

ANALYSE DE SUBSTANCES POLAIRES DANS LA PHASE AQUEUSE

BILAN BIBLIOGRAPHIQUE DE RECENSEMENT
DES DIFFÉRENTES MÉTHODES ET STRATÉGIES

Thème D : Amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques

François Lestremau
Octobre 2014

Programme scientifique et technique
Année 2013

Rapport d'étape

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2013 dans le cadre du partenariat ONEMA – AQUAREF 2013, au titre de l'action D- Amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques.

Auteur (s) :

Francois Lestremau
INERIS
francois.lestremau@ineris.fr

Vérification du document :

Laurence Amalric
BRGM
laurence.amalric@brgm.fr

Julie Cabillic
LNE
julie.cabillic@lne.fr

Les correspondants

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

Etablissement :

Référence du document : François LESTREMAU – Analyse de substances polaires dans la phase aqueuse. Bilan bibliographique de recensement des différentes méthodes et stratégies. p. 64

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

1. GLOSSAIRE.....	11
2. INTRODUCTION	13
3. CONSIDERATION SUR LA DEFINITION DE LA POLARITE D'UNE MOLECULE : EMPLOI DU LOG K_{OW} ET DU LOG D	15
3.1 Introduction aux log K _{OW} et log D	15
3.2 Impact sur la présence des molécules ionisables dans les milieux et sur les méthodes analytiques	18
3.2.1 Répartition dans les milieux aquatiques	18
3.2.2 Impact sur les méthodes analytiques	18
4. MOLECULES CONSIDEREES PAR CETTE ETUDE.....	21
4.1 Liste des molécules recensées avec log D _{pH=7} < 0	21
4.2 Composés polaires non ioniques	22
4.2.1 Pesticides.....	22
4.2.2 Composés pharmaceutiques.....	24
4.2.3 sous-produits de désinfection.....	25
4.2.4 Autres composés	25
4.3 Composés ioniques	25
5. CONSIDERATIONS SUR LE MATERIEL ANALYTIQUE POUR L'ANALYSE DE COMPOSES POLAIRES	27
5.1 Préconcentration d'échantillon	27
5.2 Séparation chromatographique.....	31
5.2.1 Séparation par HILIC	31
5.2.2 La chromatographie d'échange d'ions (chromatographie ionique, CI)	34
6. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANALYSE DE CERTAINES FAMILLES DE COMPOSES POLAIRES	35
6.1 Analyse du glyphosate et ses dérivés	35
6.1.1 Etat de l'art.....	35
6.1.2 Analyse sans étape de dérivation.....	36
6.2 Quats.....	40
6.3 Acides haloacétiques	46
7. ANALYSE MULTIRESIDUS DE COMPOSES POLAIRES ET APOLAIRES.....	53
8. CONCLUSION GENERALE	57
9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	59

RESUME

Les composés très polaires représentent une part non négligeable des polluants qui peuvent être présents dans les milieux aquatiques. De part leur grande solubilité dans l'eau, ces composés sont considérés comme étant présents exclusivement dans la fraction aqueuse.

Le log K_{ow} ou log P est généralement utilisé afin de caractériser ou de prévoir la présence d'un micropolluant organique dans les différentes phases des milieux aquatiques. Cependant, les composés très polaires ou polaires possèdent souvent des fonctions ionisables, acides ou basiques. Ainsi, le log K_{ow} n'est pas un bon indicateur pour ces substances car il n'est pas déterminé à un pH représentatif des milieux aquatiques. Le log D, qui prend en compte l'influence du pH, devrait être préférentiellement utilisé afin d'obtenir une image plus représentative de la partition et présence potentielle dans les différentes fractions. Ainsi, les composés présentant un log D < 0 à pH= 7 ont été considérés par cette étude.

Depuis ces dernières années, le nombre d'étude consacrée à l'occurrence et le devenir des contaminants émergents polaires tels que les pesticides polaires, pharmaceutiques, cosmétiques, surfactants, hormones, produits de désinfection,... et leur produit de dégradation dans les milieux aquatiques a connu une croissance constante. Ces études ont ainsi démontré la présence fréquente d'une très grande diversité de ces produits chimiques dans l'environnement. Une liste non exhaustive de polluants polaires mesurés dans les milieux aquatiques en relation avec différentes classes d'usage est présentée.

L'analyse des composés polaires nécessite de disposer de méthodes spécifiques qui puissent permettre leur préconcentration, séparation et détection. Le matériel analytique spécifique aux composés polaires est ainsi mentionné. Enfin, les stratégies analytiques appliquées aux composés polaires sont présentées. Les types d'analyse ne nécessitant pas d'étape de dérivation ont été principalement abordés. Les analyses spécifiques de polluants ou de familles de polluants ont été recensées à travers 3 exemples : le glyphosate et ses dérivés, les acides haloacétiques et les quats.

Les analyses multirésidus et/ou non ciblées, permettant de mesurer dans une même séquence analytique des substances avec des propriétés physico-chimiques très variées et incluant des composés très polaires, sont également abordées.

Pour toutes ces applications, les méthodes de préconcentration d'échantillon, d'analyses chromatographiques et de détections ont été comparées.

Mots clés (thématique et géographique) :

Composés polaires, Phase aqueuse, log D, K_{ow}

ABSTRACTS

Very polar compounds represent a non negligible part of pollutants that can be potentially found in water resources. Due to their high solubility in water, these compounds are considered to be exclusively present in the aqueous phase.

Log K_{ow} (also known as log P) is currently used to characterize or evaluate the presence of organic micro pollutants in the various phases of aquatic environment. However, very polar compounds often bear ionisable groups (acids or basics). Therefore, log K_{ow} is not suitable for these substances since it has often not been determined at the same level of pH as aquatic environment. Log D, which takes into account pH effect on molecular structure, should therefore preferentially be used to obtain a more representative view of pollutants partitioning in various phases.

Since last few years, the number of studies related to the occurrence and fate of polar emerging pollutants such as polar pesticides, pharmaceutical, personal care product, surfactants... and their degradation products in aquatic resources has been constantly increasing. These studies demonstrated the common presence of a wide range of these chemical products in the environment. A non exhaustive list of polar pollutants determined in aquatic environment is presented in this document.

The analysis of polar compounds requires using specific methods that can be suited to their extraction, individual separation and detection. The analytical materials specific for polar compounds is therefore reminded. Then, analytical strategies applied to polar compounds are presented. The different approaches which do not require derivation step have been mainly discussed. Specific analyses of pollutants or classes of pollutants have been reviewed throughout 3 examples: glyphosate and related compounds, haloacetic acids and quats.

Multiresidues analysis and /or non target screening, which aim to measure in a unique run substances with very large physico chemical properties including very polar compounds, are also discussed.

For all these items, sample preparation, chromatographic methods and detection have been compared.

Key words (thematic and geographical area) :

Polar compounds, aqueous phase, log D, K_{ow}

PRÉAMBULE

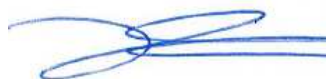
Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

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	Francois LESTREMAU	Olivier AGUERRE-CHARIOL	Nicolas ALSAC
Qualité	Ingénieur à l'Unité « Innovation pour la mesure » Direction des Risques Chroniques	Responsable de l'Unité « Innovation pour la mesure » Direction des Risques Chroniques	Responsable du Pôle « Caractérisation de l'Environnement » Direction des Risques Chroniques
Visa			

1. GLOSSAIRE

AHA	: Acides haloacétiques,
CI	: Chromatographie ionique,
CQ	: Chlorméquat,
DBAA	: Acide dibromoacétique,
DCAA	: Acide dichloroacétique,
DF	: Difenzoquat,
DQ	: Diquat,
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique,
FID	: Détecteur à ionisation de flamme,
FMOCl	: Fluorenylméthylchloroformate,
ECD	: Détecteur à capture d'électron,
ESI	: Electrospray,
GC	: Chromatographie en phase gazeuse,
HAP	: Hydrocarbures aromatiques polycycliques,
HFBA	: Acide hexafluoro-butyrique,
HILIC	: Chromatographie par interaction hydrophile (Hydrophilic interaction chromatography),
HPLC	: Chromatographie à phase liquide,
ICPMS	: Spectrométrie par torche à plasma (Inductively coupled plasma mass spectrometry),
K _{ow}	: (ou log P) Coefficient de partition octanol/eau,
Log D	: Coefficient de distribution octanol/eau en fonction du pH,
LOQ	: Limites de quantification,
MBAA	: Acide monobromoacétique,
MCAA	: Acide monochloroacétique,
MRM	: Acquisition en mode de réaction multiple (multiple reaction monitoring),
MIP	: Polymères à empreinte moléculaire,
MQ	: Mépiquat,
MS	: Spectrométrie de masse,
MTBE	: Méthyl tert-butyl ether,
PCB	: Polychlorobiphényles,
PQ	: Paraquat,
SAX	: Echange de cation faible (weak cation exchange),
SBSE	: Extraction sur barreau absorbant (stir bar sorptive extraction),

SCX	: Echange de cation fort (strong cation exchange),
SFC	: Chromatographie par fluide pressurisé,
SPE	: Extraction sur phase solide (solide phase extraction),
SPME	: Microextraction sur phase solide,
TAME	: Tert-amyl méthyl ether,
TCAA	: Acide trichloroacétique,
TFA	: Acide trifluoroacétique,
US EPA	: United States Environmental Protection Agency,
UV	: Ultraviolet,
WAX	: Echange d'anion faible (weak anion exchange),
WCX	: Echange de cation faible (weak cation exchange),
WHO	: World Health Organisation.

2. INTRODUCTION

Une des principales limitations de l'analyse de traces de polluants organiques réside dans les capacités matérielles et/ou instrumentales disponibles. Ainsi, les travaux d'études ou de recherches se focalisent généralement sur les molécules qui sont techniquement les plus accessibles. La chromatographie en phase gazeuse, d'abord couplée à des détecteurs spécifiques (ECD, FID, ...) puis à la spectrométrie de masse a atteint une maturité technique à la fin des années 80 et s'est largement déployée depuis pour constituer un instrument de base des laboratoires analytiques.

Ainsi, les analyses de traces ont été principalement consacrées à des polluants volatils ou apolaires de type PCB, HAP.

Les composés polaires sont des composés peu volatils et sont ainsi plus communément analysés par chromatographie en phase liquide. L'absence d'une technologie adéquate a ainsi constitué un frein à leur étude à un niveau traces dans les milieux environnementaux. Le développement d'une interface électrospray au début des années 90 a permis le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. Des instruments commerciaux sont alors devenus disponibles généralisant l'analyse à un niveau traces de molécules peu étudiées jusqu'à lors.

Ainsi, depuis ces dernières années, le nombre d'études consacrées à l'occurrence et au devenir des contaminants émergents polaires tels que les pesticides polaires, les principes actifs pharmaceutiques, les cosmétiques, les tensio-actifs, hormones, produits de désinfection,... dans les milieux aquatiques a connu une croissance constante (Huntscha, 2012). Ces études ont ainsi démontré la présence fréquente d'une très grande diversité de ces produits chimiques dans l'environnement.

Plus récemment, les travaux de recherche se sont orientés vers la détection et l'identification des produits de transformation des polluants apolaires qui peuvent également représenter une menace toxique au moins aussi importante que les composés parents. Ces composés sont généralement des substances polaires issues de phénomènes d'oxydation ou de dégradation de polluants parents.

L'analyse des composés polaires nécessite donc de disposer de méthodes qui puissent permettre leur préconcentration, séparation et détection. Pour la préconcentration généralement effectuée par extraction sur phase solide, les méthodes « classiques » employaient des procédés de dérivation pour extraire ces substances sur des supports hydrophobes développés pour les composés apolaires. Désormais, des supports d'extraction composés de matériaux polaires ou ioniques souvent à base polymérique peuvent être employés à cet effet.

De manière analogue, pour la séparation chromatographique et la détection, les polluants polaires devaient être sous forme dérivée pour être analysés soit par GC (la forme dérivée des groupements polaires rendant les composés apolaires donc plus volatils) soit pour des analyses par chromatographie liquide par addition d'un groupement permettant une détection par spectrométrie UV ou de fluorescence. L'analyse de traces de composés polaires est désormais effectuée presque exclusivement par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Cependant, les composés très polaires ne présentent pas d'interactions suffisamment fortes pour entraîner une rétention sur des colonnes chromatographiques constituées de phases inverses utilisées dans la grande majorité des applications de séparation avant l'identification et la quantification.

Ainsi, les composés polaires éluent conjointement avec le front de solvant et une grande majorité de la matrice, ce qui provoque de nombreuses interférences. Dans certains cas, comme pour le glyphosate, la dérivation est donc toujours pratiquée pour obtenir une rétention suffisante sur la colonne chromatographique.

Le couplage de la chromatographie ionique à la spectrométrie de masse et/ou le développement récent de nouvelles phases de type *mixed mode* ou HILIC pour l'HPLC ont apporté la possibilité d'une analyse sans étape de dérivation. Ce type d'analyse permet ainsi un gain de temps important et peut potentiellement conduire à des méthodes plus robustes car le nombre d'étapes analytiques est réduit.

Ce rapport s'intéressera dans un premier temps à apporter une définition à la notion de polluants polaires visés par cette étude. Une liste non exhaustive de polluants polaires en relation avec différentes classes d'usage est présentée. Le matériel analytique spécifique aux composés polaires est brièvement évoqué.

Enfin, au travers d'exemples, les stratégies analytiques appliquées aux composés polaires sont décrites. Les types d'analyses ne nécessitant pas d'étape de dérivation sont principalement abordés. Dans le cadre des analyses de composés polaires, deux cas de figures sont considérés :

- Les analyses de polluants ou de familles de polluants spécifiés

Ce rapport s'intéresse à quelques exemples pour lesquels les différentes stratégies ont été appliquées : le glyphosate et certaines molécules associées pour les pesticides polaires, les acides haloacétiques pour les produits de désinfection et les quats pour les composés ioniques. Les méthodes de préconcentration d'échantillon et d'analyse chromatographiques sont comparées.

- Les analyses multirésidus et/ou non ciblées

Des méthodes spécifiques ou des adaptations des méthodes généralement utilisées doivent être développées afin de pouvoir dans une même méthode mesurer toutes les substances avec des propriétés physico-chimiques très variées. Ce document présente également les quelques stratégies employées par ces études dans ce cadre.

3. CONSIDERATION SUR LA DEFINITION DE LA POLARITE D'UNE MOLECULE : EMPLOI DU LOG K_{OW} ET DU LOG D

3.1 INTRODUCTION AUX LOG K_{OW} ET LOG D

La polarité peut se définir comme la répartition des charges positives et négatives au sein d'une molécule. Les différences d'électronégativité dans l'espace et particulièrement la dissymétrie de répartition des charges, positive ou négative, vont augmenter le caractère polaire d'une molécule.

Dans le cas des molécules organiques, les molécules polaires sont principalement celles composées de fonctions alcools, acides ou amines (sous forme neutre ou ionique).

Différents indices ont été utilisés pour définir la polarité par assimilation à la distribution d'une molécule dans les milieux aquatiques : par exemple le log K_D (coefficient de partition entre le sol (ou une matière solide type sédiment) et l'eau), le log K_{OC} (coefficient de partition carbone organique/eau) ou le log K_{ow} (coefficient octanol/eau, aussi appelé log P). Pour les deux premiers, peu de données expérimentales sont disponibles et ces indices dépendent de nombreuses variables souvent difficiles à caractériser précisément. Ils ne constituent pas à l'heure actuelle des paramètres facilement exploitables.

Ainsi, pour les milieux aquatiques, les composés sont généralement classés en fonction de leur polarité selon leur coefficient de partition octanol/eau. Les composés les plus apolaires vont avoir une affinité plus importante pour la phase octanol. Ainsi, selon le classement utilisé pour certaines études AQUAREF notamment l'étude exploratoire, un composé est considéré comme apolaire si son log K_{ow} > 5. Ces composés auront principalement tendance à être associés aux éléments hydrophobes des milieux aquatiques : les sédiments, matières en suspensions ou biotes. Avec un log K_{ow} entre 5 et 0, les composés peuvent être présents à la fois dans la phase hydrophile (aqueuse) et les phases hydrophobes. En dessous de 0, il est généralement considéré que les composés sont exclusivement présents dans la phase aqueuse.

Ce constat est cependant à relativiser en l'absence de données claires sur ce sujet. Des études AQUAREF sont prévues au programme 2014 afin de s'assurer de l'absence de composés polaires dans les parties hydrophobes des milieux aquatiques.

L'utilisation du log K_{ow} est adaptée à une bonne partie des micropolluants.

