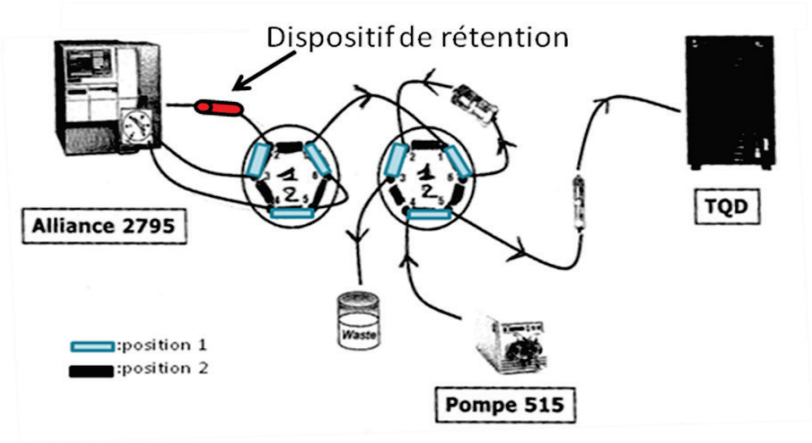


Figure 2 Dispositif de rétention des composés d'intérêt provenant du système analytique

Le chargement étant effectué avec une phase mobile composée exclusivement de 0,1 % d'acide formique dans l'eau, les composés perfluorés venant du système analytique devraient être fixés sur ce dispositif puis élués avec un certain délai par rapport à ceux de l'échantillon fixés sur la colonne SPE.

Les premiers essais ont été menés avec une colonne analytique fournie par Waters® sous l'appellation PFC kit. Cette référence correspond à une petite colonne analytique de 5 cm de long. Si les caractéristiques ne sont pas précisées, il peut être supposé que cette colonne est probablement constituée de particules hydrophobes de larges tailles (> 5 µm) de façon à ne pas générer trop de pression.

Dans notre système et configuration, cette colonne génère cependant trop de pression. En effet, cette colonne est prévue pour retarder la contamination pour le programme analytique seulement. Ainsi, elle est prévue pour un débit identique à celui utilisé lors de la phase d'élution de la phase mobile de la colonne SPE montée en série avec la colonne analytique, soit 0,3 mL/min.

Or, le chargement de la colonne SPE est effectué avec un débit de phase mobile égal à 2 mL/min. La colonne plaçe donc le système en surpression ce qui empêche le fonctionnement de celui-ci.

Afin de minimiser la pression additionnelle, des colonnes de garde ont ensuite été essayées. Ainsi 2 colonnes, une avec une phase stationnaire en phényl hexyl (4 x 3 mm) et une avec une phase stationnaire C_{18} de dimension (4 *x 20 mm) ont été testées.

Cependant, l'utilisation de ces 2 colonnes n'a pas permis de produire un décalage des temps de rétention du PFOA qui aurait permis de différencier les composés perfluorés provenant du système analytique de ceux de l'échantillon.

Dans les différents articles consacrés à l'analyse des perfluorés par SPE-OL, un seul article mentionne la présence de problème de contamination provenant du système analytique [12]. La solution adoptée, similaires à celles de [12], a été d'inclure la contamination du PFOA, constant dans une même séquence analytique, dans la gamme d'étalonnage [12].

5.1.3 TEST DE MATRICES D'EAU SIMPLES

La préparation des étalons doit, de préférence, être effectuée dans une matrice vierge de composés d'intérêt. Ainsi, 2 matrices, l'eau d'Evian® et l'eau MilliQ ont été testées.

L'analyse avec de l'eau d'Evian® ne présente pas de contamination supérieure à celle observée pour le matériel analytique.

Par contre, l'utilisation de l'eau MilliQ présente un taux supérieur à celui observé avec l'Eau d'Evian® ce qui démontre que cette matrice peut contenir des composés perfluorés. Cette expérience indique qu'il faut ainsi être particulièrement vigilant quant au choix de la nature de l'eau utilisée pour la préparation d'étalons.

Dans cette optique, une eau naturelle embouteillée dans du verre apparait comme une matrice appropriée et a été utilisée pour la suite de cette étude.

5.1.4 TEST DE DIFFERENTES COLONNES SPE

Deux différentes colonnes SPE ont été testées : une avec un adsorbant en C_8 et une colonne avec une phase polymérique (Upti-Trap™ Poly-clean™). Des niveaux de contamination plus importants sont constatés avec la phase polymérique que pour celle avec une phase stationnaire C_8.

5.2 RESULTATS DES EXTRACTIONS PAR SPE-OL

5.2.1 ESSAIS SUR DE L'EAU FILTREE (SANS MATIERES EN SUSPENSION)

5.2.1.1 GAMME D'ETALONNAGE DANS DE L'EAU DE SOURCE

Des gammes d'étalonnage allant de 2 à 250 ng/L préparées dans de l'eau d'Evian® ont été évaluées.

Pour les points les plus bas (2 et 5 ng/L), la contamination provenant du système analytique empêche une différentiation correcte du signal provenant de l'échantillon. La limite de quantification présupposée a été évaluée aux alentours de 10 ng/L et la limite supérieure de linéarité à 250 ng/L (annexe 5).

