



Développement de méthodes analytiques d'alkylphénols dans les sédiments

C. Chatellier, J. Beaumont, A. El Masri, F. Lestremau

Juin 2019

Document final





Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2016, au titre de l'action « thème D - Amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques ».

Auteur (s) :

Claudine Chatellier INERIS claudine.chatellier@ineris.fr

Jérôme Beaumont INERIS Jerome.beaumont@ineris.fr

Ahmad El Masri Ahmad.el-masri@ineris.fr

Francois Lestremau INERIS Francois.lestremau@ineris.fr

Vérification du document :

Anice Yari Irstea anice.yari@irstea.fr

Les correspondants :

AFB : Pierre-François Staub : pierre-francois.staub@afbiodiversite.fr

INERIS : François Lestremau

<u>Référence du document</u> : C. Chatellier, J. Beaumont, A. El-Masri, F. Lestremau, Développement de méthodes analytiques d'alkylphénols dans les sédiments - Rapport AQUAREF 2016 - 96 p.

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

1. /	ABREVIATIONS 10
 2.1 2.2 2.3 2.4 2.5 	CONTEXTE ET OBJECTIFS11Contexte11Présentation générale des alkylphénols11Surveillance et règlementation11Méthodes analytiques pour les alkylphénols12Bilan et objectifs de l'étude12
 3.1 3.2 	MATERIELS UTILISES13Etalons et étalons internes13Matériels13
4. (4.1 4.2	CAS PARTICULIERS DE CETTE ETUDE.13Tetrabromobisphenol A bis (2,3-dibromopropyl éther)13Dodécylphénol14
5. I 5.1 5.2 5.3	ETUDE DE L'ANALYSE DES ALKYLPHENOLS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE 16 Conditions chromatographiques 16 Conditions chromatographiques avec silylation 17 Essais de la méthode analytique en matrice sédiment 20
 6. 1 6.1 6.2 6.3 6.4 6.5 6.5. 6.5. 6.5. 6.5. 6.6 	ETUDE DE L'ANALYSE DES ALKYLPHENOLS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDECOUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE23Optimisation des conditions chromatographiques23Paramètres de détection et performances analytiques par LC/TQD24Stabilité des étalons26Etude sur le traitement d'échantillons26Essais sur la purification de l'extrait271 Analyse sans étape de purification272 Purification sur cartouche SPE de silice (SiOH)283 Purification aux micro-ondes31
6.7 6.8	Essais en matrice aux limites de quantification ciblées
7. (8 I	28
9. L	LISTE DES ANNEXES

Liste des annexes :	L	iste	des	annexes	:
---------------------	---	------	-----	---------	---

Annexe 1	Formules semi-développées des alkylphénols
Annexe 2	Conditions de chromatographie gazeuse sur la colonne DB5-MS
Annexe 3	Tableau des temps de rétention et des ions de spécifiques aux AKP en GC/MS sur la colonne DB5-MS
Annexe 4	Tableau des temps de rétention et des ions de spécifiques aux AKP après silylation en GC/MS colonne RTX 1614
Annexe 5	Bilan des rendements de dérivation dans l'acétone
Annexe 6	Bilan des rendements de dérivation dans l'acétonitrile
Annexe 7	Bilan des rendements de dérivation dans l'acétonitrile en présence d'un catalyseur : pyridine à 10%
Annexe 8	Méthode d'analyse des sédiments pour analyse GC/MS
Annexe 9	Conditions de chromatographie liquide testées
Annexe 10	Séparations chromatographiques des alkylphénols sur différentes colonnes de chromatographie liquide
Annexe 11	Conditions d'ionisation du Q-TOF 6550 Agilent et du TQD Acquity WATERS
Annexe 12	Dérive du signal du 4-DDcP par analyse LC/TQD
Annexe 13	Méthodes MAE

DEVELOPPEMENT DE METHODES ANALYTIQUES D'ALKYLPHENOLS DANS LES SEDIMENTS C. Chatellier, J. Beaumont, A. El Masri, F. Lestremau

Resume

Les 4-nonylphénols et le 4-tert-octyphénol ont été classés comme substances prioritaires par la DCE. Cependant, de nombreux autres alkylphénols (AKP) utilisés industriellement peuvent également présenter un danger de toxicité de par leur présence dans les milieux aquatiques. Une étude prospective mise en œuvre en 2012 a ainsi pu démontrer la présence de certaines substances de cette famille dans les milieux aquatiques français ce qui a conduit à leur intégration via l'arrêté du 07 aout 2015 dans la liste des substances pertinentes dans le cadre de la surveillance régulière.

Les substances retenues pour intégrer cette liste étaient :

- 4-tert-butylphénol
- Dodecylphénol
- 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphénol
- 2,6-di-tert-butyl-4-phenylphénol
- Tétrabromo bisphénol A (TBBPA)
- Tétrabromobisphénol A bis(2,3-dibromopropyl éther)
- Ces substances étant plutôt hydrophobes, leur surveillance a été établie pour la matrice sédiment.

Ces travaux ont ainsi été consacrés à développer une méthode d'analyse de ces substances dans les sédiments.

Des essais ont été mis en œuvre pour utiliser la même technique généralement employée pour l'analyse des alkylphénols DCE dans l'eau : soit par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse. Une méthode instrumentale a pu être développée à base d'une dérivation par MSTFA en présence de pyridine. Cependant, malgré l'emploi d'une méthode de purification, les essais dans les sédiments n'ont pu aboutir à des résultats probants.