Le coefficient de partage octanol/eau peut être calculé selon :

$$\log K_{ow} = \log \frac{[\text{soluté}]_{\text{octanol}}}{[\text{soluté}]_{\text{eau}}^{\text{forme non ionisé (neutre)}}}$$

Le log K_{ow} est calculé lorsque la molécule est sous une forme non ionisée (neutre). Cependant, pour les molécules comportant des groupements ionisables (acides ou amines), cette approche est limitée car elle ne tient pas compte de leur état d'ionisation en fonction du pH.

Ainsi pour un composé comportant une fonction acide, le $\log K_{ow}$ sera calculé vers un pH = 2-3 où la fonction est entièrement protonée (sous forme COOH). A l'inverse, pour un composé comportant une fonction basique, il sera déterminé vers un pH supérieur à 8 voire plus. Il est ainsi préférable d'utiliser la notion de log D qui reflète la distribution des composés entre l'eau et l'octanol en fonction du pH.

Ainsi, la valeur de $\log K_{ow}$ trouvée dans les tables peut être relativement trompeuse car généralement, il n'y a aucune indication sur le pH auquel a été déterminée cette valeur.

La fraction aqueuse des milieux aquatiques présente généralement un pH compris entre 6 et 8. Ainsi, les fonctions acides et basiques des micropolluants sont sous formes partiellement ou totalement ionisées.

Dans ce cas, le log D peut fournir des indications sur la répartition de ces molécules.

Le log D se définit par :

$$\log D = \log \left(\frac{[\text{soluté}]_{\text{octanol}}}{[\text{soluté}]_{\text{eau}}^{\text{ionisé}} + [\text{solute}]_{\text{eau}}^{\text{neutre}}} \right)$$

La répartition des molécules à différents pH est dépendante des propriétés des molécules et est caractérisée par leur pKa.

Le lien avec le $\log K_{ow}$ peut être ainsi établi :

- Pour les molécules neutres :

$$\log K_{ow} = \log D$$

- Pour les molécules avec des groupements acides :

$$\log D = \log K_{ow} + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}}} \right]$$

- Pour les molécules avec des groupements basiques :

$$\log D = \log K_{ow} + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{\text{pKa} - \text{pH}}} \right]$$

Selon ces formules, une relation linéaire devrait être obtenue en fonction du pH lorsque la substance est sous forme ionisée. En réalité, il a été prouvé que les molécules ionisées se partitionnent à un certain stade également dans la phase non aqueuse entraînant un équilibre (Kah (2008)). Cela se matérialise par un plateau pour les molécules sous formes ionisées en fonction du pH.

En figure 1 et 2 sont présentés des exemples pour des composés ionisables, des médicaments dans ce cas, contenant une fonction acide : l'ibuprofène et une fonction basique : le métropolol.

Pour l'ibuprofène (Figure 1), son $\log K_{ow}$ est égal à 3,5. Cette valeur de partition entre l'octanol et l'eau est valable pour les pH les plus acides jusqu'à $pH = 4$. Au delà, la fonction acide commence à être ionisée (sous forme COO^-).

Ainsi, à $pH = 7$, la distribution de l'ibuprofène entre l'eau et l'octanol est modifiée par rapport au pH acide avec une présence beaucoup plus importante dans l'eau ($\log D_{pH=7} = 0,8$). Un plateau est atteint lorsque la fonction acide est entièrement ionisée à partir de $pH = 8,5$.

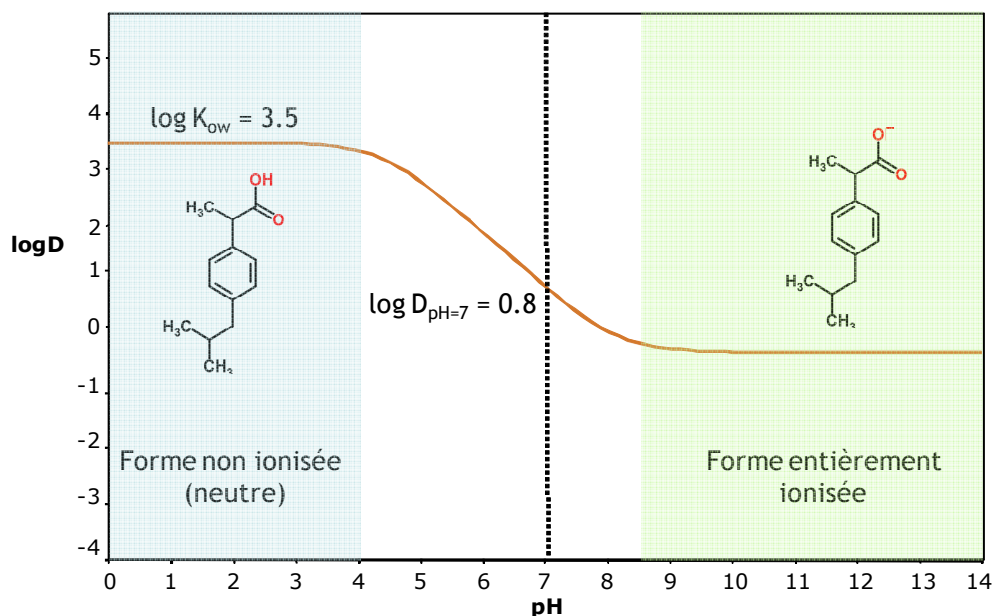


Figure 1. $\log D$ vs. pH pour l'ibuprofène

Le métropolol (Figure 2) comporte une fonction basique avec la présence d'une amine secondaire. Sa forme neutre est située à un pH compris entre 10 et 13 qui correspond à $\log K_{ow} = 1,8$.

Le composé est sous forme partiellement ionisée (sous forme $R_2-NH_2^+$) entre $pH = 6$ et $pH = 10$ puis totalement ionisée en dessous de $pH = 6$. A $pH = 7$, le $\log D_{pH=7}$ est de -0,8 et la molécule est pratiquement entièrement ionisée.

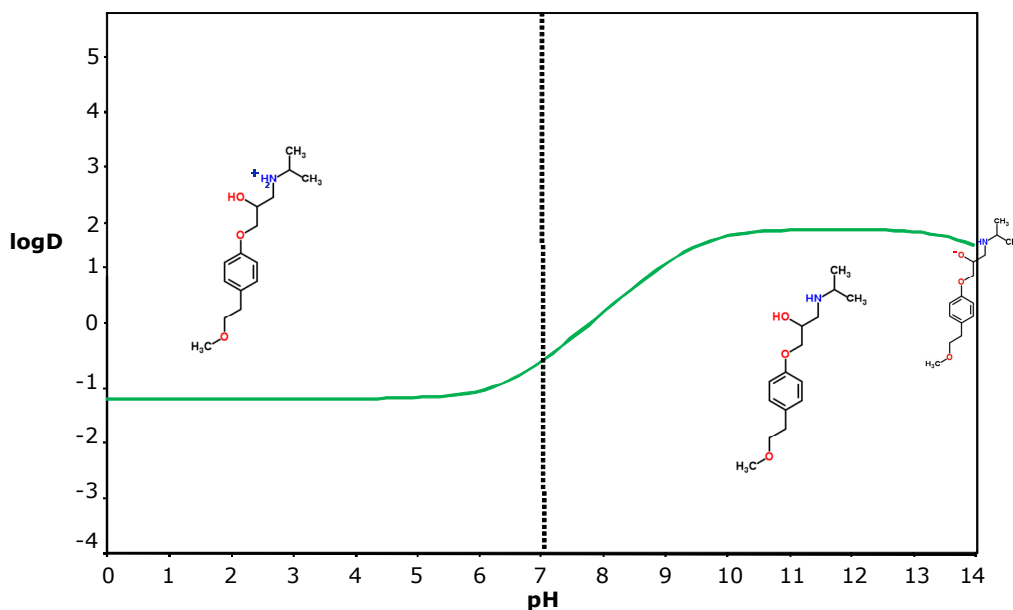


Figure 2. $\log D$ vs. pH pour le métropolol

En résumé, pour refléter un indice de polarité dans les milieux aquatiques, le log D doit être préféré au log K_{ow} afin de prendre en compte le comportement des molécules ionisables en fonction du pH.

3.2 IMPACT SUR LA PRESENCE DES MOLECULES IONISABLES DANS LES MILIEUX ET SUR LES METHODES ANALYTIQUES

3.2.1 REPARTITION DANS LES MILIEUX AQUATIQUES

Les milieux aquatiques abritent différentes matrices incluant l'eau, les sédiments et les biotes. Ces 2 dernières sont considérées comme des milieux hydrophobes. Les composés hydrophiles seraient ainsi principalement présents dans la fraction aqueuse. Dans le cadre de la répartition des substances dans une eau totale, les composés hydrophobes sont présents de manière prépondérante sur la fraction particulaire.

Les exemples décrits en figure 1 et 2 avec le log D vs. pH permettent d'aider à évaluer la présence d'un composé dans les fractions. Ainsi, en ne considérant que le log K_{ow} , la polarité réelle d'une substance ionisable dans les milieux aquatiques (pH entre 6 et 8) peut être sous estimée. En reprenant le cas de l'ibuprofène, le log K_{ow} de 3,5 laisse apparaître une molécule avec une polarité peu marquée alors qu'à pH = 7, le log D de 0,8 montre que sa présence est probablement majoritairement distribuée dans la fraction aqueuse.

3.2.2 IMPACT SUR LES METHODES ANALYTIQUES

La considération du log D a également un impact lors du développement de méthode analytique. Ainsi, le log D permet de visualiser l'état d'ionisation d'une molécule et ainsi son hydrophobicité.

3.2.2.1 PRECONCENTRATION D'ECHANTILLON

Si l'extraction est effectuée avec une phase solide hydrophobe de type C_{18} , un pH optimal d'extraction peut être déterminé lorsque les molécules d'intérêt sont dans un état neutre/protoné. C'est en effet dans cette zone de pH que ces composés auront le plus d'affinité pour la phase hydrophobe. De même, le milieu d'élution peut être choisi inversement pour réduire l'affinité avec le sorbant.

Pour des extractions avec des sorbants contenant des groupements ioniques, la zone de pH de l'échantillon sera choisie pour privilégier des interactions lorsque la molécule est sous forme ionisée et inversement pour l'élution.

Le choix du pH pour l'extraction est aussi important pour la robustesse de la méthode. Si le pH d'extraction correspond à la zone où les composés sont partiellement ionisés, un écart lors la préparation de l'échantillon (par exemple, échantillon tamponné à pH = 5,0 au lieu de pH = 6,0) aura des conséquences sur l'état d'ionisation des molécules cibles et ainsi sur leur taux de récupération.

Le choix du pH d'extraction sur une zone plateau assure ainsi une meilleure fidélité et exactitude de la méthode développée vis-à-vis des effets du pH.

3.2.2.2 SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Le même principe que pour la préparation d'échantillon s'applique pour la séparation par chromatographie en phase liquide. Les composés avec un log D faible (<0) seront peu retenus sur les colonnes apolaires de type C₁₈.

Pour les composés ayant un log D > 0 , pour la séparation de molécules ionisables par ce type de colonne, il est ainsi préférable de privilégier pour la phase mobile un pH qui correspond à la forme neutre. Ainsi, pour la séparation de composés avec des groupements acides, le pH devrait être fixé à une zone acide (gamme de pH entre 2 et 3).

Cela est d'autant plus judicieux que ce pH correspond à une zone plateau. Ainsi, une légère modification de pH lors de la préparation de la phase mobile n'entraînera pas de différence au niveau des temps de rétention et de la sélectivité de l'analyse. A l'inverse, si le pH de la phase mobile est établi à un niveau où les composés sont partiellement ionisés, une légère variation de pH lors de la préparation peut provoquer un changement d'ionisation de la molécule et ainsi un décalage des temps de rétention et de la sélectivité. Ce phénomène peut être particulièrement préjudiciable lorsque les analyses sont effectuées par spectrométrie de masse en mode MRM avec des fenêtres d'acquisition définies en fonction du temps d'analyse.

Pour l'utilisation de colonnes par interaction ionique, la zone de pH dans laquelle la molécule est sous forme ionisée sera privilégiée pour favoriser les interactions avec la phase stationnaire et ainsi la rétention sur la colonne chromatographique.

4. MOLECULES CONSIDEREES PAR CETTE ETUDE

La notion de composés très polaires dans les milieux aquatiques est habituellement définie par un $\log K_{ow} < 0$. Or, comme indiqué précédemment, il est plus pertinent de considérer le $\log D$. Le pH moyen pour les milieux aquatiques pouvant être considéré comme globalement peu différent de $pH = 7$, les molécules considérées dans cette étude seront celles présentant un **$\log D_{pH=7} < 0$** .

Au contraire du $\log K_{ow}$ qui est souvent déterminé lors d'études expérimentales, le désavantage de l'utilisation du $\log D$ réside dans le faible nombre de données obtenues expérimentalement. Ainsi, les valeurs de $\log D$ sont, dans la très grande majorité des cas, des estimations provenant de modèles avec une incertitude non spécifiée sur la valeur fournie, incertitude qui pourrait être assez importante.

Pour le $\log K_{ow}$ (ou $\log P$), de nombreuses valeurs expérimentales sont fournies par le logiciel « EPI suite » (<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>). Ce logiciel procure également des valeurs estimées pour les molécules dont la valeur expérimentale n'a pas été déterminée. Le site Chemspider (<http://www.chemspider.com/>) recense les valeurs expérimentales ou prédites par « EPI suite » ainsi que celles calculées par le logiciel ACD/labs (<http://www.acdlabs.com/>) et le logiciel ChemAxon (<http://www.chemicalize.org/>).

Pour le $\log D$, ce même site fournit les valeurs calculées par le logiciel ACD/Labs à $pH = 5,5$ et $pH = 7,4$. Un accès au site de ChemAxon permet d'obtenir les estimations du $\log D$ sur toute la gamme de pH ainsi que les valeurs de pK_a .

Les différentes valeurs de $\log P$ et de $\log D$ énumérées dans les tableaux suivants ont été calculées à l'aide de ces logiciels.

4.1 LISTE DES MOLECULES RECENSEES AVEC $\log D_{pH=7} < 0$

Une recherche bibliographique (voir liste des références) a permis de recenser des travaux s'intéressant à des polluants organiques très polaires comprenant les polluants parents ainsi que leurs produits de dégradation/métabolites. Cette recherche a été effectuée selon plusieurs sources incluant « web of knowledge » ainsi que divers documents (thèses, documents Aquaref,...). Cette liste est présentée à titre d'exemple. Elle n'est pas exhaustive et ne représente qu'une fraction des substances potentiellement présentes dans les milieux aquatiques.

Les différents polluants identifiés ont été classés en plusieurs catégories selon leur nature ionique ou non ionique et leur domaine d'application. Tous les $\log D$ exposés dans les tableaux sont exprimés pour un $pH = 7$.

4.2 COMPOSES POLAIRES NON IONIQUES

4.2.1 PESTICIDES

Certaines publications font référence à l'analyse spécifique des pesticides très polaires. Ainsi, certains travaux (Huntscha (2012), Fauvelle (2012)) ont étudié le développement de méthodes pour l'analyse de nombreux pesticides et produits de transformation dans les eaux filtrées (souterraine, surfaces et usées).

On peut distinguer de la liste le glyphosate et ses dérivés qui ont fait l'objet de nombreux travaux qui seront détaillés dans le chapitre suivant.

A noter également la présence de produits de dégradation éthylène urée, éthylène thiourée et propylène thiourée provenant des pesticides dithiocarbamates (maneb, mancozeb, zineb, metiram,...).

Les dithiocarbamates sont des substances instables dont la cinétique d'évolution ne permet pas une analyse fiable à l'heure actuelle et qui se dégradent rapidement au contact de l'eau pour former des produits de transformation très polaires (Ripollés, 2012).