La gamme présente cependant des points qui s'écartent de la zone de linéarité où le r^2>0.99. Cette gamme a été préparée dans l'eau dans des flacons en verre. Ces flacons peuvent engendrer des problèmes d'adsorption des composés perfluorés. Ainsi, certains points de la gamme ont peut être subi ce phénomène d'adsorption (possible non homogénéité de la surface en verre des flacons utilisés).

Les 2 colonnes SPE testées ont permis d'obtenir des résultats similaires en termes de gamme de linéarité. Cependant, la colonne Upti-Trap™ Poly-clean™ présentant une réponse en PFOA plus importante, susceptible de provenir d'une contamination, la colonne C_8 a été choisie pour la suite de l'étude.

5.2.1.2 GAMME D'ETALONNAGE AVEC DU METHANOL DANS DE L'EAU DE SOURCE

L'ajout de méthanol dans les étalons ou les échantillons peut produire plusieurs avantages :

- Augmenter la stabilité des molécules,
- Réduire les phénomènes d'adsorption sur les parois,
- Augmenter la robustesse de la méthode.

L'ajout de méthanol à l'étalon ou à l'échantillon peut cependant induire une affinité réduite des composés lors de la pré-concentration par SPE. Ce type de stratégie ne peut s'appliquer qu'à certains types de polluants, les plus hydrophobes.

Du fait de la nature hydrophile et hydrophobe des composés perfluorés, leurs log K_{ow} ne peuvent pas être correctement estimés. Cependant, les substances suivies dans cette étude (PFOA et PFOS) sont retenues assez fortement par la colonne chromatographique et ne sont élués qu'avec un mélange comprenant 70 % de méthanol en mode isocratique. Si l'analyse chromatographique était effectuée avec un taux de méthanol de 20 %, les composés resteraient fixés en tête de colonne et ne migreraient que pour des volumes d'élution assez conséquents.

Il peut être conclu que le PFOA et le PFOS sont suffisamment fortement retenus sur les phases adsorbantes hydrophobes de type C_{18} ou C_8 pour que l'ajout de petits volumes de MeOH aux échantillons (de façon à ne pas dépasser 20 % en volume) n' influence pas la quantité de molécules perfluorées fixée sur la colonne SPE.

Des étalons ont été respectivement préparés avec 10 et 20 % de méthanol dans de l'eau d'Evian®. Les tests initiaux ont démontré que des rendements comparables étaient obtenus avec ces 2 pourcentages de MeOH comparés à des analyses avec des échantillons préparés exclusivement dans l'eau d'Evian®. De plus, l'ajout de méthanol semble réduire la dispersion des résultats sur 3 replicats (figure 3).

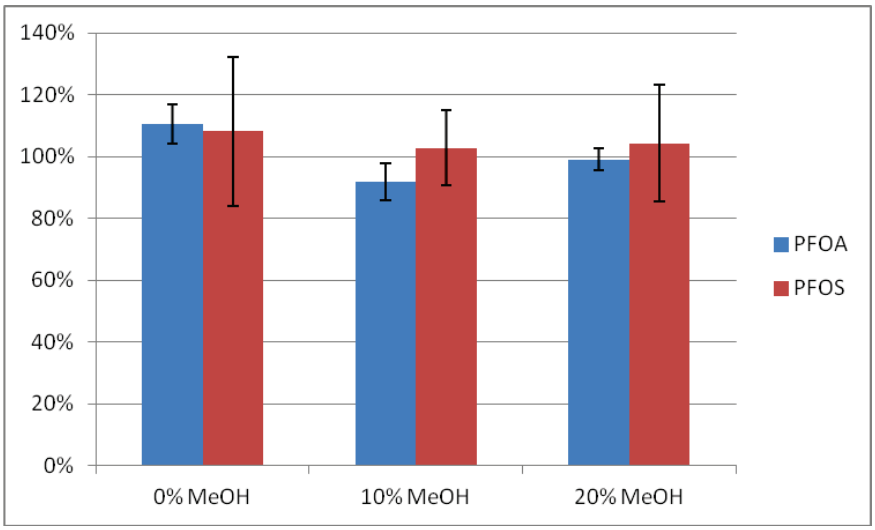


Figure 3 Rendements obtenus avec différents taux de MeOH dans l'échantillon (n=3)

Des étalonnages ont été ainsi effectués avec des étalons contenant 20% de MeOH. Chaque séquence est systématiquement précédée de l'injection de 3 blancs d'Evian® afin de purger le système du PFOA résiduel. Des fonctions d'étalonnage présentant des coefficients de corrélation (r^2) > 0.99, supérieurs à ceux obtenus avec des étalons dans l'eau seule ont été obtenus (annexe 5) ce qui démontre l'avantage de rajouter 20% de méthanol dans les étalons et échantillons

5.3 ETUDE DES EFFETS DE MEMOIRE

La SPE-OL implique un processus de piégeage mais également d'élution des composés d'intérêt. Si les composés ne sont pas suffisamment (complètement) élués, des effets de mémoire peuvent survenir ce qui se répercutera sur l'analyse suivante en entrainant des surestimations.

Afin de déterminer les éventuels effets de mémoire, des injections d'eau d'Evian® ont été effectués après l'injection du point d'étalonnage le plus haut.

Pour ces injections, du PFOA a été retrouvé à des niveaux de concentration correspondant au taux de contamination du système analytique. L'étalon interne correspondant au PFOA ($^{13}C_4$-PFOA) n'a pas été retrouvé ce qui démontre qu'aucun effet de mémoire ne se produit pour cette molécule.