Des travaux ont également été effectués avec analyse par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem. Une méthode chromatographique a été développée permettant de séparer les composés d'intérêt, puis les limites de quantification instrumentales ont démontré que les exigences réglementaires semblaient atteignables. Les essais en matrices ont toutefois mis en évidence d'importantes interférences causées par les sédiments et n'ont pas permis de démontrer l'applicabilité de la méthode développée à l'ensemble des substances visées.

Mots clés (thématique et géographique) :

Alkylphénols, arrêté du 07 aout 2015, sédiment, GC/MS, LC/MS

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS OF ALKYLPHENOL IN SEDIMENTS C. Chatellier, J. Beaumont, A. El Masri, F. Lestremau

ABSTRACT

4-Nonylphenols and 4-tert-octylphenol were classified as priority substances by the WFD. However, many other alkylphenols (AKP) used industrially can also present a danger of toxicity by their presence in aquatic environments. A prospective study carried out in 2012 has demonstrated the presence of certain substances of this family in aquatic environments. This led to their integration via the " arrêté du 07 aout 2015" in the list of relevant substances as part of regular monitoring.

The substances selected for inclusion in this list were:

- 4-tert-butylphenol
- Dodecylphenol
- 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol
- 2,6-di-tert-butyl-4-phenylphenol
- Tetrabromo Bisphenol A (TBBPA)
- Tetrabromobisphenol A bis (2,3-dibromopropyl ether)

These substances being rather hydrophobic, their monitoring has been established for the sediment matrix.

This work was thus devoted to develop a method for analyzing these substances in sediments.

Tests have been performed to use the same technique generally used for the analysis of alkylphenols DCE in water : by gas chromatography coupled with mass spectrometry. An instrumental method has been developed based on a derivation by MSTFA in the presence of pyridine. However, despite the use of a purification method, the sediment tests could not lead to convincing results.

Work has also been carried out with analysis by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. A chromatographic method was developed to separate the compounds of interest and the instrumental quantification limits demonstrated that the regulatory requirements appeared to be achievable. However, the tests in matrix revealed significant interferences caused by the sediments which induced the applicability of the developed method to all the substances concerned could not be demonstrated.

Key words (thematic and geographical area):

Alkylphenols, « arrêté du 07 aout 2015 », sediment, GC/MS, LC/MS

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	C. Chatellier F. Lestremau	H. Biaudet	M. Durif	
Qualité	Unité	Responsable de l'Unité	Responsable du Pôle	
	« Méthodes & développements en ANAlyses pour l'Environnement »	« Méthodes & développements en ANAlyses pour l'Environnement »	« Caractérisation de l'Environnement »	
	Direction des Risques Chroniques	Direction des Risques Chroniques	Chroniques	
Visa	-huldth	Mardu		

1. ABREVIATIONS

2tBu4mP	: 2-tert-butyl-4-methylphénol,
26dtBu4mP (BHT)	: 2,6-di-tert-butyl-4-methylphénol,
26dtBu4pP	: 2,6-di-tert-butyl-4-phénylphénol,
4sBu26dtBuP	: 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butyl-phénol,
4tBuP	: 4-tert-butyl-phénol,
4DDcP	: 4-dodecylphénol,
4tOP	: 4-tert-octylphénol,
4NP	: 4-nonylphénol,
AKP	: alkylphénols,
BPA	: bisphénol A,
TBBPA	: tétrabromobisphénol A,
DCM	: dichlorométhane,
EMQ	: Eau milliQ,
ESI	: électrospray,
GC	: chromatographie gazeuse,
HRMS	: spectromètre de masse haute résolution,
IT	: trappe d'ions,
LC	: chromatographie liquide,
MAE	: extraction par micro-ondes,
MeOH	: Méthanol,
MS	: spectromètre de masse,
MS/MS	: spectrométride de masse en tandem,
NP1EO	: 4-nonylphénols monoéthoxylés,
NP2EO	: 4-nonylphénols diéthoxylés,
OP1EO	: 4-tert-octylphénol monoéthoxylés,
OP2EO	: 4-tert-octylphénol diéthoxylés,
PTV	: programmed temperature vaporizer,
PSA	: primary and secondary amines,
Q-TOF	: quadripoler/temps de vol,
SiOH	: silice,
SPE	: extraction sur phase solide,
TMS	: triméthylsilyle,
TQD	: triple quadripole.

2. <u>CONTEXTE ET OBJECTIFS</u>

2.1 CONTEXTE

Les 4-nonylphénols (4-NP) et le 4-tert-octyphénol sont classés comme substances prioritaires par la Directive Cadre sur l'Eau [1]. Cependant, de nombreux autres alkylphénols (AKP) utilisés industriellement peuvent également présenter un danger de toxicité de par leur présence dans les milieux aquatiques. Ainsi, une étude prospective mise en œuvre en 2012 a ainsi pu démontrer la présence de certaines substances de cette famille dans les milieux aquatiques français [2], ce qui a conduit à leur intégration via l'arrêté du 7 août 2015 dans la liste des substances pertinentes suivies dans le cadre de la surveillance régulière [3].