Tableau 1. Liste des pesticides polaires non ioniques

	CAS	Catégorie	Etat à pH=7	Log P	Log D à pH7
2,4 D	95-75-7	Pesticide	anionique	2,50	-0,94
Alachlor ESA	142363-53-9	Pesticide PT	anionique	2,25	-0,12
Alachlor OXA	171262-17-2	Pesticides PT	anionique	3,01	-0,35
Chloridazon-méthyl-desphényl	17254-80-7	Pesticide PT	neutre	-0,55	-0,55
Dichlorprop	120-36-5	Pesticide	anionique	3,07	-0,35
Dimétachlor ESA	/	Pesticide PT	anionique	1,25	-1,12
Dimétachlor OXA	1086384-49-7	Pesticide PT	anionique	2,01	-1,36
Diméthenamide ESA	205939-58-8	Pesticide PT	anionique	1,58	-0,79
Diméthenamide OXA	380412-59-9	Pesticide PT	anionique	2,34	-1,04
MCPA	94-74-6	Pesticide	anionique	2,41	-0,87
Mécroprop	93-65-2	Pesticide	anionique	2,41	-0,87
Mésotrione	104206-82-8	Pesticide	anionique	1,09	-1,01
Métazachlor ESA	172960-62-2	Pesticide PT	anionique	-0,03	-0,74
Métazachlor OXA	/	Pesticide PT	anionique	2,05	-1,05
Métolachlor ESA	171118-09-5	Pesticide PT	anionique	2,11	-0,26
Métalochlor OXA	150019-73-3	Pesticide PT	anionique	2,88	-0,46
Propachlor ESA	123732-85-4	Pesticide PT	anionique	1,05	-1,33
Sulcotrione	99105-77-8	Pesticide	anionique	1,75	-0,34
Acétochlore -ESA	947601-84-5	Pesticide PT	anionique	1,82	-2,71
Acétochlore -OA	194992-44-4	Pesticide PT	anionique	2,30	-1,44
Chlorsulfuron	64902-72-3	Pesticide	cationique	2,14	0,14
Dicamba	1918-00-9	Pesticide	anionique	2,76	-0,39
Iodosulfuron	/	Pesticide	anionique	1,59	-1,5
Ethylèneurée (EU)	120-93-4	Pesticide PT	cationique	-1,09	-1,09
Ethylène thiourée (ETU)	96-45-7	Pesticide PT	cationique	-0,66	-0,66
Propylène thiourée (PTU)	2122-19-2	Pesticide PT	cationique	-0,07	-0,07
Glyphosate	1071-83-6	pesticide	cationique	-4,47	-6,75
AMPA	1066-51-9	Pesticide PT	cationique	-2,76	-6,11
Glufosinate	51276-47-2	pesticide	cationique	-3,96	-4,25
Ométhoate	113-02-6	pesticide	cationique	0,06	-0,93
Monocrotophos (crisodin)	6923-22-4	pesticides	cationique	-0,45	-0,45
Cyromazine	266-257-8	pesticides	cationique	-0,04	-0,05
Diméthoate	60-51-5	pesticides	cationique	0,48	0,48
Imidaclopride	138261-41-3	pesticides	cationique	0,2	0,2
Pymetrozine	123312-89-0	pesticides	cationique	-0,51	-0,51

PT : produit de transformation

4.2.2 COMPOSES PHARMACEUTIQUES

Certains résidus médicamenteux et par conséquent leurs métabolites peuvent également comporter de nombreux groupes polaires (acides, amines,...). Parmi ceux-ci, des antibiotiques peuvent également être distingués, c'est le cas notamment des sulfonamides et les tétracyclines.

Tableau 2. Liste des résidus médicamenteux polaires

	CAS	Catégorie	Etat à pH=7	Log P	Log D à pH=7
Aténolol	29122-68-7	Pharmaceutique	cationique	0,43	-2,14
Acide Aténolol (acide métropolol)	56392-14-4	Pharmaceutique PT	zwitterion	-4,17	-4,17
Aténolol-désisopropyl	81346-71-6	Pharmaceutique PT	cationique	-0,78	-3,03
Eprosartan	133040-01-4	Pharmaceutique	anionique	5,14	-0,28
Métropolol	37350-58-6	Pharmaceutique	cationique	1,76	-0,81
N-Desméthylvenlafaxine	149289-30-5	Pharmaceutique PT	cationique	2,36	-0,30
N,N-didesméthylvenlafaxine	93413-77-5	Pharmaceutique PT	cationique	1,92	-0,41
N,O-didesméthylvenlafaxine	135308-74-6	Pharmaceutique PT	cationique	1,72	-0,44
Acide ritalinic	19395-41-6	Pharmaceutique PT	zwitterion	-0,49	-0,49
Sotalol	3930-20-9	Pharmaceutique	cationique	-0,41	-2,48
Acide valsartan	164265-78-5	Pharmaceutique PT	anionique	2,30	-0,58
Sulfamonomethoxine	1220-83-3	Pharmaceutique	cationique	0,70	0,70
Sulfadimethoxine	122-11-2	Pharmaceutique	cationique	1,63	1,63
Sulfamethoxazole	723-46-6	Pharmaceutique	cationique	0,89	0,89
Sulfathiazole	72-14-0	Pharmaceutique	cationique	0,72	0,72
Sulfachloropyridazine	80-32-0	Pharmaceutique	cationique	0,31	0,31
Sulfamerazine	127-79-7	Pharmaceutique	cationique	0,21	0,21
Sulfamethazine	57-68-1	Pharmaceutique	cationique	0,89	0,89
Oxytétracycline	2058-46-0	Pharmaceutique	neutre	-3,60	-3,60
Minocycline	13614-98-7	Pharmaceutique	neutre	-1,22	-1,22
Doxycycline	24390-14-5	Pharmaceutique	neutre	-1,90	-1,90
Meclocycline	73816-42-9	Pharmaceutique	neutre	-1,36	-1,36
Chlortétracycline	64-72-2	Pharmaceutique	neutre	-3,60	-3,60
Democlocycline	64-73-3	Pharmaceutique	neutre	-3,60	-4,10
Tétracycline	60-54-8	Pharmaceutique	neutre	-1,30	-4,31
Acide salicylique	69-72-7	Pharmaceutique	anionique	2,06	-1,09
Acide acétylsalicylique	50-78-2	Pharmaceutique	anionique	1,19	-1,89
Acide clofibrigue	882-09-7	Pharmaceutique	anionique	2,72	-0,90
Thimethoprim	738-70-5	Pharmaceutique	cationique	0,76	0,67
Acétozolamide	59-66-5	Pharmaceutique	anionique	-0,26	-0,69
cyclophosphamide	50-18-0	Pharmaceutique	cationique	0,23	0,23

4.2.3 SOUS-PRODUITS DE DESINFECTION

On retrouve dans cette catégorie principalement les acides haloacétiques (AHA) qui sont des composés générés par l'utilisation de produits de désinfection.

Tableau 3. Liste des acides haloacétiques

	CAS	Catégorie	Etat à pH=7	Log P	Log D à pH=7
Acide monochloroacétique (MCAA)	79-11-8	AHA	anionique	-0,05	-3,76
Acide dichloroacétique (DCAA)	79-43-6	AHA	anionique	0,54	-3,21
Acide trichloroacétique (TCAA)	76-03-9	AHA	anionique	1,67	-2,08
Acide monobromoacétique (MBAA)	79-08-3	AHA	anionique	0,51	-3,19
Acide dibromoacétique (DBAA)	631-64-1	AHA	anionique	1,65	-2,10

4.2.4 AUTRES COMPOSES

Tableau 4. Liste recensant d'autres composés polaires

	CAS	Catégorie	Etat à pH=7	Log P	Log D à pH=7
Sucralose	56038-13-2	Edulcorant artificiel	neutre	-0,47	-0,47
Épichlorohydrine	106-89-8	Précurseur de synthèse	neutre	0,45	0,45

4.3 COMPOSES IONIQUES

Ce sont des composés qui se présentent sous formes de sels organiques avec des points d'ébullition très bas. Ces composés sont extrêmement solubles dans l'eau et peuvent potentiellement être retrouvés dans les milieux aquatiques ce qui est source d'interrogation sur leurs effets potentiels.

Ils sont utilisés dans divers secteurs industriels : l'énergie, la biotechnologie, la chimie, les revêtements, par exemple, et leur production est en progression constante.

Dans les milieux aquatiques, ce sont les ammoniums quaternaires qui ont été le plus étudiés. On distingue ainsi la famille des quats qui est utilisée en temps qu'herbicide.

Tableau 5 : Liste des pesticides « ammonium quaternaire »

	CAS	Catégorie	Etat à pH=7	Log kow	Log D
Paraquat	4685-14-7	pesticide	cationique	-4,58	-4,58
Diquat	2764-72-9	pesticide	cationique	-1,87	-1,87
Difenzoquat	49866-87-7	pesticide	cationique	0,83	0,83
Chlormequat	7003-89-6	pesticide	cationique	-2,74	-2,74
Mepiquat	15302-91-7	pesticide	cationique	-2,47	-2,47

La plupart des liquides ioniques, tels que, entre autres, de type benzylammonium (ADBAC), alkyldiméthylbenzylammonium (n=12, 14, 16, 18), didécyldiméthylammonium, dodécylbenzylammonium,..., sont composés d'une longue chaîne carbonée et/ou de plusieurs cycles benzéniques.

Ainsi, leur caractère ionique est largement compensé par la partie hydrophobe ce qui rend ces molécules analysables par des procédés de phase inverse.

D'autres classes de liquides ioniques non recherchées et qui pourraient être retrouvées dans les milieux aquatiques peuvent être distinguées (Pham (2009)):

- De type cationique, amine cyclique (imidazolium, pyridinium, pyrrolidinium, morpholinium, piperidinium, quinolinium) ou phosphonium quaternaire
- De type anionique, amide ou imide (dicyanamide, bis(trifluorométhylsulfonyl)imide)

5. CONSIDERATIONS SUR LE MATERIEL ANALYTIQUE POUR L'ANALYSE DE COMPOSES POLAIRES

5.1 PRECONCENTRATION D'ÉCHANTILLON

Les composés polaires sont principalement présents dans la fraction aqueuse des milieux aquatiques. Leur nature polaire leur confère une importante solubilité. Ainsi, il peut être particulièrement difficile de parvenir à une préconcentration sur un support solide.

La méthode d'analyse la plus représentée de ces composés est l'injection directe de l'échantillon dans le système analytique. En théorie, aucune perte n'intervient entre l'échantillon et son transfert vers le détecteur. Ainsi, ce mode assure que tous les composés polaires sont bien pris en compte (tous les composés sont injectés mais cela n'assure pas cependant qu'ils puissent être tous détectés). Ce mode présente cependant plusieurs inconvénients. Toute la matrice est injectée ce qui peut entraîner une pollution plus importante des différentes parties de l'instrument analytique (injecteur, colonne, détection) et des effets matriciels.

Ces polluants sont généralement recherchés à un niveau de traces. Ainsi, la sensibilité actuelle des détecteurs, notamment les spectromètres de masse couplés à la chromatographie en phase liquide, ne permettent généralement pas d'atteindre les niveaux du ng/L sans étape de préconcentration d'échantillon. Les technologies et le matériel liés aux détecteurs évoluent rapidement et ils permettent d'atteindre des niveaux de sensibilité toujours plus bas.

Cependant, en attendant une amélioration de la sensibilité instrumentale, l'injection directe est pour l'instant limitée à quelques applications visant des limites de quantifications élevées ($\sim\mu\text{g/L}$).

Du fait de leur structure moléculaire, certains composés très polaires, comme les tétracyclines ou le glyphosate, peuvent former des chélates avec les ions métalliques ou métalloïdes. Ainsi, des méthodes analytiques spécifiques qui nécessitent l'emploi d'agent de chélation (de type acide éthylène diamine tétraacétique : EDTA) visant à neutraliser la présence de métaux peuvent être nécessaires (Anderson (2005), Skraskova (2013)).

La préconcentration des micropolluants présents dans la phase aqueuse de l'échantillon est en grande majorité effectuée par extraction sur phase solide (SPE).

Les cartouches SPE utilisent traditionnellement des greffages similaires à ceux employés dans les colonnes chromatographiques de préparation d'échantillon et étaient basées principalement sur des groupements greffés sur une base de silice. Ainsi, les principaux groupements disponibles étaient les gels de silice, le florisil® ou l'alumine pour les phases polaires et les groupements C_{18} , C_8 ou phényle pour les phases inverses. Pour les composés ioniques, des groupements à base d'échange d'ions directement greffés sur la silice étaient également disponibles.

Ces matériaux ont été progressivement remplacés dans les habitudes des utilisateurs par des supports à base de polymères regroupant des fonctions similaires. Les polymères sont en effet plus résistants que la silice notamment sur la gamme d'utilisation de pH. L'absence de silice permet également d'éviter les interférences provenant des groupements silanols.

La plupart des analyses de phase inverse, notamment les analyses en multirésidus, fait désormais usage de cartouches polymériques possédant des propriétés à la fois lipophiles et hydrophiles.

Les cartouches les plus utilisées sont de type Oasis[®] HLB (Waters) ou Strata[™]-X (Phenomenex). Ces cartouches sont composées de greffons benzéniques ce qui permet de bénéficier d'interaction π - π . De plus, les interactions lipophiles (groupe divinylbenzène) et hydrophile (N-vinyl-pyrrolidone) sont adaptées à l'extraction d'une gamme de composés allant de relativement hydrophobes à semi-polaires mais pas pour des substances très polaires.

Ces types de cartouches sont adaptés pour l'analyse de composés avec $\log K_{ow} > 0$. Pour des composés plus polaires, d'autres types d'interactions doivent être exploitées.

Des modifications de ces polymères ont ainsi produit des phases de type « mix mode », qui combinent l'utilisation de phase inverse et d'échange d'ion en une seule cartouche

Elles sont composées de parties hydrophobes en ayant conservé la partie benzénique mais la partie hydrophile a été remplacée par des groupements spécifiques. Ainsi, 4 catégories peuvent être distinguées (Figure 3 et Figure 4) :

- Echange d'anions fort (ex : Strata[™] X-A pour Phenomenex et Oasis[®] MAX pour Waters,...). Un groupement ammonium quaternaire permet d'interagir avec les acides faibles ($pK_a > 2$).
- Echange d'anions faibles (ex : Strata[™] X-AW et Oasis[®] WAX,...). Un groupement aminé permet d'obtenir une rétention des composés avec des groupements acides avec un $pK_a < 5$. Ce type de cartouche est à réserver aux échanges d'anions forts pour certaines applications qui peuvent provoquer des retentions irréversibles (difficulté d'éluer des composés piégés sur le support).
- Echange de cation fort (ex : Strata[™] X-C et Oasis[®] MCX,...). Un groupement d'acide sulfonique permet de piéger les groupements basiques avec un $pK_a < 0,5$.
- Echange d'anion faibles (ex : Strata[™] X-CW et Oasis[®] WCX,...). Composé d'un groupement acide carboxylique, cette phase est adaptée aux composés basiques avec un $pK_a > 8$.

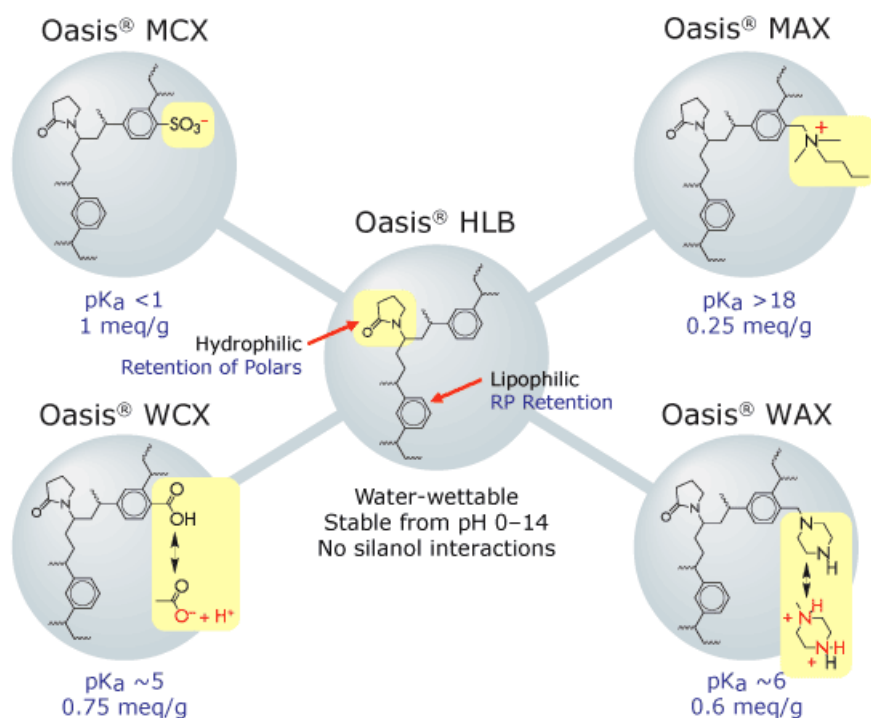


Figure 3 : Structure des phases mix mode de la gamme Oasis® HLB (Waters)

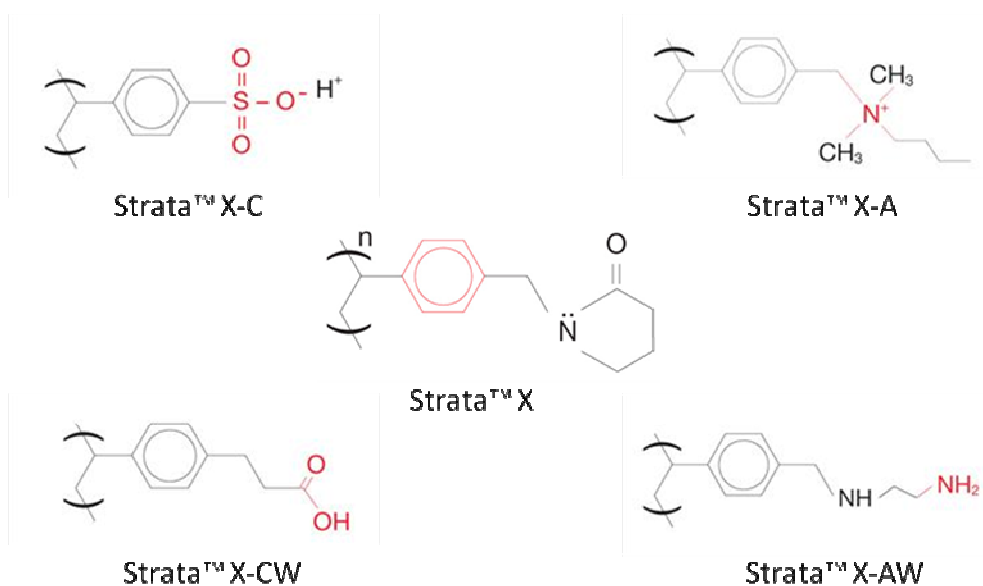


Figure 4 : Structure des phases mix mode de la gamme Strata™ X (Phenomenex)

Tous ces types de phases sont disponibles en format cartouche (extraction SPE) mais également en format colonne pour une extraction en ligne. Des supports imprégnés de groupements ioniques ont également été testés pour des études d'échantillonnage passifs (Fauverge (2012), Vermeirssen (2013)).