Pour le PFOS, des taux significativement supérieurs au bruit de fond sont retrouvés pour ces injections d'eau d'Evian®. Le même constat est observé pour l'étalon interne correspondant ($^{13}C_4$-PFOS). Avec une colonne SPE en C_8, cette aire représentait à peu près 1/5 de l'aire de l'étalon de l'injection précédente.

L'effet de mémoire étant supposé provenir de résidus de PFOS restant fixés sur la colonne SPE, le lavage de la colonne SPE a été optimisé.

Une publication [14] mentionne, dans le cadre de l'analyse d'échantillons biologiques, un lavage de la colonne SPE avec de l'eau contenant 0.1 % d'hydroxyde d'ammonium. Avec cette solution, un pH basique est obtenu (pH=10,6) : ceci implique que les groupements acides des composés perfluorés sont entièrement sous forme ionisée et donc présentent une affinité réduite pour l'adsorbant. Cependant, l'utilisation d'un tel pH n'est pas adaptée avec l'utilisation de colonne SPE de type C_8. En effet, une réaction d'hydrolyse de la chaine carbonée se produit pour former des groupements silanols. L'altération de l'intégrité de la phase adsorbante pourrait entrainer une perte d'efficacité de la colonne SPE et un manque de robustesse de la méthode.

Une autre méthode a donc été employée. A la fin de la méthode chromatographique, la colonne SPE est lavée avec 100 % d'acétonitrile à 2 mL/min pendant 4 min. L'acétonitrile a un pouvoir éluant plus important que le méthanol pour les composés organiques. Après l'application de ce rinçage, les injections d'eau d'Evian® qui suivait l'injection de l'étalon à 250 ng/L, ne présentent plus d'effet de mémoire pour le PFOS et son étalon interne.

De plus, il a été constaté que le niveau de contamination en PFOA avait été réduit d'un facteur 2. Il est possible que la force éluante de la phase mobile (70% méthanol avec 20 mM acétate d'ammonium/30% eau avec 20mM acétate d'ammonium) n'est pas suffisante pour éluer 100% des PFOS piégés au sein de la colonne SPE.

5.4 EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE SUR UNE EAU NATURELLE

Une matrice d'eau de surface, de l'eau de l'Oise filtrée, a été analysée (les caractères physico-chimiques de l'eau utilisée sont décrits en annexe 6).

Les essais sur de l'eau non dopée ont permis de détecter la présence de PFOA et de PFOS dans la matrice (valeur détectée <LQ).

Un ajout de 12 ng/L pour le PFOA et 13 ng/L pour le PFOS a été effectué sur les échantillons de matrices d'eau de l'Oise pour évaluation de la limite de quantification (n=10). Des analyses ont également été effectuées avec des dopages à 20 % et 80 % de la gamme d'étalonnage.

Les résultats sont présentés dans les figures 4 et 5 ci-après. Ils permettent de déterminer les limites de quantification correspondant aux valeurs de dopage les plus basses (11,9 ng/L pour le PFOA et 13,4 ng/L pour le PFOS).

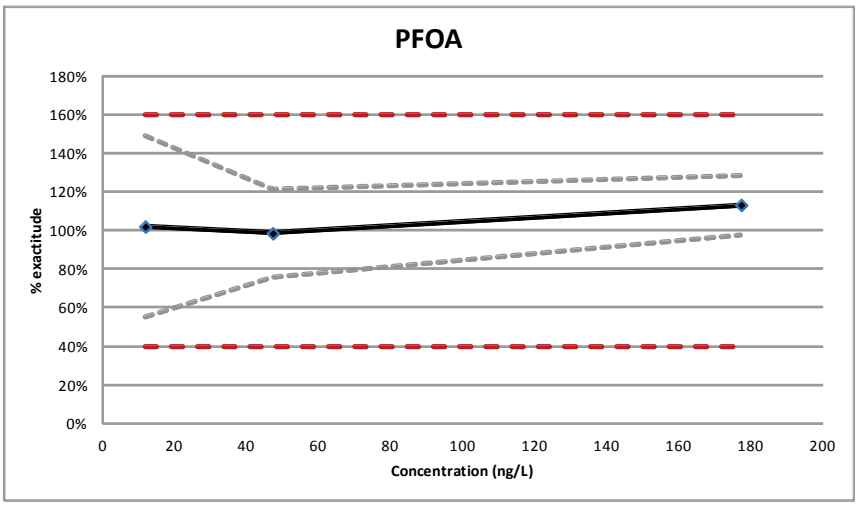


Figure 4 Exactitude des mesures pour un niveau de confiance de 95 % (k=2) pour le PFOA (LQ=11,9 ng/L).

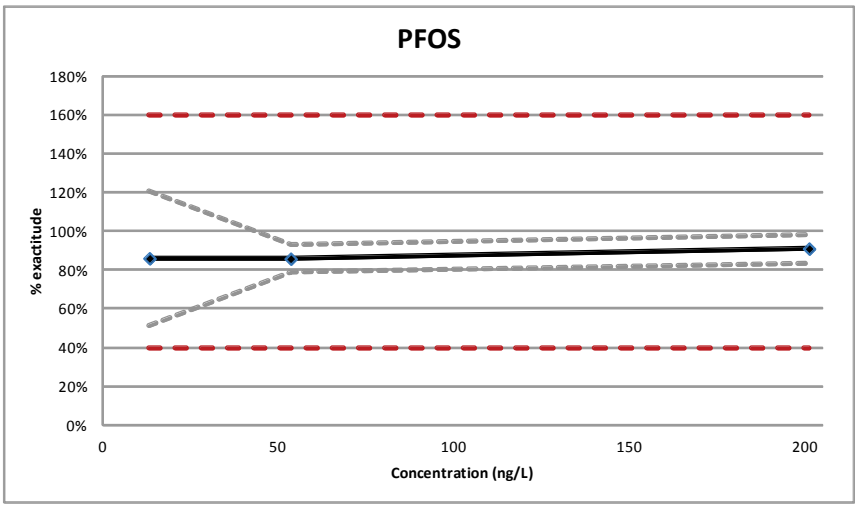


Figure 5 Exactitude des mesures pour un niveau de confiance de 95 % (k=2) pour le PFOS (LQ=13,4 ng/L)