Les substances retenues pour intégrer cette liste, appelées dans le document « alkylphénols substances pertinentes », étaient :

- 4-tert-butylphénol
- Dodécylphénol
- 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphénol
- 2,6-di-tert-butyl-4-phenylphénol
- Tétrabromo bisphénol A (TBBPA)
- Tétrabromobisphénol A bis (2,3-dibromopropyl éther)

Il est à noter que les dodécyl phénol et tétrabromobisphénol A bis (2,3-dibromopropyl éther) n'avaient pas été recherchés lors de l'étude prospective 2012 et ont été ajoutés à la liste des substances pertinentes pour la surveillance régulière.

Tous ces alkylphénols étant des substances relativement hydrophobes (log Kow >5), leur surveillance a été établie pour la matrice sédiment.

Ces travaux ont ainsi été consacrés à développer une méthode d'analyse de ces substances dans les sédiments.

2.2 **PRESENTATION GENERALE DES ALKYLPHENOLS**

L'élément de base des alkylphénols est un noyau phénolique sur lequel est substitué un radical alkyle. Ces molécules sont amphiphiles, présentant une partie hydrophobe (une ou plusieurs chaînes de carbones) et une partie hydrophile (groupement alcool). Leurs valeurs de log Kow supérieures à 5 permettent de les classer comme étant des molécules relativement hydrophobes (sauf pour le 4-tert-butylphénol, log Kow = 3,2).

Le tableau 1 présente les caractéristiques des alkylphénols ciblés dans cette étude (voir en annexe 1 pour les formules développées des alkylphénols de cette étude).

2.3 SURVEILLANCE ET REGLEMENTATION

L'avis relatif aux limites de quantification des couples « paramètre-matrice » de l'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques du 14 avril 2018 fixe les limites de quantification dans la matrice sédiment à atteindre pour le 31 décembre 2018 [4] :

Tableau 1 : Liste et caractéristiques physico-chimiques des alkylphénols définis dans l'arrêté du 07 aout 2015 avec limites de quantification établies dans l'avis d'agrément du 14/04/2018

Code SANDRE	CAS	Paramètre	LQ cible (31/12/18) (ng/g)	Formule brute	Poids moléculaire (g/mol)	Log K _{ow}
7099	2668-47-5	2,6-di-tert-butyl-4- phenylphénol	10	C ₂₀ H ₂₆ O	282,42	6,6 *
2610	98-54-4	4-tert-butylphénol	20	$C_{10}H_{14}O$	150,22	3,2
3383	210555-94-5	Dodécylphénol	100	C ₁₈ H ₃₀ O	262,43	7,8
7101	17540-75-9	4-sec-Butyl-2,6-di- tert-butylphénol	15	C ₁₈ H ₃₀ O	262,43	6,7
6657	21850-44-2	Tétrabromobisphén ol A bis (2,3- dibromopropyl éther)	5	$C_{21}H_{20}Br_8O_2$	943,61	10,4
7131	79-94-7	Tétrabromobisphén ol A	5	$C_{15}H_{12}Br_4O_2$	543,87	7,3

Source Chemspider pour les log K_{ow}. Toutes ces valeurs de log K_{ow} sont calculées sauf * valeur expérimentale.

2.4 METHODES ANALYTIQUES POUR LES ALKYLPHENOLS

Les alkylphénols cités par la DCE sont généralement dosés par les laboratoires prestataires par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à de la spectrométrie de masse (MS). Deux normes, NF EN ISO 18857-1 (2006) [5] et NF EN ISO 18857-2 (2012) [6] ont été consacrées au dosage de ces composés par GC/MS dans l'eau. Ainsi, les alkylphénols de cette étude présentant des propriétés physico-chimiques proches des substances réglementées, cette technique a été considérée afin de pouvoir disposer d'une méthode également compatible avec le dosage des substances réglementées.

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS) peut également être employée. Ainsi, cette approche a été utilisée lors de l'étude prospective de 2012 pour les dosages de 3 substances de cette étude : 4-tertbutylphénol, 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol et tétrabromobisphénol A [2]. Cette méthode a été également considérée au cours de cette étude.

2.5 BILAN ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le but de cette étude était de développer une méthode d'analyse dans les sédiments pour les 6 substances pertinentes de l'arrêté du 7 août 2015 de la famille des alkylphénols et compatibles avec les exigences de LQ de l'avis agrément.

Les premiers travaux ont visé à établir une méthode en cohérence avec les analyses des alkylphénols déjà réglementés à base de GC/MS.

Une autre partie des travaux a été consacrée à repartir de la méthode utilisée lors de l'étude prospective de 2012 sur des analyses effectuées par LC/MS/MS.

3. MATERIELS UTILISES

3.1 ETALONS ET ETALONS INTERNES

Les étalons ont été obtenus auprès de différents fournisseurs (Analytical standard solution, BCP-Instrument, Accustandard, Merck, CIL-Cluzeau et LGC-Standard). Les étalons marqués au carbone 13 (-13C) ou deutérés (-d) provenaient de Cambridge Isotope Laboratory, LGC Standard, Merck et CDN-isotopes.

3.2 MATERIELS

Un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse type trappe ionique 4000 (Varian) a été utilisé. En chromatographie en phase liquide, deux appareils (LC) couplés à la spectrométrie de masse (MS) ont été utilisés : le couplage LC/MS-TQD (spectromètre de masse triple quadrupôle) de modèle Acquity (Waters) et le LC/QTOF (spectromètre de masse haute résolution quadripôle-temps de vol) de modèle Q-TOF 6550 (Agilent).