Des phases modifiées de type polymères à empreintes moléculaires (MIP) peuvent également être mises en œuvre. Les MIPs sont des matériaux synthétiques renfermant des cavités spécifiques à l'image d'une molécule empreinte et de ses analogues structuraux.

Ils sont obtenus par introduction d'une molécule modèle (empreinte ou template) dans le solvant en présence de monomères choisis pour leur grande affinité avec la molécule empreinte, d'un agent réticulant et d'un initiateur de polymérisation.

Ainsi, l'affinité entre les polymères et leurs molécules cibles est la même que l'affinité observée entre anticorps et antigènes, ou entre enzymes et substrats dans les systèmes biologiques.

Ce matériau est donc attractif quant à sa capacité de sélectivité et sa capacité de concentration des composés dédiés. Il peut ainsi être décliné en support de rétention dans les cartouches de SPE. De nombreuses études ont été consacrées à la mesure de polluants environnementaux (Pichon (2008)). Des travaux ont également été menés sur le développement de ces matériaux pour les composés polaires notamment les composés présentant des groupes anioniques (Wu (2012)). Il doit être toutefois signalé que ces matériaux ne sont pas (encore) utilisés en application de routine car ils sont peu disponibles commercialement pour l'instant.

D'autres types d'extraction comme les immunosorbents, l'extraction par dispersion liquide, l'extraction sur barreau absorbants (SBSE) peuvent également être envisagés. Ces techniques sont cependant actuellement moins utilisées pour l'analyse des composés polaires.

5.2 SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

L'analyse par chromatographie liquide s'effectue dans une très grande majorité des cas à l'aide de phases stationnaires hydrophobes de type C₁₈, C₈, phényl,... Ces types de phase stationnaire sont plus pratiques à utiliser car ils nécessitent des phases mobiles composées de solvants peu toxiques (acétonitrile ou méthanol) et d'eau, et sont compatibles avec une détection par spectrométrie de masse. De nombreux fabricants proposent ce type de phase ce qui confère une très grande diversité de sélectivité entre toutes les colonnes disponibles. Ainsi, sur le principe, cela implique qu'il est possible de séparer chromatographiquement n'importe quel composé l'un de l'autre (hors composés chiraux).

Bien que certaines phases inverses contenant des groupements polaires aient été développées, les composés les plus polaires ne sont pas retenus et éluent tous dans le volume mort de la colonne. Dans ces conditions, la détection de ces composés et leur quantification devient difficile car une grande partie de la matrice est également retrouvée dans le volume mort, ce qui provoque des interférences très importantes au niveau de la détection.

Des additifs, menant à la formation de paires d'ions, peuvent être ajoutés à la phase mobile pour former avec les analytes ioniques des espèces neutres compatibles avec une analyse par phase inverse. La méthode par paires d'ions peut cependant être limitée par des problèmes de robustesse (stabilité de la paire formée sur la durée de l'analyse) et d'interférences, notamment si on utilise une détection par spectrométrie de masse.

L'analyse chromatographique des composés polaires peut s'effectuer en phase normale avec une phase stationnaire polaire (silice, amino,...) et une phase mobile apolaire (hexane, toluène, ...). Cependant, il faut employer une quantité assez importante de solvants considérés comme toxiques et la comptabilité avec la spectrométrie de masse n'est pas acquise car l'ionisation des molécules avec ces solvants n'est pas aussi performante qu'avec des solvants plus polaires.

Depuis quelques années, des alternatives à la phase normale ont ainsi été développées avec l'émergence de phases de type HILIC (Hydrophilic interaction chromatography) ou mix mode.

5.2.1 SEPARATION PAR HILIC

Le mode de séparation HILIC permet d'obtenir le même type de rétention que pour les phases normales mais emploie les mêmes phases mobiles que celles utilisées en phase inverse.

5 classes de HILIC peuvent être distinguées :

- de la silice non greffée (la plus courante) ou des phases diols,
- des phases greffées avec des groupements amino ou anioniques,
- des phases avec un greffage amide,
- des phases greffées avec un groupement cationique,
- des phases en mode zwitterionique.

Chaque fabricant propose des phases HILIC. Les variations entre les colonnes HILIC sont cependant plus grande que pour des phases de type C_{18} car la variété de silice peut être significativement différente entre les divers fabricants ce qui va entraîner des mécanismes de rétention sensiblement différents. Certains fabricants proposent des HILIC contenant des phases avec des ponts diol afin de minimiser l'influence des groupements silanols.

De nombreux autres types de colonne HILIC avec greffage ont été développées exploitant différentes interactions aussi bien polaires, ioniques (cation, anion ou les 2), stériques, avec ou sans présence de groupement hydrophobe (Figure 5). Ainsi, ce choix très important de phase stationnaire implique que théoriquement tout composé très polaire peut être retenu sur une colonne de type HILIC.

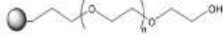
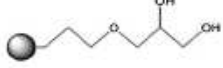
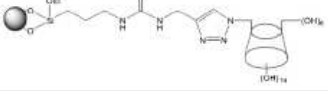
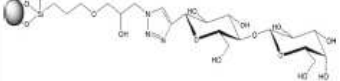
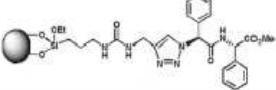
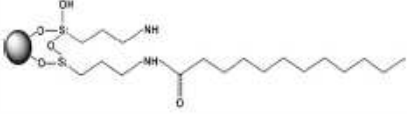
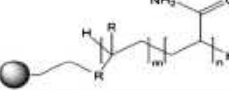
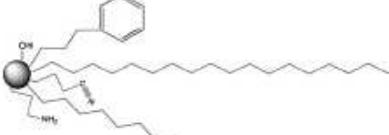
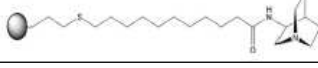
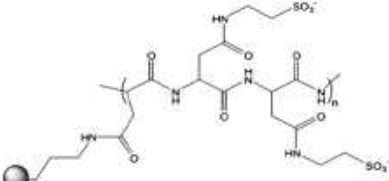
Packing materials	Structure of stationary phase	Packing materials	Structure of stationary phase
underivatized silica stationary phases that contain functional groups such as siloxanes, silanols with (or without) a small quantity of metals		polyethylene glycol/silica (HS PEG)	
DIOL bonded phases		"click" β -cyclodextrin	
ciano bonded phases		"click" saccharides ("click" maltose)	
amino bonded phases		"click" dipeptide	
alkylamide		zwitterionic sulfobetaine bonded phases (ZIC-HILIC)	
amide bonded phases		cationic exchangers bonded phases	
mix-mode		mix-mode RP/anionic exchangers bonded phases	
polymeric structures of poly(succinimide) derivatives			

Figure 5. Différentes types de phase stationnaire HILIC (Extrait de Buszewski (2012))

Le mode HILIC suppose que les composés polaires vont interagir, selon des mécanismes complexes (liaison hydrogène, interactions dipôle-dipôle, interactions électrostatiques,...), avec la colonne polaire pour être retenus.

Pour ce faire, la phase mobile va être majoritairement composée de solvant (préférentiellement de l'acétonitrile) et d'un peu d'eau avec du tampon (ammonium acétate ou formate) pour fixer le pH et la force ionique. La quantité d'eau tamponnée peut être graduellement augmentée afin d'éluer les composés les plus fortement retenus.

L'utilisation d'un pourcentage fort de solvant favorise aussi l'ionisation et la sensibilité de la détection par spectrométrie de masse (Guo (2005)).

De nombreuses autres phases « spéciales » incluant des groupements anioniques, cationiques ou les deux en mix mode, sont disponibles auprès de certains constructeurs. Parmi celles-ci, il peut être cité :

- Les colonnes Obelisc™ R et N (Sielc)
- Les colonnes Primesep™ (Sielc)
- Colonnes mix mode Acclaim® WAX, WCX, et Trinity (Dionex)
- Colonnes Capcell Pack® CR (Shimadzu)
- Colonnes Scherzo® (Imtakt)

Ces colonnes offrent une variété de greffage de groupements ioniques qui peuvent apporter des interactions et des sélectivités uniques. Leur application est cependant difficilement prévisible pour des problématiques spécifiques. Ainsi, il est préférable de s'adresser directement au fabricant afin de pouvoir obtenir plus d'informations sur la compatibilité de ces colonnes pour une étude précise.

Limitations de l'usage de colonne HILIC.

Si l'analyse HILIC peut permettre de retenir les composés très polaires, c'est au détriment des composés apolaires qui ne sont pas retenus sur ce type de colonne. En effet, les colonnes HILIC opérant avec des pourcentages d'acétonitrile forts, les composés apolaires sont entraînés par la phase mobile et non retenus. Un exemple de gamme d'application des HILIC est indiqué ci-dessous :

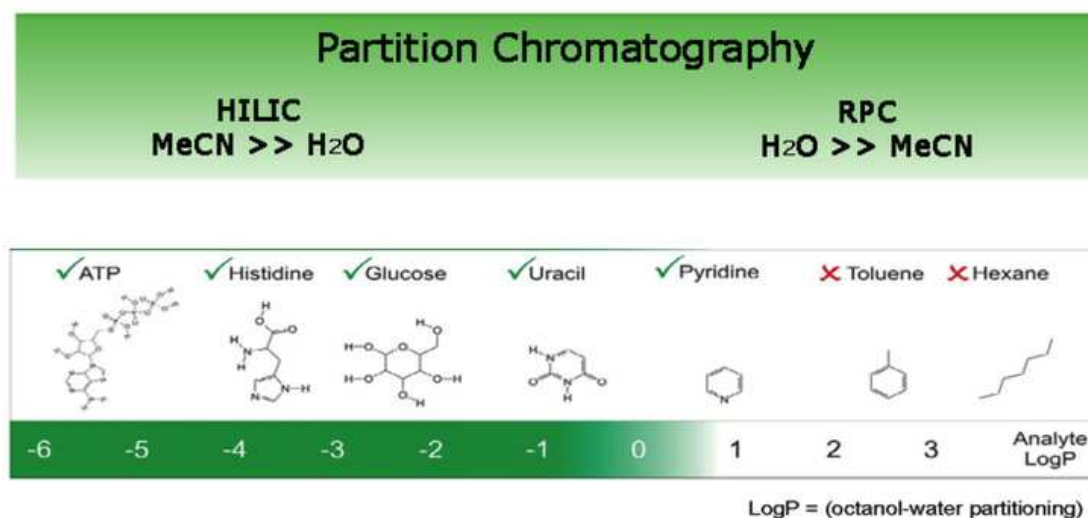


Figure 6. Gamme d'application des HILIC (source Wikipedia)

Ainsi, les colonnes HILIC peuvent être appliquées pour l'analyse de familles de composés polaires possédant des caractéristiques physico-chimiques proches mais leur application semble limitée pour l'analyse simultanée de composés apolaires et polaires, notamment en analyse multirésidus. Les colonnes mix mode pourraient éventuellement être employées dans ce cadre mais cela reste à démontrer.

Une revue a récemment été consacrée aux travaux de recherche ayant fait usage de colonnes HILIC avec une partie consacrée à l'analyse des composés polaires dans des applications environnementales dont l'analyse des eaux (van Nuijs (2011)).

5.2.2 LA CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS (CHROMATOGRAPHIE IONIQUE, CI)

La **chromatographie d'échange d'ions** est un type de chromatographie en phase liquide. Elle repose sur la capacité à faire interagir une substance chargée avec une phase stationnaire également chargée.

La phase mobile est généralement constituée d'un éluant aqueux comportant un acide ou une base forte de façon à pouvoir maintenir dans un état ionisé les substances d'intérêt.

A la différence des colonnes utilisées en chromatographie « classique », les colonnes de chromatographie ionique sont à base de phase polymérique (styrène et divinylbenzène) afin de pouvoir résister aux pH acides ou basiques extrêmes utilisées pour les phases mobiles. Le greffage de groupements anioniques ou cationiques permet d'obtenir des colonnes avec des sélectivités et des interactions spécifiques.

Ainsi, des colonnes d'échanges d'anions sont obtenues avec des groupes d'alkyle ammonium quaternaire. Les colonnes à base d'échanges de cations sont constituées de groupes sulfonates, carboxylates ou phosphonates.

Les phases mobiles utilisées sont généralement exclusivement aqueuses. Des sels de différentes natures et différentes concentrations sont ajoutés afin de définir la force éluante de la phase mobile.

Pour un éluant anionique, l'ajout de NaOH, de NaHCO₃ ou Na₂CO₃ peut être employé. L'acide métasulfonique est couramment utilisé en tant qu'éluant cationique. Le choix de l'éluant dépend de la force ionique nécessaire suivant la nature des composés visés. Elle dépend également du type de détection utilisée.

L'élution peut s'effectuer en mode isocratique ou en mode gradient en faisant varier la concentration de la force éluante.

La détection peut être effectuée selon 3 principes :

- Electrochimie (conductimétrie, amérométrie)
- Spectrophotométrie UV-visible
- Spectrométrie de masse.

Pour des détections de type conductimétrie, l'utilisation d'un suppresseur d'ionisation en sortie de colonne est indispensable afin d'améliorer la sensibilité analytique. Le couplage avec la spectrométrie de masse s'effectue avec les mêmes interfaces (électrospray particulièrement) que celles utilisées avec de la chromatographie liquide. L'ajout de solvant en post-colonne est parfois nécessaire afin d'améliorer l'ionisation des composés ciblés. Comme pour la chromatographie liquide, ce type de détection est désormais privilégié pour la mesure de traces car il apporte plus de sensibilité que les autres types de détection.

Ce type d'analyse semble seulement destiné à la mesure de composés très polaires qui présentent une activité ionique (ou qui peuvent être ionisés sous l'effet de pH extrêmes comme le cas des sucres avec un pH très basique). Elle ne peut donc constituer un outil de screening. Elle nécessite également un matériel spécifique (pompe en particulier) afin de pouvoir résister à la corrosion provoquée par l'utilisation de phases mobiles très acides ou basiques.

La hauteur de plateau des pics est généralement plus élevée (les pics sont plus larges) en CI comparé aux analyses HPLC ce qui peut entraîner plus de problèmes d'interférences lors de la détection et moins de sensibilité.

6. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANALYSE DE CERTAINES FAMILLES DE COMPOSES POLAIRES

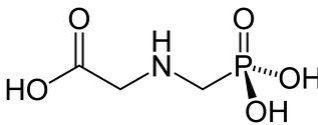
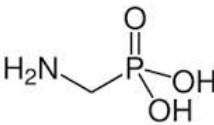
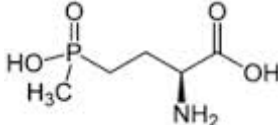
Afin d'obtenir un aperçu des techniques employées par les laboratoires pour la mesure des composés polaires, 3 familles de composés représentatives des composés polaires ont été particulièrement étudiées:

- le glyphosate et ses dérivés,
- les quats,
- les acides haloacétiques.