La méthode testée permet d'obtenir des rendements acceptables pour les concentrations et composés considérés.

5.5 ESSAIS SUR DE L'EAU BRUTE

Les composés perfluorés ont un caractère amphiphile qui peut entrainer un partage entre la fraction particulaire et dissoute.

Quelques travaux ont notamment rapporté des partitions pour le PFOA et le PFOS. Globalement, ces 2 composés sont majoritairement retrouvés dans la fraction dissoute mais ils peuvent être présents dans la phase particulaire [6-8].

Dans une étude AQUAREF effectuée sur la répartition des composés perfluorés dans les eaux de rejet [16], dans les gammes testés (30 et 300 mg/L de MES), le dosage séparé des phases a démontré que le PFOA est principalement retrouvé dans la phase dissoute (15-28 % sur la phase particulaire). Le PFOS est plus présent que le PFOA (32-65 %) sur la phase particulaire. L'augmentation du taux de MES accroit la présence du PFOA et du PFOS sur la phase particulaire.

Des tests ont été ainsi effectués sur un échantillon de l'eau de l'Oise prélevé avec un taux de 164 mg/L de MES.

La SPE-OL ne peut pas s'appliquer aux eaux brutes car les matières en suspensions viennent rapidement obstruer la colonne SPE (cette remarque est également valable pour la SPE « classique »). Une approche a donc été évaluée pour pouvoir analyser cette matrice avec la SPE-OL.

Ainsi, 2 mL de MeOH et les étalons internes sont ajoutés à 16 mL d'échantillon brut. Cette solution est ensuite filtrée avec un micro-filtre (filtre Chromafil®Xtra GF 100/25, en fibre de verre, volume mort de 4 µL). Le filtrat est recueilli. Les MES prélevés sur le filtre sont ensuite extraits par passage successif de 2 *1 mL de méthanol (figure 6). Le méthanol est ajouté au filtrat de façon à obtenir 20 mL d'échantillon contenant 20 % de MeOH. 1,5 mL est ensuite recueilli pour injection par SPE-OL/LC/MS/MS.

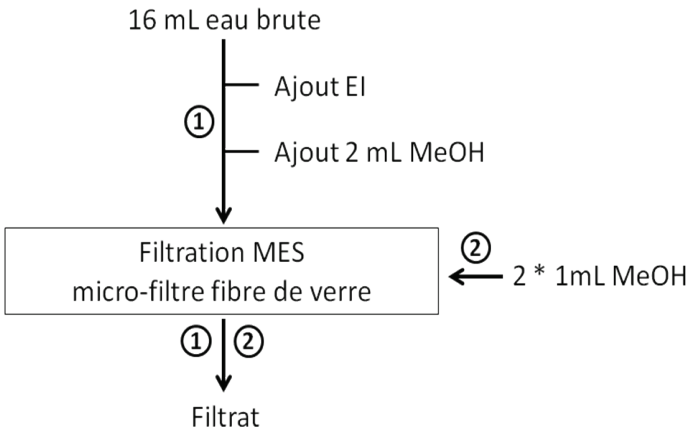


Figure 6 Schéma explicatif de la démarche d'extraction des composés perfluorés dans de l'eau brute

L'analyse des blancs de filtres utilisés pour séparer les MES n'a pas montré de contamination en composés perfluorés.

Pour les matrices non dopés, du PFOA (54 ng/L) et du PFOS (15 ng/L) ont été retrouvés dans l'eau de l'Oise brute.

Des ajouts équivalents à la valeur de LQ, 20 % et 80 % de la gamme d'étalonnage ont effectuées sur les matrices d'eau de l'Oise. Les échantillons ont été laissés reposer pour maturation avec agitation pendant 24H. Ils ont ensuite été extraits selon le protocole décrit ci-dessus. Les rendements obtenus après correction des valeurs trouvées pour les matrices non dopées sont présentés figure 7.

		Valeur théorique de l'ajout (ng/L)	Rendement (%)	CV (%)
PFOA	LQ	12	127%	39%
PFOS	LQ	13	83%	8%
PFOA	20%	47	148%	28%
PFOS	20%	54	99%	14%
PFOA	80%	177	93%	40%
PFOS	80%	201	101%	7%

Figure 7. Rendements d'extraction dans l'eau de l'Oise brute pour des ajouts équivalents à la valeur de LQ, 20% et 80% de la gamme d'étalonnage (n=3)

Pour le PFOS, la méthode utilisée a généré des rendements acceptables, entre 83 et 101 % avec des CV au maximum égal à 14 %. Pour le PFOA, des rendements compris entre 93 % et 148 % associés à une grande variabilité des résultats ont été obtenues. Cette variabilité pourrait être attribuée à l'extraction des PFOA contenues dans les MES. Pour cette molécule, la méthode essayée ne semble pas être suffisamment robuste.