Le système d'extraction par fluide pressurisé utilisé était un Dionex ASE 200 et le microonde utilisé pour les extractions était le MARS 6 (CEM), configuré en mode solvant.

Les essais ont été réalisés sur un échantillon moyen de 12 sédiments de rivière lyophilisés présentant des teneurs en COT de < 0,4 à 4,35 % pour un COT moyen de 1,85%, de fraction granulométrique inférieure à 2 mm (puis broyé à < 250 μ m). La prise d'essai était de 1 g.

4. <u>CAS PARTICULIERS DE CETTE ETUDE</u>

4.1 **TETRABROMOBISPHENOL A BIS (2,3-DIBROMOPROPYL ETHER)**

Le tétrabromobisphénol A bis (2,3-dibromopropyl éther) est un composé lié au tétrabromobisphénol A. Cependant, au sens strict du terme, il ne peut pas être considéré comme un alkylphénol car les fonctions alcool du tétrabromobisphénol sont complétés par des formes dibromopropyl pour former des esters.



Figure 1 : Structure moléculaire du tétrabromobisphénol A bis (2,3-dibromopropyl éther)

Cela produit un composé très hydrophobe (log Kow = 10,4) et de haute masse moléculaire (943,61 g/mol) pour un polluant organique et implique qu'il a des propriétés physico-chimiques particulières d'un point de vue analytique.

Ce composé n'est pas détecté en LC/MS dans des conditions usuelles d'analyse, par détection par électrospray, car il ne s'ionise pas (aucune donnée bibliographique identifiée par ce mode d'analyse). Une étude a rapporté son analyse par HPLC/ICPMS [7], un couplage très spécifique et peu commun dans les laboratoires.

Son poids moléculaire élevé et sa faible volatilité rend difficile son analyse en GC/MS. A la suite du développement d'une méthode générique en GC/MS pour l'analyse des autres alkylphénols de cette étude, des essais d'optimisation pour ce composé ont été menés. Ce composé ayant une masse moléculaire importante (M= 943,61 g/mol), l'utilisation d'une colonne plus courte (RTX-1614, 15m * 0,25mm * 0,1µm), identique à celle employée pour l'analyse du BDE-209, avec une injection en mode pulse/splitless, a été évaluée. Un pic chromatographique de base à 451,7 uma, avec un profil isotopique correspondant à une substance bromée a été détecté mais avec une faible sensibilité. Les variations de pression de pulse au niveau de l'injecteur n'ont pas permis d'augmenter la réponse du signal et les essais de changement de programmation de température d'injection ont entraîné un problème de dégradation de ce composé (et des alkylphénols) pour des températures supérieures à 300°C.

Par conséquent, ce composé n'a pas pu être inclus dans les méthodes LC/MS ou GC/MS developpées pour les autres alkylphénols. Son analyse exige un protocole spécifique et n'a donc pas été poursuivie pour ces travaux.

Au vu des contraintes analytiques importantes pour sa mesure, une réflexion doit être menée par rapport à son importance et son maintien dans le suivi réglementaire (il peut être rappelé que son inclusion dans la liste des substances pertinentes n'est pas issue de l'étude prospective 2012).

4.2 DODECYLPHENOL

Comme le 4-nonylphénol, le dodécylphénol (suivant l'appellation utilisée dans l'avis agrément) est un mélange d'isomères ramifiés d'une chaine alkyle comprenant 10 atomes de carbones. Cette chaine alkyle est exclusivement située en position para du groupement phénol (voir exemple de structure moléculaire en annexe 1).

CAS du dodécylphénol

Selon les différentes configurations qu'il peut prendre (position ortho, méta, para de la chaine alkyle, conformation linéaire ou ramifiée de cette chaine (et dans ce cas en considérant des ramifications spécifiques ou la somme des isomères ramifiés)), le « Dodécylphénol » est référencé :

- pour les mélanges d'isomères selon 5 numéros CAS : 74499-35-7 ; 57427-55-1 ; 121158-58-5 ;210555-94-5; 27193-86-8.
- pour les formes linéaires selon 2 CAS : 104-43-8 (para) et 5284-29-7 (ortho). Les structures moléculaires des formes linéaires sont référencés en annexe1.

Etalons du dodécyphénol

Commercialement, seuls les étalons des CAS 210555-94-3, 27193-86-8 et 104-43-8 sont disponibles.

Le CAS 210555-94-5 correspond au 4-dodécylphénol sous forme d'un mélange d'isomères tous en position 4 (para) et à branche alkyle ramifiée.

Le CAS 27193-86-8 correspond au mélange d'isomères de n-dodécylphénol : mélange d'isomères de position de la <u>chaîne carbonée linéaire</u>. L'étalon selon ce CAS est disponible commercialement mais il y a une confusion de la part du fabricant avec le CAS 210555-94-5 (figure 1 et annexe 1).

Le CAS 104-43-8 est disponible commercialement et correspondrait selon sa définition fournit par le CAS à l'unique isomère linéaire en position para : le 4-n-dodécylphénol mais l'analyse des références commerciales commandée sous ce CAS montre qu'il s'agit d'une coupe présentant un profil similaire à l'analyse des 2 autres étalons (figure 1).