6.1 ANALYSE DU GLYPHOSATE ET SES DERIVES

Le glyphosate, son métabolite l'AMPA ainsi que le gluphosinate sont des composés très polaires caractérisés par des groupements acides et basiques.

Tableau 6 Structure moléculaire et masse molaire du glyphosate, AMPA et gluphosinate

Glyphosate	AMPA	Gluphosinate
		
M= 169 g/mol	M=111 g/mol	M= 181 g/mol
log D _{pH=7} = -6,75	log D _{pH=7} = -6,11	log D _{pH=7} = -4,25

6.1.1 ETAT DE L'ART

Les travaux les plus anciens mentionnent des analyses en chromatographie ionique ou par échange d'ions. Une méthode de référence établie au début des années 90, la méthode US EPA 547 reprise par le fascicule de documentation AFNOR FD T 90-187-1, visait d'ailleurs à utiliser une colonne formée de résine échangeuse de cations avec une dérivation post colonne. Les réactions post-colonne sont basées sur l'oxydation du glyphosate en glycine, laquelle réagit ensuite avec l'o-phthalaldéhyde pour former un isoindole que l'on mesure par fluorescence. Le seuil de quantification pour cette méthode est de 0,1 µg/L dans les eaux naturelles et de consommation.

Cette méthode, bien qu'efficace, nécessite un appareillage spécifique pour la dérivation post colonne ce qui constitue une limite à son application généralisée.

La norme NF ISO 21458 est consacrée à la mesure du glyphosate et de l'AMPA dans l'eau potable, l'eau souterraine et l'eau de surface. La limite de quantification est d'environ 0,05 µg/L. Son principe repose sur une dérivation au FMOC (Fluorenylmethylchloroformate) puis une détection par fluorescence. Cependant, le manque de spécificité de la détection envers les interférents limite le champ d'application de cette méthode.

Les méthodes d'analyse de composés organiques par chromatographie liquide qui emploient la spectrométrie de masse en tandem permettent généralement de bénéficier d'une meilleure sélectivité envers la matrice entraînant également une meilleure sensibilité.

Le glyphosate possède un groupement acide et un groupement basique ce qui confère une bonne ionisation et une bonne sensibilité par une telle détection.

Leur polarité entraîne une contrainte importante au niveau de l'analyse chromatographique. En effet, ces composés ne sont pas retenus par des colonnes de phase inverse. Ainsi, la plupart des analyses de glyphosate ont recours à une étape de dérivation, généralement effectuée avec du FMOC. L'étape de dérivation effectuée sur le groupement basique permet d'ajouter un groupement hydrophobe qui réduit la polarité et augmente les interactions avec la colonne chromatographique de phase inverse.

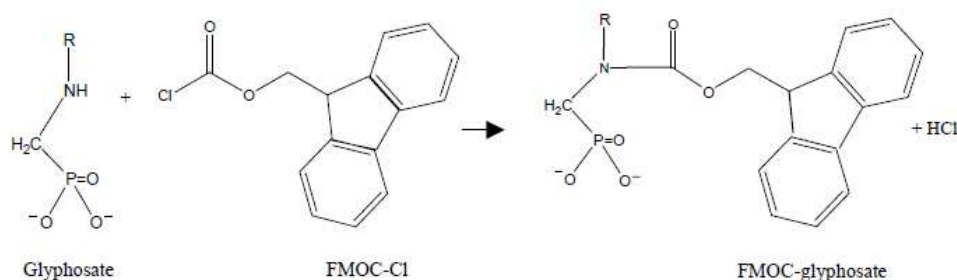


Figure 7. Réaction des composés de type glyphosate avec le FMOC (extrait de Nedelkoska (2004))

Cette étape est cependant contraignante car elle requiert d'ajuster l'échantillon à un pH basique avant l'étape de dérivation puis de procéder à des étapes de purification afin d'éliminer le FMOC en excès ou les composés interférents ayant pu réagir avec le FMOC. L'acidification du milieu (avant dérivation) et/ou un ajout d'agent de chélation (EDTA par exemple) pour libérer le glyphosate associé à des éléments métalliques est généralement également employé (Hanke (2008), Ibanez (2005), Ibanez (2006)).

Enfin, une étape de SPE peut être appliquée afin d'enlever d'autres interférents comme dans le cas de la future norme NF ISO/FDIS 16308. La norme NF ISO 16308 permet une limite de quantification de 0,030 µg/L.

Afin d'éviter les fortes interactions avec des groupements silanols, les analyses chromatographiques sont effectuées avec des pH basiques (~9) et nécessitent donc une colonne de phase inverse capable de résister à cette condition expérimentale.

6.1.2 ANALYSE SANS ETAPE DE DERIVATION

L'analyse du glyphosate sans étape de dérivation peut ainsi réduire le nombre d'étape analytique et les contraintes liées à celle-ci.

Préparation d'échantillon

La plupart des différents travaux liés à l'analyse sans dérivation du glyphosate mentionne l'analyse directe de l'échantillon sans étape de préconcentration (voir Tableau 7). Si cette approche permet d'éviter des pertes qui peuvent intervenir lors de cette étape, des limites de quantification élevées (~ µg/L) sont obtenues quel que soit le type de détecteur testé (ICPMS/ ampérométrie/ MS).

Ainsi, une étape de préconcentration semble indispensable pour atteindre des limites de quantification égales ou inférieures à 0,1 µg/L (seuil que l'on peut considérer comme référence car réglementaire dans les eaux de boissons).

Dans un article de Patsias (2001), le glyphosate et l'AMPA ont été extraits par SPE en ligne en employant une cartouche d'échanges d'anions.

Plusieurs types de cartouches ont été testés. Le cartouche PRP-X100 a été retenue car elle permettait d'obtenir les meilleures performances en terme de taux de récupération pour les 2 composés visés. Une étape de purification a été ajoutée avec des cartouches SPE en polypropylène car l'analyse des échantillons réels (eau de surface) présentait des taux de récupération faibles comparés à ceux obtenus avec de l'eau distillée. L'analyse était effectuée avec une colonne par échange de cations et détection par fluorescence après dérivation post-colonne. Au final, des taux de récupération de 84 et 15 % ont été respectivement obtenus pour le glyphosate et l'AMPA avec des limites de détection de 0,02 et 0,1 µg/L.

Séparation chromatographique et détection

L'emploi de phase inverse n'est pas adapté pour leur rétention. Ainsi, si Sadi *et al.* (2004) ont utilisé une colonne de type C₈ pour l'analyse du glyphosate, de l'AMPA et du gluphosinate., du tétrabutylammonium a été ajouté pour obtenir des paires d'ions et favoriser les interactions avec la phase hydrophobe. La détection est effectuée par ICPMS au travers de la détection sur le phosphore. Les auteurs reportent l'atteinte de limite de détection instrumentale de 25 ng/L avec cette configuration.

La chromatographie ionique (échange d'ion) peut être employée comme dans la méthode US EPA 547 basée sur une colonne d'échange de cations (avec dérivation post colonne).

Guo *et al.* (2005) ont employé un polymère échangeur d'anion (Dionex ION PAc AS16) avec une phase mobile à base d'acide citrique pour la détection du glyphosate dans les eaux de boisson. Le glyphosate était détecté par ICP-MS via le groupement phosphore et n'avait donc pas besoin d'être dérivé. Des limites de détection de 0,7 µg/L ont été obtenues (aucune préconcentration n'a été effectuée dans cette étude). Cette méthode est spécifique à la détection du phosphore, ainsi la méthode chromatographique doit être particulière élaborée afin de ne pas subir d'interférences d'autres composés phosphorés provenant de la matrice. De plus, elle nécessite un couplage LC-ICPMS peu courant dans les laboratoires de routine.

Une méthode par échange d'anions (Dimitrakopoulos (2010)) avec KOH comme phase mobile a également été utilisée couplée à une détection par ampérométrie. Sur des échantillons d'eau de boisson, des problèmes d'interférences dus au manque de sélectivité de la méthode ont été observés.

La chromatographie ionique a également été couplée à la spectrométrie de masse (Bauer (1999)). La séparation était également effectuée par échange d'anions. Un suppresseur a été ajouté afin de réduire les interférences ioniques avant l'étape de détection et accroître la sensibilité.

Les analyses de glyphosate peuvent également être effectuées avec des systèmes de chromatographie liquide « classique » sans étape de dérivation avec des colonnes de type mixed mode ou HILIC. Ainsi, Hao *et al.* (2011) ont étudié l'analyse du glyphosate avec une colonne mix-mode WAX (phase inverse-échange d'anions). Des phases mobiles identiques à celles utilisées en phase inverse (méthanol/eau avec ammonium acétate 30 mM) sont employées. Ainsi, par rapport à la chromatographie ionique qui emploie uniquement des phases aqueuses, ces colonnes permettent d'introduire du solvant favorable à l'ionisation des composés et leur analyse par spectrométrie de masse. La détection était réalisée par spectrométrie de masse en tandem. Pour l'étude d'eau de rivière, l'injection directe a permis d'obtenir des limites de quantification de l'ordre de 1,0 µg/L.

Le glyphosate et l'AMPA sont également fréquemment recherchés dans les matrices alimentaires. Ainsi, une publication (Chen (2013)) mentionne l'analyse directe du glyphosate dans les fruits et légumes effectuée avec une colonne (Asahipak NH2P-50 4E (Shodex)) opérée en mix mode HILIC/WAX avec une phase mobile basique constituée d'acétonitrile et d'eau avec 0,1 mol/L d'ammonium hydroxyde.

L'utilisation de cette phase mobile permettait d'obtenir de meilleure sensibilité en mode négatif par LC/ESI-MS/MS. Aucune préconcentration ou clean up n'étaient effectuée mais la méthode chromatographique avait été développée pour obtenir un temps de rétention important (35 min) ce qui permettait de minimiser les effets d'élution simultanée avec la matrice et de réduire sensiblement les effets d'extinction de signal lors de la détection.

Toujours dans le domaine de l'alimentaire, l'organisme européen en charge de produire des méthodes de références, EURL (EU reference laboratories for residues and pesticides), a édité un guide de méthodes analytiques pour la détermination rapide de pesticides très polaires et analysés par LC/MS/MS (EURL-SRM (2012)).

Des méthodes d'analyse sans dérivation pour le glyphosate, le gluphosinate et leur métabolite (AMPA, MPPA, N-Acetyl-glufosinate) sont proposées. Elles sont basées sur de l'échange d'anions avec une phase mobile contenant de l'acide citrique ajustée à pH = 11 avec de la diméthylamine. L'utilisation de colonne Hypercarb est également proposée avec des phases mobiles contenant de l'eau et du méthanol acidifiés avec de l'acide acétique (1 %).

Tableau 7. Principales voies d'analyses recensées dans la littérature pour l'analyse du glyphosate et ses dérivés

Source	Matrice étudiée, volume échantillon	Méthode extraction	Méthode d'analyse par LC	Méthode de détection	LOQ	Remarques
Bauer (1999)	Eau de rivière	/	chromatographie ionique (échange d'anion)	MS (ESI)	1 µg/L	Ajout d'un module de suppression pour améliorer la sensibilité
Patsias (2001)	Eau de rivière	SPE en ligne échange d'anion PRP-X100 Clean up : SPE polypropylene	échange de cation. Dérivation post colonne.	Fluorescence	0,1 µg/L	
Sadi (2004)	Eau de rivière	/	C ₈ avec paire d'ion par tétrabutylammonium	ICP-MS	~25 ng/L (LOD instr.)	
Guo (2005)	Eau de boisson	/	chromatographie ionique (échange d'anion)	ICP-MS	0,7 µg/L	
Dimitrakopoulos (2010)	Eau de boisson	/	chromatographie ionique (échange d'anion)	Ampérométrie	0,5 µg/L	
Hoa (2011)	Eau de rivière	/	colonne mix mode (WAX)	MS/MS (ESI)	1µg/L	
Chen (2013)	Fruits et légumes	/	colonne mix mode (HILIC/Wax)	MS/MS (ESI)	/	Long temps de rétention pour éviter effets de matrices

Instr.= instrumental

Conclusion sur l'analyse du glyphosate

La plupart des méthodes d'analyse sans étape de dérivation du glyphosate mettent en œuvre une injection directe de l'échantillon. Cependant, ces méthodes ne permettent pas d'atteindre des limites de quantification basses (0,1 µg/l ou inférieures). Des méthodes de préconcentration à base d'échange d'anions peuvent être utilisées pour augmenter la sensibilité de l'analyse.

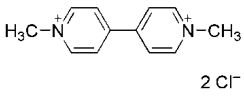
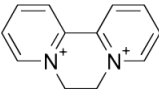
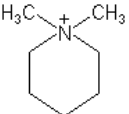
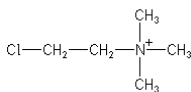
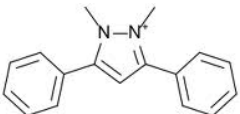
La chromatographie ionique ou la chromatographie liquide avec des colonnes mix mode ou HILIC peuvent fournir une rétention suffisante sans avoir besoin d'étape de dérivation.

Ce type d'analyse peut ainsi être combiné avec de la spectrométrie de masse pour obtenir une meilleure sélectivité lors de la détection.

6.2 QUATS

Les herbicides et régulateurs de croissance pour les végétaux de la famille des ammoniums quaternaires sont communément désignés sous le nom de « quats ». Au sein de ce groupe, le paraquat et le diquat sont des herbicides de contact non-sélectifs, le chlorméquat et le mépiquat sont des régulateurs de croissance utilisés en particulier sur les fruits, les légumes et le coton.

Tableau 8. Structures chimiques des quats

Paraquat (PQ)	Diquat (DQ)	Mépiquat (MQ)	Chlorméquat (CQ)	Difenzoquat (DF)
				
M=257 g/mol	M=184 g/mol	M=114 g/mol	M=122 g/mol	M=249 g/mol
log D _{pH=7} = -4,58	log D _{pH=7} = -1,87	log D _{pH=7} = -2,47	log D _{pH=7} = -2,74	log D _{pH=7} = 0,83

Les quats sont ainsi caractérisés par une nature extrêmement polaire. Les matériaux analytiques de préconcentration et d'analyse, développées pour des composés apolaires ne sont pas adaptés pour l'analyse de ces composés. Ainsi, l'examen de la littérature montre que la phase d'extraction est complexe.

Ce chapitre résume les différentes stratégies appliquées pour l'analyse des quats dans les eaux. Cette partie reprend certains aspects évoqués par les précédents documents Aquaref consacrés aux quats (INERIS (2010), LNE (2011)) avec une mise à jour d'études récentes et en insistant particulièrement sur la préconcentration d'échantillon.

Préparation d'échantillon

Extraction sur phase solide off line

Du fait de la polarité très élevée des quats et de leur excellente solubilité dans l'eau, l'extraction liquide/liquide n'est pas applicable. Ainsi, l'enrichissement est mis en œuvre via des techniques d'extraction sur phase solide.

L'analyse des quats est étudiée depuis longtemps, ainsi de multiples techniques de préconcentration ont été explorées. Une revue, parue en 2000, recensait déjà les différentes techniques d'extraction sur phase solide pour la mesure des quats (Pico (2000)).

Plusieurs mécanismes peuvent être exploités :

Appariement d'ions

Les quats se trouvant sous forme cationique en solution dans l'eau, un anion (généralement un acide organique de haut poids moléculaire constitué de groupements hydrophobes) est ajouté à l'échantillon. Cet anion forme avec les quats une paire d'ions à charge nulle. Cette entité présente un caractère plus hydrophobe que les quats sous forme cationique, ainsi, une phase adsorbante SPE par interaction hydrophobe peut être utilisée. L'HFBA (acide hexafluoro-butyrique) est fréquemment employée comme paire d'ions. Les paramètres d'influence, dans cette phase de pré-traitement, sont la nature et la concentration du contre-ion, ainsi que le pH et la force ionique du tampon utilisé. La méthode US EPA 549.2 est ainsi basée sur une paire d'ions avec cartouche en C₈. Lors de l'extraction il est recommandé d'être compris dans l'intervalle de pH 7 et 9 afin d'éviter les phénomènes de précipitations.

L'inconvénient de cette technique est que l'ajout en excès d'anions organiques de haut poids moléculaires peut poser des problèmes d'interférences ou de dépôt lors de l'analyse chromatographique ou de la détection, particulièrement par spectrométrie de masse.

Echange d'ions (échange de cation)

Des cartouches SPE faiblement échangeuses de cations peuvent être utilisées. L'avantage de ce procédé par rapport à l'appariement d'ions est que l'ajout d'ions n'est pas nécessaire, l'adsorption se faisant par interaction ionique entre les sites anioniques de la phase adsorbante et les ions ammonium.