6. CONCLUSION

L'analyse de composés perfluorés (PFOA et PFOS) par SPE en ligne LC/MS/MS a été évaluée.

Des problèmes de contamination de PFOA provenant du système analytique ont été observés. Malgré des essais et la réduction de cette contamination par un lavage avec de l'acétonitrile, aucune solution technique n'a pu être trouvée. L'utilisation de système spécifique qui exclut tous les matériaux contenant des composés perfluorés permettrait de résoudre ce problème.

Les problèmes de contamination et d'effet de mémoire ont toutefois pu être réduits par le lavage de la colonne SPE avec de l'acétonitrile.

En tenant compte de la contamination, des limites de quantification de 12 ng/L d'eau pour le PFOA et de 13 ng/L d'eau pour le PFOS ont pu être obtenues dans des matrices d'eau de surface filtrée avec un domaine d'application établi jusqu'à 250 ng/L pour les 2 molécules.

La LQ pour le PFOS reste éloignée de la valeur des normes de qualité environnementale (NQE) proposée à 0,6 ng/L. Le chargement d'un volume plus important sur la colonne SPE combiné avec l'utilisation d'un spectromètre de dernière génération pourrait peut être permettre d'atteindre ces niveaux.

Des tests ont été effectués pour l'analyse de l'eau brute en séparant les phases dissoute et particulaire et en réunissant les extraits pour analyse par SPE-OL/LC/MS/MS. Pour le PFOS, des résultats acceptables ont été obtenues. Cependant, pour le PFOA, ces tests ont démontré le manque de robustesse du procédé utilisé. Des méthodes d'extraction de la phase particulaire avec un autre solvant (acétonitrile) ou une agitation des MES piégés sur le filtre en présence de solvant (sur vortex) pourraient être évaluées.

En résumé, pour le PFOS, ce type d'analyse donne des résultats acceptables mais la valeur de NQE n'est pas atteinte. Pour le PFOA, des améliorations de méthodes doivent être effectuées afin d'atteindre des résultats acceptables.

En comparaison avec la méthode MA-09 [5], la préparation d'échantillon est simplifiée et plus rapide (manipulation de 20 mL contre 1L avec MA-09, moins d'étape de préparation d'échantillon). Par contre, le chargement de la colonne SPE étant limité, de meilleures limites de quantification sont cependant obtenues avec MA-09 (2 ng/L contre 13 ng/L pour le PFOS en SPEOL).

En perspective générale, la méthode d'extraction par SPE-OL dans l'eau brute pourrait être testée sur toutes molécules relativement hydrophobes analysables par LC/MS/MS.

7. REFERENCES

[1] Rapport d'étude INERIS – Strub M.P., Kinani S., Proposition de position française concernant un protocole analytique pour les composés perfluorés – 2008 . Référence DRC-09-95687-05202B

http ://www.onema.fr/IMG/pdf/2009_017.pdf

[2] Proposition de révision de l'annexe X de la DCE et de la D 2008/105/CE, Commission européenne, Bruxelles, Janvier 2012

[3] DIRECTIVE 2009/90/CE DE LA COMMISSION du 31 juillet 2009, établissant, conformément à la directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil, des spécifications techniques pour l'analyse chimique et la surveillance de l'état des eaux, Commission européenne, Août 2009

[4] Norme ISO 25101 : 2009 ; Qualité de l'eau – Détermination du sulfonate de perfluorooctane (PFOS) et de l'octanoate perfluoré (PFOA) – Méthode par extraction en phase solide et chromatographie liquide/spectrométrie de masse pour des échantillons non filtrés ; 2009.

[5] Fiche méthode Aquaref MA-09, perfluorés dans les eaux – INERIS

http ://www.aquaref.fr/system/files/MA09_PFOA_eau_VF040510.pdf

[6] Ahrens-L., Plassmann M., Xie Z., Ebinghaus R., Front. Environ. Sci. Engin. China, 2009, 3, 152-170

[7] Ahrens L., Taniyasu S., Yeung L.W.Y, Yamashita N., Lam P.K.S., Ebinghaus R., Chemosphere, 2010, 79, 266-272

[8] Project Perforce – De Voogt P. – Perfluorinated compound in the 29uropean environnement – FP6-NEST-508967- 2006

[9] Berger U., Kaiser M.A., Karrman A., Barber J.L., van Leeuwen S.P.J., Anal. Bioanal. Chem (2011), 400, 1625-1635

[10] Rodriguez-Mozaz S., Lopez de Alda M.J., Barcelo D., J. Chromatogr. A, 2007, 1152, 97-155

[11] Van Leeuwen, S. P. J.; de Boer, J.; J. Chromatogr. A, 2007, 1153, 172-185

[12] Gosetti, F.; Chiuminatto, U.; Zampieri, D.; Mazzucco, E.; Robotti, E.; Calabrese, G.; Gennaro, M.C.; Marengo, E., J. Chromatogr. A, 2010, 1217, 7864-7872

[13] Inoue , K.; Okada , F.; Ito , R.; Kawaguchi , M.; Okanouchi , N.; Nakazawa, H.; J. Chromatogr. B, 2004, 810, 49–56

[14] Haug, L.S.; Thomsen, C.; Becher, G., J. Chromatogr. A, 2009, 1216, 385-393

[15] Holm, A.; Wilson, SR.; Molander, P.; Lundanes, E.; Greibrokk, T., J. Sep. Sci., 2004, 27, 1071-1079

[16] Rapport d'étude Aquaref- Analyse de substances prioritaires dans les eaux : Influence des matières en suspension sur le dosage de polluants organiques dans les eaux de rejets : étude des organoétains (OTC), et des perfluorés- 2012. Référence INERIS-DRC-11-112048-02966A.