Cette étude a utilisé l'étalon vendu selon le CAS 210555-94-5 qui correspond bien à la forme visée (mélange d'isomères ramifiés du 4-dodécylphénol).



Figure 2 : Etalons de dodécylphénol commercialement disponibles

Difficultés analytiques liées au dodécylphénol

Le dodécylphénol étant un mélange d'isomères, son analyse entraine plus de difficultés que pour l'analyse d'un seul isomère (comme par exemple les autres alkylphénols « substances pertinentes » de cette étude). En effet, l'analyse en GC entraine l'élution chromatographique de ce composé sous forme de coupe (voir figures 1 et 2) ce qui produit un risque accru de co-élution avec d'autres composés ou de masquer des interférences qui pourraient être présentes dans la coupe d'élution. L'analyse de ce composé à des niveaux proches du bruit de fond est également plus délicate du fait qu'il est plus difficile de le différencier des interférences présentes.

En LC, la forme du pic est améliorée par l'effet de gradient par rapport à la GC mais son élution est toutefois plus large qu'un pic « conventionnel » (voir figure 4) ce qui entraine également des risques similaires à ceux décrits pour la GC.

Les conditions d'analyse par MS (ions ou transitions de quantification et qualification) doivent être ainsi particulièrement étudiées afin de pouvoir obtenir une analyse sensible de ce composé tout en préservant la sélectivité par rapport aux autres alkylphénols et aux interférents potentiels.

5. <u>ETUDE DE L'ANALYSE DES ALKYLPHENOLS PAR</u> <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA</u> <u>SPECTROMETRIE DE MASSE</u>

De précédents essais sur les alkylphénols et alkylphénols éthoxylés dans les sédiments par analyse en chromatographie gazeuse (GC) couplée à un spectromètre de masse type trappe d'ions (IT) [8] avaient permis d'atteindre pour le 4-NP une LQ de 25 µg/kg. Ces conditions analytiques ont donc constitué un point de référence pour cette étude.

L'objectif de cette partie a ainsi été d'inclure les alkylphénols « susbtances pertinentes » à la méthode d'analyse des alkylphénols déjà réglementés (4-nonylphénols (4-NP) et 4-tertoctylphénol (4-OP)) et leurs éthoxylés : 4-nonylphénols mono et diéthoxylés (NP1EO et NP2EO), 4-tert-octylphénol mono et di éthoxylés (OP1EO et OP2EO). Le BHT (2,6-di-tertbutyl-4-méthylphénol), substance faisant partie de la première liste de vigilance, a été également inclus.

Les alkylphénols « substances pertinentes » ont été spécifiquement suivis dans un but de développer une méthode pour leur quantification alors que les autres alkylphénols, dont ceux « réglementés », ont été ajoutés pour vérifier s'ils ne représentaient pas des interférences lors de l'analyse.

5.1 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Les premiers essais ont été réalisés sur une colonne DB5-MS (30 m ; 0,25 mm ; 0,25 μ m) en mode full scan (annexe 2). Une bonne séparation chromatographique est obtenue en particulier sur la coupe des 4-NP qui est bien séparée de celle des 4-DDcP (figure 2). Les temps de rétention ainsi que les ions spécifiques aux alkylphénols sont listés en annexe 3.





Une interférence de la part des 4-t-OP1EO et 4-NP1EO se produit sur la coupe de 4-DDcP qui possède la même fenêtre de temps de rétention et le même ion de quantification (figure 3).



Figure 4 : Séparation chromatographique du 4-t-OP1EO, 4-NP1EO et 4-DDcP en GC-MS – Colonne DB5-MS

La colonne RTX 1614 (15 m * 0,25 mm * 0,1 µm) utilisée pour l'analyse des BDE, en particulier pour le BDE 209, a été testée. Elle ne permet pas non plus de séparer ces composés mais la résolution entre les autres composés est maintenue. L'injection initiale a été réalisée sur un injecteur split/splitless (S/SL). Les conditions ont été optimisées en mode pulse splitless (annexe 4). Cela a entrainé une mauvaise résolution de certains pics (trainée de pic), en particulier à cause de la présence de fonction hydroxy sur les molécules. Les limites de quantification instrumentales suivantes ont ainsi été obtenues :

NOM	ACRONYME	Tr (min)	LQ instrumentale ng/mL
4-tert-butyl-phénol	4tBuP	4,7	2*
2-tert-butyl-4-methylphénol	2tBu4mP	5,4	2*
2,6-di-tert-butyl-4-methylphénol	26dtBu4mP (BHT)	7,2	2
4-tert-octylphénol	4tOP	8,3	2*
4-sec-butyl-2,6-di-tert-butyl-phénol	4sBu26dtBuP	8,6	1
4-nonylphénol	4NP	9,2-10,2	10-20
4-dodecylphénol	4DDcP	11,2-12,2	20-50
2,6-di-tert-butyl-4-phénylphénol	26dtBu4pP	13,1	1
Bisphénol A	BPA	13,7	5*
Tétrabromobisphénol A	TBBPA	19,8	10*

Tableau 2 : Limites de quantification instrumentales en GC/MS-SIS des alkylphénols -
colonne RTX-1614 – injecteur S/SL

* Traînée de pic

Aussi, la dérivation par silylation des groupements hydroxy apparaît comme nécessaire pour améliorer la résolution chromatographique et permettre d'atteindre les objectifs de limites de quantification (d'après les estimations effectuées selon une prise d'essai de 1 g de sédiments).