Pico (2000) a indiqué que la cartouche d'échange de cations Dowex® 50-X8 (acide fort échangeur sur une matrice poly(styrène-divinylbenzène) était largement employée. Les effets de matrices sur la robustesse de la méthode sont cependant plus présents sur ce type d'extraction, notamment la force ionique ou le pH, et cela demande donc une optimisation assez importante lors du développement de méthode.

Sorbant en silice

La silice est un des sorbants les plus polaires avec la présence de nombreux groupements silanols. Sous certaines conditions, la silice adopte un comportement d'échange de cations. Cela est, par contre, très dépendant de nombreux facteurs dont particulièrement le pH, la capacité de sorption augmentant avec le pH. Ainsi, l'utilisation d'un pH dans une gamme de 6,5 à 9,5 entraîne des taux de récupération acceptables pour le diquat, le paraquat et le difenzoquat.

Dans l'eau, des interactions avec d'autres composés de la matrice peuvent perturber l'extraction avec ce type de phase. Ainsi, un effet négatif sur la récupération des quats a été constaté avec la présence de matières organiques, de tensio-actifs ou de sel.

Les acides humiques ou les tensio-actifs pourraient en effet entrer en compétition avec les analytes pour les sites de sorption et en provoquer la saturation.

La mise à pH > 9 de l'échantillon n'est pas conseillée car, bien que cela accroisse la capacité d'adsorption de la silice pour l'extraction, la dégradation du diquat apparaît à ce pH et l'adsorption irréversible du paraquat se produit.

Mix mode

Une autre variante est l'utilisation de cartouches mix mode. Des cartouches avec des phases de type WCX (échange de cation faible) ont été utilisées (Waters (2012), Yu (2010)). Pour le paraquat et le diquat (Waters (2012)), des récupérations de l'ordre de 85 % ont été obtenues pour l'analyse d'eau de rivière ou souterraine avec un pH fixé à 7. Pour l'analyse du chlorméquat et mépiquat (Yu 2010), des récupérations proches de 100 % ont été obtenues. Cependant, de l'EDTA a été ajouté afin de pouvoir réduire les interférences par chélation des analytes provenant du calcium ou du magnésium. Enfin, le pH a été fixé à 9,2 car un pH de 7 ne permettait pas une récupération optimale des composés ciblés.

Des travaux dans l'urine ont également reporté l'utilisation de cartouche SPE mix mode à base d'échange de cation faible (Strata X-CW) (Whitehead (2010)).

Autres mécanismes

Enfin, des travaux ont reporté l'emploi avec succès de phases extrêmement rétentes de type graphite poreux (Carneiro (2000)).

SPE en ligne

L'extraction en ligne présente l'avantage de coupler la partie préconcentration d'échantillon avec les analyses chromatographiques. La méthode généralement employée pour l'analyse des quats à partir d'appariement d'ions a également été utilisée par SPE en ligne. Castro *et al.* (2000) ont proposé différentes approches. Dans leur dernière approche (Castro (2001)), plusieurs cartouches ont été testées. Il a été conclu que la cartouche de polydivinylbenzène (Hysphere-Resin GP) chargée avec un échantillon (10 mL) préalablement traité avec du HFBA et ajusté à pH=7 présentait un meilleur compromis pour l'analyse du CQ (79% récupération), MQ (95%), DQ (103%), PQ (90%) et DF (44%). Ce protocole a également été repris par Nunez *et al.* (2004).

Le tableau 1 ci-après recense les principales techniques de préparation et d'enrichissement utilisées dans la littérature :

Tableau 9. Principales voies d'extraction SPE recensées dans la littérature pour l'analyse des quats (repris de INERIS (2010) et complété)

Référence	Type , volume échantillon	Nature de la phase SPE	pH, force ionique, contre-ion
Carneiro (2000)	Eau de rivière, 250 mL	SPE off line sur cartouches de graphite poreux. Elution par TFA/acétonitrile (20:80 v/v)	pH 9
Castro (2001)	Eau Mill-Q, 10 mL	SPE en ligne. Sphères poly-divinylbenzène 5-15 µm	pH 7, ajusté par NH ₄ OH / HFBA* 20 mM
Grey (2002)	Eau pure, 200 mL	SPE off line sur cartouches mixtes polymérique/échangeuse de cations. Elution par NH ₄ OH 1 M / dans méthanol/eau (1:1)	sans
Nunez (2004)	Eau Souterraine, 30 mL	SPE en ligne. Sphères poly-divinylbenzène 5-15 µm	pH 9, ajusté par NaOH/ HFBA* 20 mM
Martinez Vidal (2004)	Eau naturelle, 250 mL	SPE off-line sur cartouches de silice faiblement échangeuses de cations. Elution par HCl 6M / méthanol (9:1)	pH 9, ajusté par NaOH
Wang (2008)	Sérum, 1mL	SPE off line sur cartouches mixtes polymérique/échangeuse de cations. Elution par acétate d'éthyle / méthanol / NH ₄ OH (80:20:1 v:v)	HFBA* 20 mM
Yu (2010)	Eau de source, 100 mL	SPE off line sur cartouches mixtes polymérique/échangeuse faible de cations. Elution par acétonitrile/eau/TFA*** (84:14:2).	pH 9,2, tampon 5% NH ₃ , H ₂ O
Waters (2012)	Eau de rivière, 20 mL	SPE off line sur cartouches mixtes polymérique/échangeuse faible de cations. Elution par acétonitrile/isopropanol/acide formique (40:40:20).	pH 7, tampon phosphate d'ammonium

* : HFBA : acide hexafluoro-butérique.

** : selon les conditions chromatographiques (nature de la phase mobile utilisée).

*** : TFA : acide trifluoro-acétique.

Conditions chromatographiques et détection

Analyse chromatographique

Les méthodes les plus courantes de séparation chromatographique reposent très largement sur l'appariement d'ions sur des colonnes de silice greffée par des groupements alkyles. L'anion est généralement fourni par l'acide hexafluoro-butyrique, plus rarement par l'acide trifluoro-acétique ou l'heptane-sulfonate de sodium. De ce fait, des colonnes de phase inverse C₁₈ ou C₈ peuvent être utilisées. Cependant, pour la détection en spectrométrie de masse, cela peut induire un encrassement rapide de la source.

Plus récemment sont apparus des principes de séparation sur phases de silice non greffée ou de type HILIC, dont les groupements silanols présents en surface permettent une interaction hydrophile avec les cations ammonium non appariés. Cette approche ne nécessite pas d'ajout de sels pour l'appariement d'ion ce qui évite un encrassement rapide du spectromètre de masse. Ainsi, une phase mobile à base d'acétonitrile avec de l'eau avec un tampon de formate d'ammonium peut être utilisé (Waters (2012), Whitehead (2010)).

Des colonnes en mode mixte SCX (échange de cation fort)- C₁₈ ont été également reportées (Colonne Capcell PAK CR 1 :4) pour l'analyse du chlorméquat et mépiquat (Yu (2010)) avec les mêmes phases mobiles que celles utilisées pour l'analyse par HILIC.

Pour le domaine agroalimentaire, l'EURL-SRM (2012) propose l'utilisation de colonne mix-mode de type Obelisc-R avec un mélange d'acétonitrile et d'eau (20 mM de formate d'ammonium ajusté à pH=3) pour l'analyse des chlorméquat, mépiquat, difenzoquat, diquat et paraquat.

Une autre approche a été explorée avec une analyse du diquat dans des légumes par chromatographique par fluide supercritique (SFC) couplée à la spectrométrie de masse. La SFC s'apparente à une analyse par phase normale mais elle est effectuée avec du CO₂ sous forme supercritique. Afin d'élargir le pouvoir éluant, du solvant (ACN ou MeOH) associé à un tampon (ammonium acétate ou formate) est ajouté (Ishibashi (2012)).

Détection par spectrométrie de masse

De nombreux travaux effectués avant 2000 mentionnent la détection des quats par UV. Ces méthodes étaient cependant caractérisées par un manque de sélectivité et de sensibilité. La spectrométrie de masse est maintenant le mode de détection préférentiel.

La source électrospray, en mode positif, est principalement utilisée. La spectrométrie de masse en tandem est préférée au mode MS simple, qui possède une moins bonne résolution en masse et un manque d'information structurale apporté par les techniques d'ionisation à pression atmosphérique.

Une comparaison entre le mode de détection ESI et APCI a montré que des limites de détection sensiblement équivalentes étaient obtenues (Castro (1999)). La détection par MS/MS est cependant plus sensible qu'une détection par TOF (Nunez (2004)).

Le Tableau 10 ci-dessous recense les principales techniques de séparation chromatographique et de détection utilisées dans la littérature :

Tableau 10. Types de séparation chromatographique recensée dans la littérature (repris de INERIS (2010) et complété)

Référence	Conditionnement de l'extrait avant séparation	Phase mobile	Séparation chromatographique	Détection	LQ (µg/L)
Castro (2001)	sans	Gradient entre A : HFBA 20 mM / eau (pH 2) et B : acétonitrile. Addition post-colonne de méthanol	Paire d'ions	MS-MS	PQ : 0,1 ; DQ : 0,1 ; MQ : 0,03 ; CQ : 0,06
Grey (2002)	Filtration 0,45 µm	Isocratique TFA 25 mM dans méthanol/eau (5 :95)	Paire d'ions	MS	PQ : 0,6 DQ : 3
Nunez (2004)	sans	Gradient entre A : 20 mM HFBA dans (100 mM acide formique/formate d'ammonium à pH 3,3) et B : acétonitrile	Paire d'ions	MS-MS	PQ : 0,1 ; DQ : 0,003 ; MQ : 0,07 ; CQ : 0,01
Martinez Vidal, (2004)	Evaporation à sec, reprise par 20 mM HFBA	Isocratique avec 5 % méthanol / 95 % HFBA 20 mM	Paire d'ions	MS	PQ : 1 ; DQ : 2 ; MQ : 0,02 ; CQ : 0,02
Wang (2008)	Evaporation à sec, reprise par 20 mM HFBA	Isocratique HFBA 20 mM / acétonitrile	Paire d'ions	MS-MS	PQ : 5 DQ : 1
Yu (2010)	Evaporation à sec, reprise par 80/20 ACN/eau	Isocratique avec 80 % acétonitrile / 20 % eau tampon formate d'ammonium	Mix mode SCX-C ₁₈	MS-MS	CQ : 0,1 MQ : 0,1
Waters (2012)	Ajout phase mobile	Isocratique avec 40 % acétonitrile / 60 eau à pH 3,7 (tampon formate d'ammonium	HILIC	MS-MS	PQ : 0,2 DQ : 0,2
Ishibashi (2012)	sans	SFC : gradient avec CO ₂ et méthanol avec 0.1% formate d'ammonium	Inertsil ODS-EP	MS	/

CONCLUSION SUR L'ANALYSE DES QUATS

La littérature indique que, jusqu'au début des années 2000, l'analyse des quats était le plus fréquemment réalisée par appariement d'ions. Le développement de nouvelles technologies a permis la préconcentration directe à l'aide de cartouche mix mode à base d'échanges de cations faibles. L'analyse chromatographique peut elle aussi être effectuée avec des colonnes mix mode ou HILIC. La détection par spectrométrie de masse est préférentiellement effectuée en ESI/MS/MS.

En perspective, des travaux dans le cadre d'Aquaref pourraient être menés afin d'aboutir à une méthode d'analyse SPE en ligne LC/MS/MS sans étape de dérivation ou d'utilisation de contre d'ions et permettant de simplifier les protocoles analytiques.

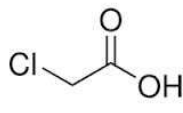
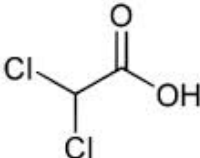
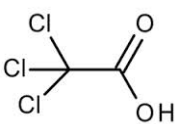
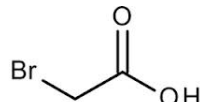
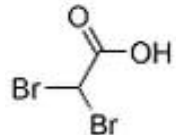
6.3 ACIDES HALOACETIQUES

L'utilisation de produits de désinfection dans les eaux destinées à la consommation est suspectée de pouvoir engendrer des problèmes sur la santé humaine pour des expositions à long terme. En effet, les procédés de chloration pourraient conduire à la formation de sous produits toxiques. Parmi ceux-ci, il peut être distingué les acides haloacétiques (AHA), qui ont été retrouvés dans les eaux potables et classés parmi les composés à suivre par l'US EPA (1998, 2003) et les recommandations de la qualité de l'eau potable par le World Health Organisation (WHO (1991)).

Ces composés entrant dans le cycle de l'eau, ils peuvent ainsi potentiellement se retrouver dans les milieux environnementaux et en particulier aquatiques.

Il existe un total de 9 espèces d'acides chloro ou bromo acétiques. Cependant, 5 (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA) (voir tableau ci-dessous) sont particulièrement étudiés car ils possèdent des propriétés cancérigènes. L'US EPA (1998, 2003) exige que la somme de ces 5 AHA ne dépasse pas une valeur de 60 µg/L alors que le WHO recommande une concentration maximum de 50 µg/L pour le DCAA et 100 µg/L pour le TCAA.

Tableau 11 Acides chloro et bromo acétiques

Acide monochloroacétique (MCAA)	Acide dichloroacétique (DCAA)	Acide trichloroacétique (TCAA)	Acide monobromoacétique (MBAA)	Acide dibromoacétique (DBAA)
				
M= 94 g/mol	M= 129 g/mol	M= 163 g/mol	M= 139 g/mol	M= 218 g/mol
log D _{pH=7} = -3,76	log D _{pH=7} = -3,21	log D _{pH=7} = -2,08	log D _{pH=7} = -3,19	log D _{pH=7} = -2,10

Les acides haloacétiques sont de petites molécules très polaires caractérisées par 2 atomes de carbone complétés par un groupement acide et des atomes de chlore ou de brome. Le groupe acide est entièrement ionisé à partir de pH=6.

Préparation d'échantillon

Beaucoup de travaux mentionnent l'analyse directe des échantillons (voir partie détection). Afin d'améliorer les limites de quantification ou de réduire les interférences des matrices étudiées, différentes stratégies de préparation d'échantillon ont été mises en œuvre.

Extraction liquide liquide

La préparation d'échantillon la plus courante pour les AHA est l'extraction liquide/liquide. Les AHA étant très solubles dans l'eau, ils sont soit dérivés avec des groupes apolaires avant extraction (processus d'estérification avec ajout de groupement alkyl), soit extraits à pH acide afin d'obtenir une forme protonée. La méthode US EPA 552.3 mentionne une extraction par utilisation de MTBE (méthyl tert-butyl éther) ou de TAME (tert-amyl méthyl éther) avec acidification du milieu à pH=0,5 et en présence de sels afin de favoriser le transfert vers la phase solvant. La méthylation des AHA est ensuite accomplie sur l'extrait solvant avec l'ajout de méthanol acidifié. La norme NF EN ISO 23631 adopte un principe identique mais avec un mode opératoire légèrement différent. L'extraction est ainsi effectuée avec du MTBE en acidifiant à pH = 1. La méthylation est cependant effectuée au moyen de diazométhane, réactif dont la manipulation est délicate en raison de son instabilité.

Extraction sur phase solide

Les AHA sont des molécules comportant une très faible proportion de groupements alkyls. Ainsi, les interactions de types hydrophobes sont relativement faibles ce qui élimine l'utilisation de cartouche de type C₁₈.

Acidifier la fraction aqueuse à un pH = 1,8 conduit à une forme entièrement protonée des AHA. Dans ces conditions, Loos et Barcelo (2001) ont comparé 4 phases : Lichrolut EN, HR-P, isolute ENV+ et Oasis HLB. Ils ont conclu que la phase Lichrolut EN permettait d'obtenir les meilleurs résultats avec des rendements compris entre 26 % (MCAA) et 75% (TCAA). La cartouche Lichrolut EN a également été sélectionnée par Prieto Blanco *et al.* (2012) après le test de 3 cartouches (les autres étant Isolute ENV+ et Oasis HLB).

Ces cartouches sont adaptées pour le piégeage des composés semi-polaires mais elles sont généralement plus efficaces sur des composés possédant des groupements aromatiques (ce qui n'est pas le cas des AHA) car elles peuvent développer des interactions π - π . Les rendements sont cependant très influencés par la nature de la matrice étudiée. Quand cette cartouche est testée sur eau MilliQ, des rendements compris entre 60 et 102 % ont été obtenus (Prieto-Blanco (2012)). Sur des matrices réelles (eau souterraine ou de boissons pour Loos et Barcelo (2001)), les meilleurs rendements obtenus sont situés aux alentours de 50%.

De part la nature anionique à pH>6 des AHA, de meilleurs rendements peuvent être obtenus en jouant sur les capacités d'échange d'ions des cartouches.