8. ANNEXES

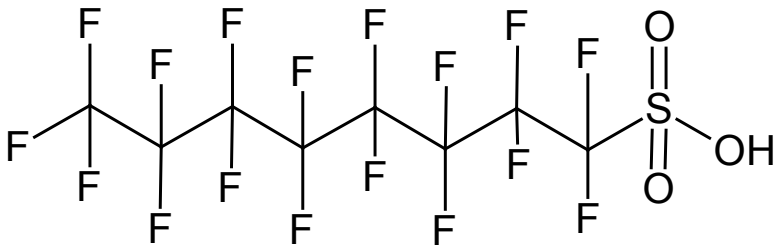
Repère	Désignation	Nombre de pages
Annexe 1	Structure des composés étudiés	1
Annexe 2	Conditions expérimentales utilisées pour l'analyse des composés perfluorés par SPE en ligne	1
Annexe 3	Système de pré concentration SPE en ligne	1
Annexe 4	Méthode chromatographique par injection directe avec préconcentration SPE en ligne LC/MS/MS	1
Annexe 5	Gamme d'étalonnage avec et sans ajout de 20% de MeOH	1
Annexe 6	Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de l'Oise	1

ANNEXE 1

Structure des composés étudiés

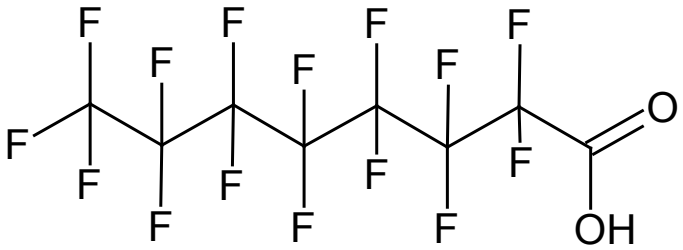
Acide perfluoro octanesulfonique (PFOS)

(code sandre : 6561, code CAS : 1763-23-1)



Acide perfluoro octanoïque (PFOA)

(code sandre : 5347, code CAS : 335-67-1)



ANNEXE 2

Conditions expérimentales utilisées pour l'analyse des composés perfluorés par SPE en ligne

Des solutions mères individuelles de chaque composé cible ont été préparées :

- par dilution de 50 mg de solution de PFOS à 40 % dans l'eau commercialisée par Fluka® dans 20 mL de méthanol

- par solubilisation de 20mg de PFOA, commercialisée par Acros®, dans 20 mL de méthanol

On obtient ainsi deux solutions mères à 1mg/ml de PFOA et de PFOS.

Une solution fille contenant les 2 composés cibles est obtenue par ajout de 100 µl de chacune des solutions mère dans 20 mL d'eau d'Evian® pour aboutir à une solution d'une concentration de 5 µg/mL dans l'eau pour le PFOA et le PFOS.

Des étalons internes, marqués au ^{13}C, ont été utilisés (voir tableau 2) (solution mère à 50 µg/mL de méthanol commercialisée par Wellington®). Ils sont préparés en mélange par ajout de 10µl de chaque solution dans 10 mL d'eau d'Evian® pour obtenir une concentration de 50 ng/mL.

Composés	Abbréviation
Perfluoro-n-[1,2,3,4-$^{13}C_4$]octane sulfonate	$^{13}C_4$-PFOS
Acide perfluoro-n-[1,2,3,4-$^{13}C_4$] octanoïque	$^{13}C_4$-PFOA

Tableau 2 : Liste des étalons internes

Une gamme dite de dopage est préparée par ajout de volumes adéquats de la solution à 5 µg/mL, en fioles de 20 mL, pour obtenir des concentrations allant de 2,5 ng/mL à 200 ng/mL d'eau d'Evian®.

Une gamme d'étalonnage est préparée à partir de la gamme de dopage par dilution de 20 µL de chaque point de dopage dans 20mL d'eau d'Evian® à 20% de méthanol, après avoir ajouté 20 µL de la solution d'étalons marqués à 50 ng/mL. Les concentrations en PFOA et PFOS de cette gamme s'étendent de 2,5 à 200 ng/L; la concentration en étalons marqués est de 50 ng/L. Remarque importante : ramenée dans le milieu « eau d'Evian® » la gamme d'étalonnage a une étendue de 3,1 ng/L à 250 ng/L en concentration en composés perfluorés.