5.2 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES AVEC SILYLATION

Plusieurs agents de silylation peuvent être utilisés pour dériver les fonctions hydroxy : le MSTFA, le BSTFA, le BSA, le TMSI et le HDMS. La réaction de silylation sur les alkylphénols par de tels agents permet de substituer l'hydrogène de la fonction hydroxy par un groupement triméthylsilyle (-SiMe3 ou TMS).

Dans l'étude réalisée en 2011 sur l'analyse des alkylphénols et alkylphénol éthoxylés [8], la réaction de silylation est effectuée par ajout de MSTFA, pendant 15 minutes à température ambiante en milieu acétone. Les temps de rétention ainsi que les ions spécifiques des composés silylés sont listés en annexe 4. Selon ces conditions de silylation, les pics de TBBPA et de 4-t-BuP se dédoublent.

Séparation et Interférences au niveau du 4DDcP et NP1EO

Sous forme silylée, le 4NP et le 4DDcP sont séparés. Cependant, des problèmes de coélution entre le 4-DDcP, OP1EO et NP1EO demeurent. Une sélectivité spectrométrique est donc nécessaire. L'utilisation de l'ion m/z 221 permet de réduire considérablement l'interférence provenant du OP1EO-TMS (à 0,4% du pic de 4-DDcP-TMS). La masse m/z=207 est à exclure car la contribution du OP1EO-TMS devient trop importante (à 6% du pic de 4-DDcP. Cette masse ne peut donc pas être utilisée comme ion de quantification. De même, la masse m/z= 193 est à exclure puisque OP1EO-TMS et NP1EO-TMS interfèrent. La masse m/z=179 peut être utilisée comme ion de confirmation (l'interférence de OP1EO-TMS représente encore 2% de la surface du 4-DDcP-TMS dans les conditions testées). La masse m/z=251 représentant le fragment le plus intense des OP1EO-TMS et NP1EO-TMS peut être utilisée spécifiquement pour confirmer la présence ou l'absence de ces composés.

Utilisation d'autres agents de dérivation

La réaction de silylation peut être mise en œuvre par d'autres agents de silylation (BSTFA, BSA, TMSI et HDMS) en présence ou non de catalyseurs TMCS (triméthylchlorosilane). Ces différents agents de dérivation ont été testés dans l'acétone à température ambiante pendant 15 minutes et à 60°C pendant 30 minutes.

Avec ces conditions expérimentales, des rendements de silylation de 100 % sont obtenus sur l'ensemble des AKP avec le MSTFA ou le BSTFA sauf pour le 2,6-di-t-BuP (respectivement 57% et 70%) et le 4sBu26dtBuP qui n'est récupéré qu'à 30 % et 43 % (respectivement par le MSTFA et le BSTFA) (annexe 5). Les autres agents de silylation (BSA, TMSI et HDMS à 30% TMCS) ne permettent pas de silyler tous les alkylphénols, en particulier le TMSI qui est complètement inefficace. De plus, l'ajout d'un catalyseur tel que le TMCS diminue les rendements de silylation dans le cas du MSTFA et du BSTFA.

L'influence du solvant dans la dérivation a été évaluée avec les mêmes agents de dérivation en effectuant des essais dans l'acétonitrile à la place de l'acétone. Comptes tenus des résultats précédents, l'agent de dérivation TMSI n'a pas été testé. Les essais ont été réalisés à différentes températures : à 25°C, à 60°C et à 90°C, pendant 30 minutes. L'acétonitrile permet d'obtenir des taux de silylation supérieurs à 90% pour tous les composés en utilisant le MSTFA comme agent de silylation, à une température de 90°C pendant 30 minutes (annexe 6).

Afin de diminuer la température de réaction, des essais avec un autre catalyseur, 10% de pyridine, en combinaison avec le MSTFA, ont été effectués. Ce catalyseur a permis d'obtenir des résultats satisfaisants à température ambiante avec des taux de dérivation supérieurs à 97% pour tous les composés. A 60°C, la dérivation est totale. En revanche, à 90°C, la réaction s'inverse et les taux chutent (annexe 7).

Les conditions de dérivation retenues sont donc : MSTFA (à 20% v/v) + pyridine (à 10% v/v) dans l'acétonitrile, à 60°C pendant 30 minutes. Elles permettent d'obtenir les limites de quantification instrumentales suivantes :

Nom des composés	Tr (min)	LQ instrumentale ng/mL
4-tert-butyl-phénol-TMS	5,4	2
2-tert-butyl-4-méthylphénol-TMS	6,0	2
2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol-TMS	9,2	1
4-tert-octylphénol-TMS	8,5	1
4-sec-butyl-2,6-di-tert-butyl-phénol-TMS	10,3	1
4-nonylphénol-TMS	9,2-10	10-20
4-dodecylphénol-TMS	10,6-12,5	50-100
2,6-di-tert-butyl-4-phenylphénol-TMS	14,5	1
Bisphénol A-2TMS	14,0	2
Tétrabromobisphénol A-2TMS	20,4	2

Tableau 3 : Limites de quantification instrumentales en GC/MS-SIS des alkylphénols silylés (colonne RTX-1614 – injecteur S/SL)

Par rapport aux performances obtenues sans dérivation, la forme des pics a été améliorée et les limites de quantification ont été notamment améliorée pour le BPA et le TBBPA.Dans ces conditions expérimentales, la forme des pics est affectée par la présence de pyridine (léger épaulement et trainée en début de pic). Une colonne avec des dimensions différentes permettant une pression en tête de colonne plus importante ainsi qu'un liner spécifique aux solvants d'injection ont été utilisés pour améliorer le profil des pics.