Ainsi, la méthode US EPA 552.1 est basée sur l'utilisation de cartouche SPE à base d'échanges d'anion.

Dans le cas d'une extraction par échange d'anions, de nombreuses interférences peuvent provenir d'autres ions de type chlorés, sulfatés et nitrés. Ainsi, les performances de la méthode sont également très dépendantes de la matrice étudiée et doivent donc être vérifiées sur celle-ci. L'extraction de ces ions peut être également source d'interférences sur la partie séparative et de détection particulièrement si la méthode d'analyse est basée sur de la chromatographie ionique. Un autre type d'extraction à base de SPME a également été rapporté (Delinsky (2005)).

Séparation chromatographique et détection

Les méthodes US EPA 552.1, 2, 3 et NF EN ISO 23631 sont toutes à base de chromatographie à phase gazeuse et détection soit par ECD soit par spectrométrie de masse. Ce type d'analyse requiert une étape de dérivation due à la nature acide et la faible volatilité des AHA. De plus, des réactions de décomposition peuvent se produire dans l'injecteur. Ces méthodes présentent ainsi de nombreux inconvénients de mises en œuvre. Ainsi elles ne seront pas abordées en détail car ce livrable est avant tout focalisé sur les méthodes d'analyses ne nécessitant pas de dérivation.

Ainsi, dans ce cadre, des méthodes à base de chromatographie ionique ou de chromatographie liquide peuvent être employées.

La chromatographie ionique est une technique de choix et abondamment utilisée pour la mesure des AHA. En effet, dans les eaux (généralement avec des pH~7), ils sont entièrement sous forme ionique ce qui permet une analyse par injection directe sans étape de préparation d'échantillon préalable (à condition que la détection soit suffisamment sensible). La méthode US EPA 557 mentionne l'analyse des AHA dans l'eau de boisson par injection directe avec une colonne d'échange d'anions. La présence d'ions minéraux anioniques de type chlorure, sulfate ou nitrates peut provoquer des interférences et entraîner une hausse des limites de quantification notamment avec une détection par conductimétrie.

Le couplage avec des spectromètres de masse (utilisé en mode négatif) permet de limiter ce phénomène. Ainsi, des limites de quantification identiques à celles rapportées pour des analyses en GC peuvent être atteintes. De l'acétonitrile est ajouté en post colonne pour améliorer l'ionisation des composés. La méthode EPA 557 indique que les AHA peuvent être détectés à des niveaux compris entre 0,015 µg/L (DBAA) et 0,2 µg/L (MCAA). Une détection par ICP-MS en injection directe a également été testée avec des limites de détection aux alentours de 20 µg/L pour les acide chloroacétiques et de 0,5 µg/L pour les bromoacétiques (Liu (2004)).

L'analyse par HPLC « classique » est également possible en utilisant des techniques de type paires d'ions. L'analyse par UV des AHA est possible mais la sensibilité est limitée par la faible présence de groupements chromophores. Ainsi, le couplage avec la spectrométrie de masse est préféré. L'utilisation de phase mobile comprenant un adduit de paire d'ion volatil est alors indispensable. De ce fait, des amines secondaire ou tertiaire ont été employées. Takino *et al.* (2000) ont testé différentes paires d'ions aminés : triéthylamine, di- et tributylamine.

Les auteurs concluent que les amines portant la plus longue chaîne alkyle (tributylamine) produisent une plus grande rétention chromatographique. Loos et Barcelo (2001) ont cependant observé que la tributylamine n'était pas totalement volatile et entraînait des contaminations du système ou des suppressions d'ionisation ce qui provoquait des baisses continues du signal spectrométrique.

Ils ont ainsi préféré l'utilisation de la diéthylamine. L'ajout de triéthylamine permettait d'obtenir également une séparation complète des AHA étudiés avec une très faible perte de signal comparé à des analyses sans ajout de triéthylamine. Dans un article plus récent, Prieto-Blanco *et al.* (2012) ont préféré l'utilisation de dibutylamine à la triéthylamine car de meilleures sensibilités et sélectivités (plus de rétention) étaient obtenues, particulièrement pour les acides monohaloacétiques.

Des limites de détection du même ordre que celles obtenues pour l'US EPA 557 ont été observées dans ces publications. Il doit cependant être noté que l'analyse en MS/MS de molécules chlorées en mode MRM (MCAA et TCAA) aboutit généralement à la détection des fragments 35 et 37. Ces petits fragments peuvent être difficiles à distinguer du bruit de fond particulièrement pour des échantillons provenant de milieux chargés.

L'analyse des AHA a également été rapportée avec une colonne C₁₈ avec une phase mobile acide (pH = 3,1 par ajout de 0.1% d'acide acétique) sans ajout de paire d'ions et détection LC/MS/MS. Par injection directe, des limites de détection comprises entre 0,2 et 1 µg/L ont été obtenues (Meng (2010)).

La technique HILIC peut également être employée. Ainsi, Dixon et al. (2004) ont utilisé une colonne Amino (Phenomenex Luna Amino colonne) afin de pouvoir obtenir une rétention par interaction via le groupe anionique acide. Une phase mobile à base d'ammonium formate (40 mM) et d'acétonitrile a permis une rétention des AHA. Le mode HILIC a également été utilisé par Chen et al. (2009).

Deux colonnes, Beta Max Acid et Acquity UPLC HILIC ont été testées. Cette dernière a été choisie car elle permettait d'obtenir une meilleure symétrie de pics et ainsi de meilleures sensibilités (entre 0,5 et 10 µg/L pour les LOQ). Cette colonne était utilisée avec une phase aqueuse à base d'acide formique (pH = 4,1) et d'acétonitrile.

Pour ces 2 travaux, une concentration d'échantillon était effectuée en évaporant l'eau testée et en la reprenant dans un petit volume (500 µL concentrés à 100 µL (Dixon (2004)), 10 mL concentrés à 250 µL (Chen (2009))).

Tableau 12. Principales voies d'analyses recensées dans la littérature pour l'analyse des AHA

Source	Matrice étudiée,	Méthode extraction	Méthode analyse	Méthode de détection	LOQ (µg/L)
Liu (2004)	Eau de boisson	/	IC –échange d'anion (Dionex IonPac® AS16) Eluant hydroxyde	ICP-MS	MCAA : 21,2; MBAA : 0,5; DCAA : 15,6; DBAA : 0,4; TCAA : 23,6
US EPA 557 (2009)	Eau de boisson	/	IC –échange d'anion (Dionex IonPac® AS24) Eluant hydroxyde	ESI- MS/MS (ajout d'acétonitrile en post colonne)	MCAA : 0,6; MBAA : 0,2; DCAA : 0,13; DBAA : 0,06; TCAA : 0,2 (LOD pour tous)
Takino (2000)	Eau de boisson	/	LC avec paire d'ion- utilisation de la tributylamine	ESI- MS/MS	
Meng (2010)	Eau de boisson	/	Colonne C ₈	ESI- MS/MS	MCAA : 2,1; MBAA : 0,7; DCAA : 0,6; DBAA : 1,3; TCAA : 1,1
Dixon (2004)	Eau de boisson – 500 µL	/	Luna Amino (Phenomenex®)	ESI MS/MS	DCAA : 5
Chen (2009)	Eau de boisson – 10 mL	/	Acquity UPLC HILIC (Waters®)	ESI/MS/MS	MCAA : 9,8; MBAA : 2,6; DCAA : 0,4; DBAA : 0,5; TCAA : 0,6
Prieto-Blanco (2012)	Eau de boisson, piscine, rivière- 100 mL	SPE-lichrolut EN	LC –PAH colonne Waters® avec paire d'ion- utilisation de la dibutylamine	ESI- MS/MS	MCAA : 1,0; MBAA : 1,0; DCAA : 0,8; DBAA : 0,1; TCAA : 0,3
Loos (2001)	Eau de boisson, piscine, rivière- 50 mL	SPE-lichrolut EN	LC –colonne C ₁₈ avec paire d'ion- utilisation de la triéthylamine	ESI- MS/MS	MCAA : 2,4; MBAA : 1,5; DCAA : 1,1; DBAA : 1,7; TCAA : 1,3

Conclusion sur l'analyse des acides haloacétiques

La plupart des méthodes de référence sont basées sur une analyse par chromatographie en phase gazeuse nécessitant une étape de dérivation lors de la préparation d'échantillon. Cependant, la dernière méthode développée par l'US EPA (US EPA 557) tient compte de l'évolution technologique et est basée sur la CI/MS/MS. Ce couplage n'est pas forcément très courant dans tous les laboratoires où la chromatographie ionique est plutôt utilisée en détection ampérométrique afin de pouvoir détecter les ions « classiques » (nitrates, sulfates, chlorure,...).

De nombreux travaux font cependant mention de l'analyse par LC/MS/MS par paire d'ion avec des performances similaires à celles obtenues en GC/MS ou CI/MS/MS. Enfin, l'émergence de la technologie HILIC semble élargir les possibilités d'application en LC/MS/MS sans nécessité de travailler en mode paire d'ions.

Ainsi, au vue de ces conclusions, des travaux Aquaref pourraient être spécifiquement consacrés à développer des méthodes d'analyses simplifiées pour la mesure de ces composés afin de pouvoir préparer, éventuellement, un document prénormatif.

7. ANALYSE MULTIRÉSIDUS DE COMPOSÉS POLAIRES ET APOLAIRES

L'analyse multirésidus consiste à mesurer dans une même méthode analytique de nombreux composés avec des propriétés physico-chimiques variées. Ce type de pratique a connu un développement important notamment dans le cas d'analyses de pesticides qui peuvent comprendre plus de 300 molécules. Un document prénormatif Aquaref est en préparation afin de définir les critères d'acceptabilité de ce type de méthode pour l'analyse de la fraction aqueuse des milieux aquatiques.

Le principal avantage de ce type d'approche est qu'il permet de regrouper plusieurs méthodes en une et donc d'obtenir un gain en termes de temps de cycle, ressources humaines et matérielles. La difficulté reste cependant de déterminer des conditions expérimentales robustes qui pourront convenir à l'analyses de différentes familles (ou propriétés physico chimiques) de molécules visées.

Préparation d'échantillon

Chaque étape de préparation d'échantillon entraîne un risque, soit de ne pas obtenir une bonne récupération/ extraction des composés visés, soit de les dégrader, soit d'apporter de la contamination extérieure. Ainsi, l'approche la moins risquée est de ne pas effectuer de traitement d'échantillon ou du moins de le limiter au minimum. Cette approche a été privilégiée par Loos (2010) pour la mesure de composés polaires pour une campagne de surveillance européenne.

L'analyse directe se heurte souvent à la nécessité de parvenir à la détection des composés cibles à des limites de quantification extrêmement basses correspondant au seuil d'effet écotoxicologique. Ces limites étant généralement reconsidérées et abaissées avec l'amélioration des technologies analytiques, ce type d'approche ne constitue pas une perspective envisageable dans la très grande majorité des cas.

L'injection de large volume d'échantillon entraînent également des problèmes techniques comme une saturation de la colonne et l'introduction d'une grande quantité de matrice dans le système analytique provoquant une contamination potentielle et/ou des pertes d'ionisation de signal.

Les analyses multirésidus notamment de pesticides privilégient généralement l'utilisation de préconcentration sur des matériaux polymériques « classiques » de type HLB ou Strata X (Diaz (2013), Masia (2013), Gomez (2010)). Ces matériaux sont bien adaptés pour l'extraction de composés généralement dans une gamme comprise entre $0 < \log D < 8$. Cependant, pour des composés présentant une polarité plus marquée ($\log D < 0$), les composés soit ne sont pas extraits soit sont extraits avec des rendements généralement médiocres ($< 20\%$).

Pour des extractions sur phase solide, le volume de passage d'échantillon est un facteur important par rapport à la saturation de la cartouche SPE. Ainsi, il est possible de concentrer certains composés très polaires sur des supports polymériques « classiques » en passant un volume d'échantillon limité (30-50 mL par rapport à des volumes généralement compris entre 300 et 1000 mL). Le facteur de préconcentration est cependant limité, de plus les interactions avec la cartouche étant très faibles, la robustesse de la méthode pour ces composés est très dépendante de la complexité de la matrice étudiée.

Ainsi, il est préférable de privilégier d'autres types de support. Au travers des exemples présentés dans les chapitres précédents, il peut être constaté que l'extraction de composés très polaires nécessite l'utilisation de techniques particulières. Les composés très polaires étant généralement de nature ionique, plusieurs options peuvent être considérées. L'une d'elle peut être l'emploi d'ajouts d'ions organiques de haut poids moléculaire afin de contrebalancer la polarité et former un composé qui peut être analysé avec les supports traditionnellement dédiés à l'analyse des semi-polaires et apolaires.

L'application de cette technique dans une optique multirésidus est limitée car l'ajout d'ions est spécifique à chaque famille de composés et il n'en résulte pas un caractère suffisamment généraliste. Une autre possibilité pourrait consister en l'utilisation de supports imprégnés de groupements ioniques.

Peu d'études se sont intéressées au développement d'analyses multirésidus qui permettraient de couvrir une large gamme de composés incluant les composés les plus polaires.

Dans ce cas, une stratégie semble se dégager. Elle consiste à utiliser soit en série soit en mixant, des supports « classiques » de type HLB et des adsorbants ioniques généralement de type échange de cations.

Ainsi, Nurmi et Pellinen (2011) dans l'étude de 84 pesticides et composés pharmaceutiques dans des eaux usées, acidifiées à pH 2,0, ont utilisé en série une cartouche Oasis MCX et une cartouche Strata X. Cette combinaison a été jugée la plus performante après le test individuel de plusieurs cartouches (Strata X, Oasis HLB, Strata X-C, Oasis MCX) à des pH différents qui montraient qu'un seul support n'était pas suffisant pour l'extraction de tous les composés visés.

Pour l'étude de pesticides anioniques, cationiques, neutres et de leurs produits de transformation dans les eaux de rivière, une analyse par SPE en ligne (cartouche PRP-1) couplée à la LC (ESI) MS/MS a été effectuée (Marin (2006)). L'échantillon (20 mL) était séparé en 2. Une partie était traitée à l'acide formique pour l'analyse des composés acides et neutres. L'autre partie était traitée par HFBA 25 mM pour les composés basiques et le reste des composés neutres. Ces extraits (2,2 mL) étaient ensuite injectés séparément dans le système analytique.

Une démarche comparable a été adoptée par Postigo *et al.* (2010), qui pour l'analyse de pesticides polaires dans les eaux souterraines, ont utilisé 2 cartouches pour une analyse par SPE en ligne/LC/MS/MS : une cartouche PLPRs pour les composés analysés en mode positif et une cartouche HySphere Resin GP pour les analyses en mode négatif.

La SPE en ligne a également été utilisée pour une analyse multirésidus de composés très polaires comprenant des pesticides, des résidus médicamenteux ainsi que leurs produits de transformation (Huntcha (2012)). La SPE utilisée était constituée d'un mélange de 4 phases adsorbantes : 10 mg de HLB et 10 mg d'un mélange composé de Strata-X-AW, Strata X-CW et Isolute ENV+ dans un ratio 1/1/1/5. Ces 4 phases permettaient de couvrir une large gamme de composés aux propriétés différentes. En effet, le support HLB apportait des interactions lipophiles (groupe divinylbenzène) et hydrophiles (N-vinyl-pyrrolidone) qui permettaient de capter aussi bien les composés relativement hydrophobes à semi-polaires.

Le groupement Strata X possède des propriétés similaires de par sa résine en polydivinylbenzène contenant des groupes piperidone. Le choix d'un groupe AW (anions weak) et CW (cation weak) permettait d'effectuer de l'échange d'ions. Ainsi, le groupe AW permettait de cibler les groupements anioniques alors que le CW apportait de l'échange de cations à pH = 7.

L'ajout de sorbant Isolute ENV+ s'explique par l'importante surface de contact (1000 m²/g) de ce matériau en polystyrène-copolymère de divinylbenzène, le rendant complémentaire au support HLB.

Le support HLB était disposé en premier afin de capter les polluants non spécifiques. Le lit de deuxième matériel était positionné ensuite afin de capter tous les autres composés.

Ce dispositif a été validé sur un ensemble de 81 composés avec des log D estimés à pH = 7 allant de -4,17 (aténolol acide) à 4,22 (azoxystrobin).

Analyse chromatographique et détection

Dans la totalité des études recensées concernant l'analyse multirésidus, une colonne C₁₈ était utilisée couplée à de la spectrométrie de masse (en tandem ou haute résolution) pour la détection. Des variations sont constatées au niveau de la phase mobile, ainsi l'utilisation de l'acide formique couplé à de l'acétonitrile (Gomez (2010), Marin, (2006)), ou du méthanol (Diaz (2013), Masia (2013)) a été reporté.