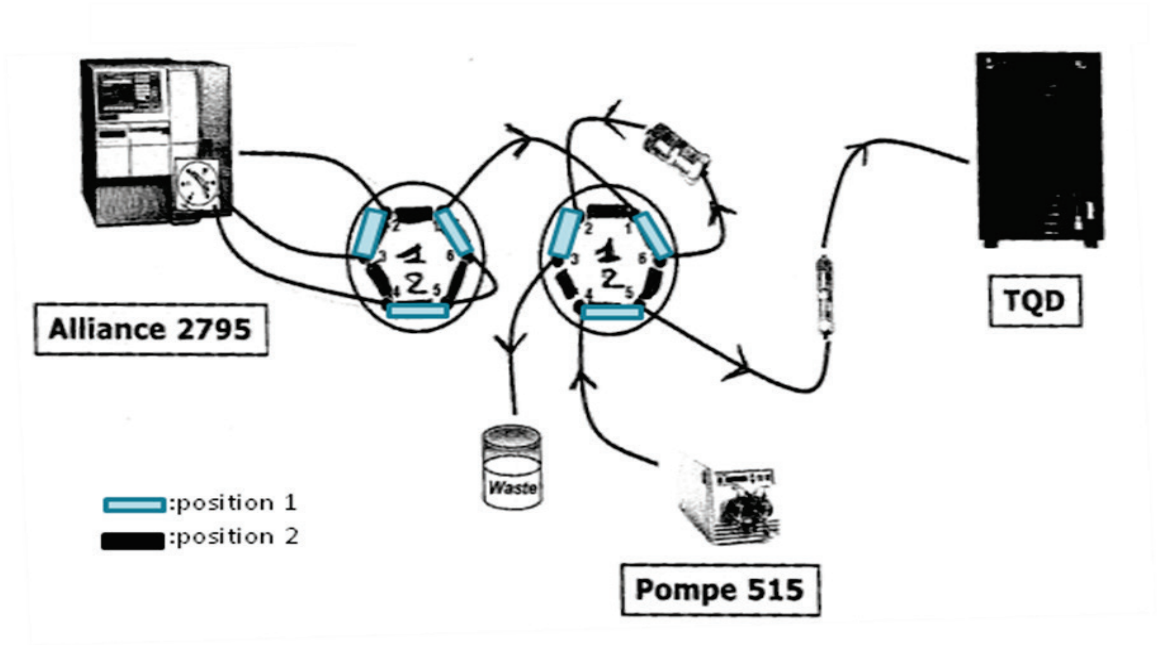
ANNEXE 3

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 colonne SPE. Avec le système utilisé, un volume de 1,5 mL (correspondant au volume d'un flacon) était échantillonné. Le volume normal d'injection en mesure directe (sans SPE en ligne) était de 20 µl. 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 colonne SPE et élue les composés piégés en backflush, en fonction du gradient, directement vers la colonne chromatographique.



légende

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

ANNEXE 4

Méthode chromatographique avec préconcentration SPE en ligne LC/MS/MS

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

Polyclean 302H 15X4,0MM Upti-Trap (Interchim)

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

Colonne : X-Bridge C18 (Waters®, longueur : 50 mm, de diamètre interne : 2,1 mm et d'épaisseur de phase stationnaire : 2,5 ìm).

Débit : 0,3 mL/min (lorsque la colonne analytique est présente sur le parcours d'élution)

Phases mobiles d'élution de la colonne analytique :

Solvant : Méthanol 20 mM/L Acétate d'ammonium

Phase Aqueuse : Eau 20 mM/L Acétate d'ammonium

Phase aqueuse de chargement : Eau à 1 % d'acide formique.V/V

Température du four de la colonne analytique : 40 °C

Gradients :

Tableau 3. Méthode chromatographique avec injection SPE et méthode de lavage par acétonitrile

Temps en min.	Eau à 1% d'acide formique	Eau 20 mM Acétate d'ammonium	Méthanol 20 mM Acétate d'ammonium	Acétonitrile	Débit en ml/min (système 2795 Waters®)	Position du système SPE	Pompe 515(3)
0	100%			0 %	2	1(1)	Marche
2	100%			0 %	2	1(1)	Marche
2,1	100%			0 %	0,3	1(1)	Marche
2,2		30%	70%	0%	0,3	1(1)	Marche
2,8		30%	70%	0%	0,3	2(2)	Marche
3,0		30%	70%	0%	0,3	2(2)	Arrêt
10,8		30%	70%	0%	0,3	1(1)	Marche
11		30%	70%	0%	0,3	1(1)	Marche
12				100%	0,3	1(1)	Marche
12,2				100%	2	1(1)	Marche
16				100%	2	1(1)	Marche
20	100%			0 %	2	1(1)	Marche
25	100%			0 %	2	1(1)	Marche

(1) En position 1 (relay fermé, en OFF) = Chargement de la colonne SPE.

Pompe 515 en série avec la colonne analytique vers le TQD.

Système Waters 2795 : la pompe élue en série sur la boucle d'injection et la colonne SPE, l'éluat va vers la poubelle.

(2) En position 2 (relay ouvert, en ON)= Elution de la colonne SPE et chromatographie sur la colonne analytique.

Pompe 515 en direct sur la poubelle.

Systéme Waters 2795 : la pompe élue en série la colonne SPE, la colonne analytique, l'éluat va vers le TQD.

(3) Pompe 515 qui alimente à 0,3ml/min avec un mélange 30% eau et 70% méthanol à 20 mM d'acétate d'ammonium. Lorsque la pompe est en marche le relay est fermé (en OFF), lorsque la pompe est à l'arrêt, le relay est ouvert (en ON).