Dans un premier temps, les analyses d'étalons silylés dans les conditions retenues cidessus ont été réalisées sur une colonne ZB semivolatile (20 m x 0,18 mm x 0,18 µm) avec injection en mode splitless sur l'injecteur S/SL. Une saturation de l'injecteur est observée, provoquant un élargissement des pics.

Dans un second temps, des essais ont été réalisés en changeant de liner (volume d'expansion de 900 µl au lieu de 200 µL) puis en injectant avec une pression pulsée à 60 psi mais cela n'a pas permis d'apporter d'amélioration.

L'injection a donc été évaluée avec un injecteur PTV (*programmed temperature vaporizer* ou injecteur à température programmée). Au niveau de l'injecteur, le temps de purge et la pression en tête de colonne ont été optimisés.

L'augmentation du temps de purge (à 0,1 min au lieu de 0,05 min) entraine une perte de signal et un temps de purge trop faible (à 0,02 min) produit un accroissement du bruit de fond. Ce niveau de purge à 0,02 min est cependant favorable pour l'analyse des composés les moins volatils.

La pression en tête de colonne a été testée à 2, 10, 24,8 et 40 psi. Un niveau de 40 psi permet de réduire le bruit de fond mais aucun gain significatif n'est cependant constaté par rapport à 24,8 psi. Pour des pressions faibles (à 2 ou 10 psi), le transfert des composés vers la colonne est diminué et entraine une perte de réponse.

Le phénomène de saturation est donc éliminé par injection en PTV avec un temps de purge de 0,05 min (voire 0,02 min) et une pression de 24,8 psi en tête de colonne. Les limites de quantification instrumentales obtenues sur une analyse d'étalons silylés sont les suivantes :

NOM	Tr (min)	LQ instrumentale ng/mL
4-tert-butyl-phénol-TMS	8,2	1
2-tert-butyl-4-méthylphénol-TMS	8,8	2
2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol-TMS	10,1	1
4-tert-octylphénol-TMS	11,6	1
4-sec-butyl-2,6-di-tert-butyl-phénol-TMS	13,2	1
4-nonylphénol-TMS	12,5-13,5	10
4-dodecylphénol-TMS	14-16	50-100
2,6-di-tert-butyl-4-phenylphénol-TMS	17,7	1
Bisphénol A-2TMS	17,3	2
Tétrabromobisphénol A-2TMS	23,9	2

Tableau 4 : Limites de quantification instrumentales en GC/MS-SIS des alkylphénols silylés (colonne ZB Semivolatile – injecteur PTV)

Globalement, si les formes de pics ont été améliorées, les conditions analytiques testées n'ont pas permis d'obtenir de gain significatif des limites de quantification.

Les conditions d'analyse définies à partir d'étalons dans l'acétonitrile ont été être mises en œuvre sur des extraits de sédiments.

5.3 ESSAIS DE LA METHODE ANALYTIQUE EN MATRICE SEDIMENT

Le protocole analytique complet a été testé sur des sédiments en incluant l'étape d'extraction et de purification.

Les essais ont été effectués avec 2 méthodes différentes :

- Méthode 1 : Une méthode reprise de travaux AQUAREF menés en 2011 sur l'extraction des nonylphénols et octylphénols dans les sédiments [8]. La méthode consistait en une extraction par fluide pressurisé de type ASE avec de l'hexane/acétone (1/1) puis une purification par cartouche SPE SiOH.
- Méthode 2: Une méthode utilisée par le LPTC pour l'analyse des alkylphénols dans les sédiments lors de l'étude exploratoire 2012. Elle utilisait une extraction par micro-ondes au DCM puis une purification par cartouche SPE PSA. Ne disposant pas d'un appareil de micro-ondes adapté à l'extraction des composés organiques au moment de la mise en œuvre de ces travaux, l'extraction a été effectuée par ASE.

Les conditions de dérivation optimisées précédemment ont été utilisées pour ces 2 méthodes (MSTFA (à 20% v/v) + pyridine (à 10% v/v) dans l'acétonitrile, à 60°C pendant 30 minutes). Les méthodes utilisées sont décrites en annexe 8.

Afin de déterminer l'efficacité de ces méthodes, des essais de récupération des différents AKP étudiés ont été menés sur :

- 3 blancs de sédiments enrichis en étalons internes marqués
- 3 sédiments dopés à 400 ng en étalons et en étalons internes marqués