Nurmi et Pellinen (2011) ont employé 2 phases mobiles différentes avec pour la détection en mode positif, du méthanol et pour la phase aqueuse, de l'ammonium bicarbonate ajusté à pH=9,5. Pour la détection en mode négatif, 0,05% d'acide acétique dans l'eau et du méthanol étaient utilisés.

Pour l'étude de Huntscha *et al.* (2012), l'analyse chromatographique faisait emploi d'une colonne Atlantis T3 avec une phase mobile aqueuse constituée d'acétate d'ammonium et de méthanol. Cette colonne est à base de C₁₈ mais possède un peu plus d'affinité pour les composés polaires. Avec 20 mL d'échantillon aqueux (eau souterraine, eau de surface et eaux usées) passées à travers la cartouche, des limites de quantification de l'ordre du ng/L étaient obtenus en LC/MS/MS.

Conclusion sur l'analyse multirésidus

Si les méthodes d'analyse multirésidus sont en plein développement, très peu d'études ont spécifiquement inclus des molécules très polaires en raison de la plus grande complexité à pouvoir les incorporer de manière robuste dans une méthode généraliste. Cela se traduit surtout lors de l'étape de préparation d'échantillon par l'utilisation de mélange de supports adsorbants complémentaires pouvant couvrir une large gamme de polarité.

La partie chromatographique reste basée sur des colonnes en C₁₈. Des méthodes de screening à base de colonnes HILIC ne semblent pas être utilisées.

La détection est principalement par spectrométrie de masse haute résolution afin de pouvoir apporter une sélectivité suffisante pour la spéciation des composés organiques.

Il semble que de nombreux travaux restent à mener dans ce domaine. Si au vu de la littérature, des efforts sur l'extraction de des composés polaires ont été menés, l'analyse chromatographique a été essentiellement basée sur des méthodes conventionnelles. Ainsi, l'application de méthode de screening également appuyée par des analyses de type HILIC permettrait de couvrir une gamme d'investigation/application plus large.

8. CONCLUSION GENERALE

Les composés très polaires représentent une part non négligeable des polluants qui peuvent être présents dans les milieux aquatiques. De par leur grande solubilité, ces composés sont considérés comme exclusivement présents dans la fraction aqueuse.

Le log K_{ow} ou log P est généralement utilisé afin de caractériser ou prévoir la présence d'un micropolluant organique dans les différentes phases des milieux aquatiques. Cependant, les composés très polaires ou polaires possèdent souvent des fonctions ionisables. Ainsi, le log K_{ow} n'est pas un bon indicateur pour ces substances car il n'est pas systématiquement déterminé à un pH représentatif des milieux aquatiques.

Le log D qui prend en compte l'influence du pH doit être utilisé afin d'obtenir une image plus représentative de la partition et présence potentielle dans les différents milieux.

Les composés très polaires présentent des caractéristiques spécifiques qui doivent être prises en compte pour toutes les étapes du protocole analytique. Ainsi, pour les différents exemples qui ont été présentés, les quats, glyphosate et composés associés et les acides haloacétiques, des techniques analytiques adaptées aux caractéristiques physico-chimiques et en particulier ioniques de ces substances permettent d'obtenir des performances optimales.

De manière analogue, pour la préparation d'échantillon, les méthodes utilisaient traditionnellement des étapes de dérivation pour assurer la possibilité d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse. Elles sont progressivement supplantées par des approches plus directes qui peuvent être couplées avec des analyses par chromatographie en phase liquide ou chromatographie ionique.

Dans cette optique, si les techniques de paires d'ions sont généralement efficaces, elles demandent également des étapes analytiques supplémentaires et peuvent entraîner des perturbations lors de la détection par spectrométrie de masse.

Ainsi, des supports à base d'échange ioniques, anionique ou cationique selon la nature des composés visés, semblent adaptés à l'extraction de la majorité des composés polaires à très polaires. Ce type de procédé par extraction sur phase solide peut d'ailleurs être appliqué en mode « offline » ou « online ». Pour la partie analyse, les colonnes à base de C_{18} sont trop apolaires pour fournir suffisamment d'interactions et de rétention vis-à-vis des composés très polaires ou ioniques.

Ainsi, deux approches peuvent être principalement considérées pour une analyse directe (sans ajout de contre ions ou de dérivation) : l'utilisation de la chromatographie ionique ou celle de la chromatographie liquide en utilisant des colonnes de type HILIC. Ces deux techniques reposent sur des modes d'interaction ioniques et/ou hydrophiles entre analyte et support.

Il convient cependant d'optimiser particulièrement le pH ou la force ionique de la phase mobile afin d'obtenir la sélectivité requise. Cela requiert dans ce sens plus de développement de méthode que pour des analyses de composés apolaires par colonne C_{18} .

Enfin, la spécificité de ce type d'approche semble la rendre difficilement intégrable dans le cadre d'une analyse multirésidus. De nouveaux schémas ou protocoles pourraient donc être envisagés afin de pouvoir avoir une prise en compte plus importante pour la détection de ce type de composés en mode d'analyse « non target screening » ou dans les programmes de surveillance.

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR FD T 90-187-1, Qualité de l'eau - Dosage du glyphosate et de l'acide amino méthyle phosphonique (AMPA) - Partie 1 : méthode d'analyse par chromatographie liquide avec détection fluorimétrique utilisant la dérivation post colonne, 2010

AFNOR NF ISO 21458, Qualité de l'eau - Dosage du glyphosate et de l'AMPA - Méthode par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et détection fluorimétrique, 2009

AFNOR NF EN ISO 23631 - Qualité de l'eau- Dosage du dalapon, de l'acide trichloroacétique et d'acides haloacétiques sélectionnés - Méthode par chromatographie en phase gazeuse (détection CG-DCE et/ou CG-SM) après extraction liquide-liquide et dérivation - 2006

Anderson C.R., Rupp H.S., Wu W.H., Complexities in tetracycline analysis - chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1075 (2005) 23-32

Bauer K.H., Knepper T.P., Maes A., Schatz V., Voihsel M., Analysis of polar organic micropollutants in water with ion chromatography electrospray mass spectrometry, *Journal Of Chromatography A*, 837 (1999) 117-128

Buszewski B., Noga S., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (2012) 231-247

Carneiro M.C., Puignou L., Galceran M.T., Comparison of silica and porous graphitic carbon as solid-phase extraction materials for the analysis of cationic herbicides in water by liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Analytica Chimica Acta*, 408 (2000) 263-269

Castro R., Moyano E., Galceran M.T., Ion-pair liquid chromatography atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the determination of quaternary ammonium herbicides, *Journal of Chromatography A*, 830 (1999) 145-154

Castro R., Moyano E., Galceran M.T., On-line ion-pair solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides, *Journal of Chromatography A*, 869 (2000) 441-449

Castro R., Moyano E., Galceran M. T., Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography A*, 914 (2001) 111-21

Chen C.Y., Chang S.N., Wang G.S., Determination of Ten Haloacetic Acids in Drinking Water Using High-Performance and Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of chromatographic science*, 47 (2009) 67-74

Chen M.X., Cao Z.Y., Jiang Y., Zhu Z.W., Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry, *Journal Of Chromatography A*, 1272 (2013)

Diaz R, Ibanez M., Sancho J.V., Hernandez F., Qualitative validation of a liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry screening method for organic pollutants in waters, *Journal of Chromatography A*, 1276 (2013) 47-57

Delinsky A.D., Bruckner J.V., Bartlett M.G., A review of analytical methods for the determination of trichloroethylene and its major metabolites chloral hydrate, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid, *Biomedical chromatography*, 19 (2005) 617-639

Dimitrakopoulos I., Thomaidis N., Megoulas N., Koupparis M., Effect of suppressor current intensity on the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by suppressed conductivity ion chromatography, *Journal Of Chromatography A*, 1217 (2010) 3619-3627

Dixon A.M., Delinsky D.C., Bruckner J.V., Fisher J.W., Bartlett M.G., Analysis of dichloroacetic acid in drinking water by ion exchange HILIC-LC/MS/MS, *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 27 (2004) 2343-2355

EURL-SRM - EU reference laboratories for residues and pesticides, Quick Method for the Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination (QuPPE-Method), 2012

Fauvelle V., Mazzella N., Delmas F., Madarassou K., Eon M., Budzinski H., Use of Mixed-Mode Ion Exchange Sorbent for the Passive Sampling of Organic Acids by Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS), *Environmental Science & Technology*, 46 (2012) 13344-13353

Gomez M.J., Gomez-Ramos M.M., Malato O., Mezcua M., Fernandez-Alba A.R., Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry with an accurate mass database, *Journal of chromatography A*, 1217 (2010) 7038-7054

Guo Y., Gaiki S., Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1074 (2005) 71-80

Guo Z.X., Cai Q.T., Yang Z.G., Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *Journal Of Chromatography A*, 1100 (2005) 160-167

Grey L., Nguyen B., Yang P., Liquid chromatography–electrospray ionization isotope dilution mass spectrometry analysis of paraquat and diquat using conventional and multilayer solid-phase extraction cartridges, *Journal of Chromatography A*, 958 (2002) 25–33

Hanke I., Singer H., Hollender J., Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection, *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 2265-2276

Hao C., Morse D., Morra F., Zhao X., Yang P., Nunn B., Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column, *Journal Of Chromatography A*, 1218 (2011) 5638-5643

Huntscha S., Singer H., Mc Ardell C., Frank C.E., Hollender J., Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal Of Chromatography A*, 1268 (2012) 74-83

Ibanez M., Pozo O. J., Sancho J.V., Lopez F.J., Hernandez F., Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *Journal Of Chromatography A*, 1081 (2005) 145-155

Ibanez M., Pozo O. J., Sancho J.V., Lopez F.J., Hernandez F., Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *Journal Of Chromatography A*, 1134 (2006) 51-55

INERIS- AQUAREF Rapport d'étude INERIS, n°DRC-10-102844-03148A, Dosage du paraquat, du diquat, du Chlorméquat et du Mépiquat dans les eaux par extraction SPE et analyse en LC-MS/MS : bibliographie et investigation des différentes routes analytiques possibles, 2010

Ishibashi M., Ando T., Sakai M., Matsubara A., Uchikata T., Fukusaki E., Bamba T., High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1266 (2012) 143-148

ISO/DIS 16308, Qualité de l'eau — Détermination du glyphosate et de l'AMPA — Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection par spectrométrie de masse en tandem, 2012

Kah M., Brown C.C., Log D : lipophilicity for ionisable compounds, *Chemosphere*, 72 (2008) 1401-1408

Liu Y., Mou S., Chen D., Determination of trace-level haloacetic acids in drinking water by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1039 (2004) 89-95

LNE- AQUAREF Rapport d'étude LNE, détermination des pesticides très polaires dans les matrices environnementales aqueuses. Etude préliminaire à la fabrication d'un matériau de référence : cas des ammoniums quaternaires, 2011

Loos R., Barcelo D., Determination of haloacetic acids in aqueous environments by solid-phase extraction followed by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 938 (2001) 45-55

Loos R., Locoro G., Comero S., Contini S., Schwesig D., Werres F., Balsaa P., Gans O., Weiss S., Blaha L., Bolchi M., Gawlik B.M., Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water, *Water Research*, 44 (2010) 4115-4126

Marin J. M., Sancho J.V., Pozo O.J., Lopez F.J., Hernandez F., Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1133 (2006) 204-214

Martinez Vidal J.L., Belmonte Vega A., Sanchez Lopez F.J., Garrido Frenich A., Application of internal quality control to the analysis of quaternary ammonium compounds in surface and groundwater from Andalusia (Spain) by liquid chromatography with mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1050 (2004) 179-184

Masia A., Ibanez M., Blasco C., Sancho J.V., Pico Y., Hernandez F., Combined use of liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in systematic screening of pesticides and other contaminants in water samples, *Analytica Chimica Acta*, 761 (2013) 117-127

Meng L., Wu S., Ma F., Jia A., Hu J., Trace determination of nine haloacetic acids in drinking water by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 4873–4876

Nedelkoska T.V., Low G.K.C., High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate, *Analytica Chimica Acta*, 511 (2004) 145-153

Nunez O., Moyano E., Galceran M.T., Time-of-flight high resolution versus triple quadrupole tandem mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides in drinking water, *Analytica Chimica Acta*, 525 (2004) 183–190

Nurmi J., Pellinen J., Multiresidue method for the analysis of emerging contaminants in wastewater by ultra performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry,, *Journal of Chromatography A* , 1218 (2011) 6712-6719

Patsias J., Papadopoulou A., Papadopoulou-Mourkidou E., Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization, *Journal Of Chromatography A*, 932 (2001) 83-90

Pichon V., Chapuis-Hugon F., Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants - A review, *Analytica Chimica Acta*, 622 (2008) 48-61

Pico Y., Font G., Molto J.C., Manes J., Solid-phase extraction of quaternary ammonium herbicides, *Journal of Chromatography A*, 885 (2000) 251–271

Pham T.P.T., Cho C.W., Y. Y.S., Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review, *Water research*, 44 (2009) 352-372

Postigo C., de Alda M.J.L., Barcelo D., Ginebreda A., Garrido T., Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): An approach based on on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry detection, *Journal of Hydrology*, 383 (2010) 83-92

Prieto-Blanco M. C., Alpendurada M. F., Lopez-Mahia P., Muniategui-Lorenzo S. , Prada-Rodriguez D., Machado S., Goncalves C., Improving methodological aspects of the analysis of five regulated haloacetic acids in water samples by solid-phase extraction, ion-pair liquid chromatography and electrospray tandem mass, *Talanta*, 94 (2012) 90-98

Ripolles C., Sancho J.V., Lopez F.J., Hernandez F, Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the residue determination of ethylenethiourea (ETU) and propylenethiourea (PTU) in water, *Journal of Chromatography A*, 1243 (2012) 53-61

Sadi B.B.M., Vonderheide A.P., Caruso J.A., Analysis of phosphorus herbicides by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octapole reaction cell, *Journal Of Chromatography A*, 1050 (2004) 95-101

Škrášková K., Santos L.H.M.L.M., Šatínský D., Pena A., Montenegro M.C.B.S.M., , Solich P., Nováková L., Fast and sensitive UHPLC methods with fluorescence and tandem mass spectrometry detection for the determination of tetracycline antibiotics in surface waters, *Journal of Chromatography B*, 927 (2013) 201-208

Takino M., Daishima S., Yamaguchi K., Determination of haloacetic acids in water by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents, *Analyst*, 125 (2000) 1097-1102

US EPA Environmental Protection Agency, Disinfectants and disinfection byproducts; national primary drinking water regulations: final rule, Federal Register 63 (1998) 69390.

US EPA Environmental Protection Agency, National primary drinking water regulations: stage 2 disinfectants and disinfection by-products rule; National primary and secondary drinking water regulations: approval of analytical methods for chemical contaminants: proposed rule, Federal Register 68 (2003) 49547.

US EPA 547, Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous injection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection, 1990

US EPA 549.2, Determination of diquat and paraquat in drinking water by liquid-solid extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, 1997

US EPA - method 552.1, Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by ion-exchange liquid-solid extraction and gas chromatography with an electron capture detector, 1992

US EPA - method 552.2, Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection, 1995

US EPA - method 552.3, Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid microextraction, derivatization, and gas chromatography with electron capture detection – 2003

US EPA - method 557, Determination of haloacetic acids, bromate, and dalapon in drinking water by ion chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (IC-ESI-MS/MS), 2009

van Nuijs A.L.N., Tarcomnicu I., Covaci A., Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5964-5974

Vermeirssen E.L. M., Dietschweiler C., Escher B., van der Voet, J., Hollender, J., Uptake and release kinetics of 22 polar organic chemicals in the Chemcatcher passive sampler, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013) 5225-5236

Waters - Van Tran K., Shia J.C., Young M.S., Fast and sensitive UPLC/MS(MS) determination of diquat and paraquat in drinking water, note d'application, 2012

Wang K.C., Chen S.M, Hsu J.F., Cheng S.G., Lee C.K., Simultaneous detection and quantitation of highly water-soluble herbicides in serum using ion-pair liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 876 (2008) 211–218

Whitehead R.D., Montesano M.A., Jayatilaka N.K., Buckley B., Winnik B., Needham L.L., Barr D.B., Method for measurement of the quaternary amine compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 2548-2553

World Health Organisation (WHO), Revision of the WHO Guidelines for Drinking Water Quality, Geneva, 1991.

Wu X., Molecular imprinting for anion recognition in aqueous media, *Microchimica Acta*, 176 (2012) 23-47

Yu Z., Jin F., Hu J., Zhang X., Sun J., Yang M., An improved method for analyzing chlormequat and mepiquat in source waters by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 678 (2010) 90-95