● **Conditions spectrométriques :**

1. Mode d'ionisation : ESI(-),

2. Tension du capillaire : 3 kV,

3. Température de la source : 150 °C,

4. Température du gaz de désolvatation (N2) : 400 °C,

5. Débit en gaz de désolvatation (N_2) : 800 L/h,

6. Débit en gaz rideau (N_2) : 50 L/h,

7. Mode d'acquisition : MRM (Multiple Reaction Monitoring),

8. Débit en gaz de collision (Argon) : 0,17 mL/min.

Composés	Ions précurseurs (m/z)	Transitions	D.t.[c] (s)	T.C.[d] (V)	E.C.[e] (eV)
PFOA	412,9	412,9 – 368,9[a]	0,10	20	11
		368,9 – 169,0[b]	0,10	35	16
$^{13}C_4$-PFOA	416,9	416,9 – 371,9[a]	0,10	10	10
PFOS	498,9	498,9 – 98,9[a]	0,10	60	45
		498,9 – 79,9[b]	0,10	60	47
$^{13}C_4$-PFOS	502,9	502,9 – 98,9[a]	0,10	60	37

[a] Transition de quantification,

[b] Transition de confirmation,

[c] Dwell time,

[d] Tension de cône,

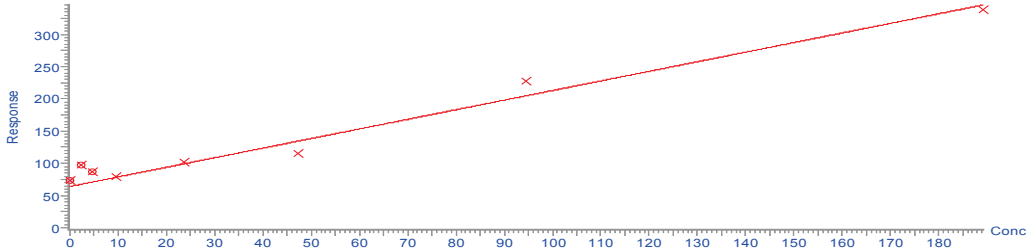
[e] Energie de collision.

ANNEXE 5

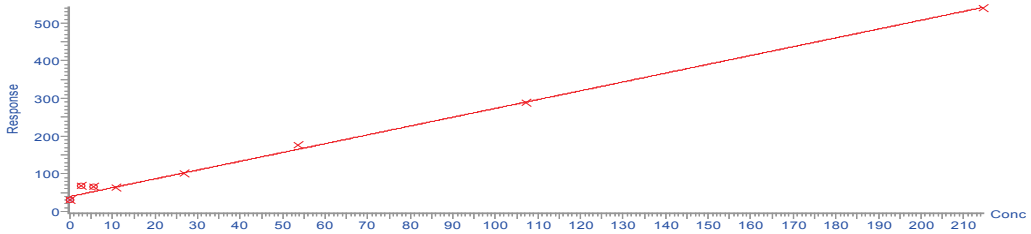
Gamme d’étalonnage avec et sans ajout de 20% de MeOH

Gamme d'étalonnage dans de l'eau d'Evian®

PFOA – r^2= 0,974

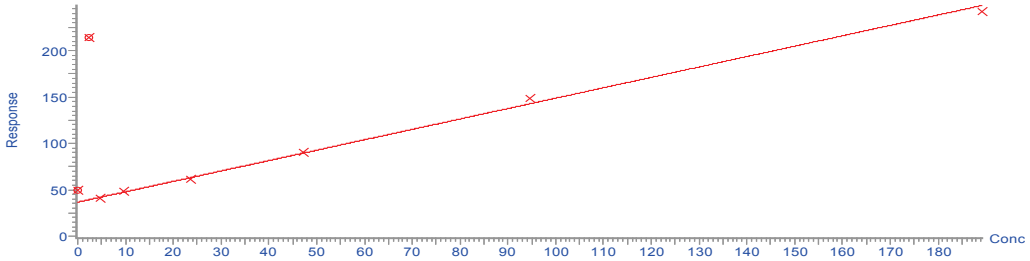


PFOS – r^2= 0,998

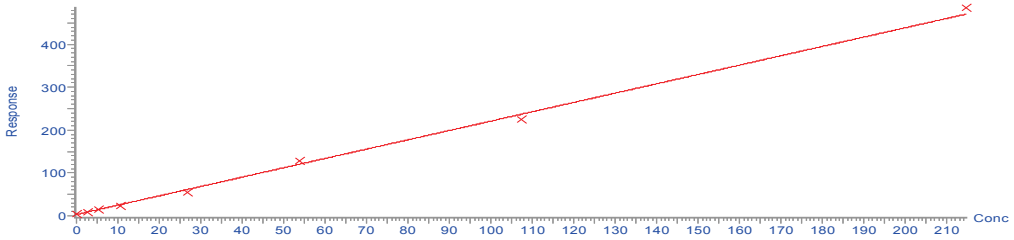


Gamme d'étalonnage avec 20% de MeOH dans de l'eau d'Evian®

PFOA – r^2= 0,997



PFOS - r^2= 0,996



Réf. : DRC-13-126811-01269A

ANNEXE 6

Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de l'Oise

Matrice	Eau de l'Oise
pH	7,3
Conductivité (µS/cm)	1091
COT (mg/L)	6,73
COD (mg/L)	2,95
Anions	
Cl^- (mg/L)	22,3
NO_3^- (mg/L)	20,2
PO_4^{3-} (mg/L)	0,12
SO_4^{2-} (mg/L)	29,5
Cations	
Na^+ (mg/L)	11,1
NH_4^+ (mg/L)	0,11
K^+ (mg/L)	3,13
Ca^{2+} (mg/L)	107
Mg^{2+} (mg/L)	6,13