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 2 (dopage des extraits)
4tBuP-d13-TMS	56 ± 4 %	21 ± 15 %	110 ± 3 %
4tBuP-TMS	64 ± 5 %	28 ± 21 %	102 ± 1 %
2tBu4mP-TMS	49 ± 7 %	20 ± 25 %	104 ± 1 %
26dtBu4mP-d21-TMS (BHT-d21)	849 ± 210 %	311 ± 514 %	70 ± 9 %
26dtBu4mP-TMS (BHT)	2 ± 0,5 %	8 ± 7 %	4 ± 1 %
4sBu26dtBuP-TMS	2 ± 1 %	10 ± 1 %	2 ± 1 %
26dtBu4pP-TMS	11 ± 3 %	21 ± 36 %	45 ± 6 %
4-t-OP-13C6-TMS	67 ± 8 %	83 %	105 ± 3 %
4tOP-TMS	86 ± 12 %	165 %	101 ± 2 %
4-363-NP-13C6	91 ± 3 %	52 ± 31 %	117± 5 %
4NP-TMS	105 ± 8 %	98 ± 46 %	112 ± 2 %
4DDcP-TMS	120 ± 5 %	80 ± 27 %	112 ± 5 %
BPA-13C12-2TMS	23 ± 15 %	201 %	177 ±6%
BPA-2TMS	26 ± 6 %	132 %	177 ± 6 %
TBBPA-13C12-2TMS	346 ± 80 %	0	783 ± 30 %
TBBPA-2TMS	307 ± 42 %	1 ± 1 %	809 ± 39 %

Tableau 5 : Taux de récupération des alkylphénols testés (n=3, résultats présentés avec soustraction des blancs pour les composés cibles)

Pour les 2 méthodes, les taux de récupération obtenus ne sont pas homogènes. Ils varient entre 0% et 850%. Entre composés marqués et non marqués de la même espèce chimique, les taux récupérés sont cohérents sauf dans le cas du BHT-d21 qui possède un taux de récupération très élevé (850 et 311% selon les méthodes) alors que les composés cibles correspondants (26dtBu4mP-TMS (BHT), 4sBu26dtBuP-TMS,26dtBu4pP-TMS) ont des taux de récupération de l'ordre de 2 à 20%. Les résultats obtenus pour les 2 méthodes montrent également une grande variabilité des essais avec des coefficients de variation allant jusqu'à 210% pour la méthode 1 et 514% pour la méthode 2.

L'injection des mêmes extraits sans être dérivés (résultats détaillés non montrés), s'ils ne permettent pas d'atteindre les mêmes sensibilités qu'une méthode dérivée, ont montré que la méthode 2 semble plus efficace pour les composés cibles avec des taux de récupération de l'ordre de 50 à 100 % (dispersion entre 5 et 8%). En comparaison avec les essais avec dérivation, les taux de récupération pour les composés 4sBu26dtBuP et 26dtBu4pP sont respectivement de 51% et 82% alors qu'avec la dérivation ils étaient de 10% et 21%. Ce résultat met en évidence un problème avec la dérivation de ces composés en présence de matrices réelles.

La méthode 2 a ainsi été conservée pour les essais suivants portant sur l'influence de la présence de matrice sur la dérivation.

Afin d'évaluer l'influence de la matrice sur la parte instrumentale, des extraits ont été dopés avec des étalons déjà dérivés puis injectés (résultats non montrés). Des taux de récupération pour les composés ciblés compris entre 62 et 102% ont montré que la matrice n'avait pas une influence significative sur ce stade de l'analyse.

Les extraits ont alors été dopés puis dérivés et injectés (résultats montrés en dernière colonne du tableau 5). De faibles récupérations pour le BHT dérivé, 4sBu26dtBuP et 26dtBu4pP dérivés sont obtenues avec des taux respectifs de 4%, 2% et 45% (et des variabilités importantes liés à ces faibles récupérations) ce qui démontre que la limitation analytique pour ces composés en matrice est bien liée à cette étape de dérivation.

Enfin pour le BPA et le TBBPA natif et marqué, la réponse est en forte augmentation par rapport à l'étalon de référence montrant ainsi un effet de la matrice sur ces composés.

Globalement, ces expériences démontrent que les effets de matrice perturbent la dérivation, particulièrement pour certains composés.

Des essais supplémentaires de dérivation ont été effectués sur des extraits de sédiments avec l'augmentation de la température (à 70°C au lieu de 60°C), de la quantité de MSTFA ajoutée (25 μ L et 50 μ L au lieu de 10 μ L) ou de la durée de dérivation (60, 90, 120, 150 ou 1140 min). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des conditions de 70°C, 50 μ L d'agent dérivant pour 50 μ L d'extrait, 180 min de réaction, avec par exemple 80% de taux de récupération pour le BHT. Cependant, des variabilités encore trop importantes ont été observées, notamment avec une récupération pour ce composé de 39% avec un deuxième lot d'agent dérivant.

Les essais effectués sur les analyses des alkylphénols ciblés par extraction puis dérivation et analyse par GC/MS n'ont pas permis de produire des résultats en termes de taux de récupération et de variabilité suffisamment convenables pour pouvoir aboutir à une méthode commune acceptable pour l'ensemble des composés visés. Suite à ce constat, il a été décidé de ne pas poursuivre cette voie analytique.

6. <u>ETUDE DE L'ANALYSE DES ALKYLPHENOLS PAR</u> CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA <u>SPECTROMETRIE DE MASSE</u>

Les essais par GC/MS n'ayant pas pu aboutir à des résultats satisfaisants, une approche analytique différente, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, a été évaluée. Cette approche permet d'éviter de dériver les alkylphénols, ce qui constituait le principal frein en analyse GC/MS.

6.1 **OPTIMISATION DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES**

Lors de l'étude prospective de 2012 [2], le laboratoire LPTC a mis en œuvre une méthode d'analyse des alkylphénols dans les sédiments par chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC/TQD) comprenant 3 des 6 composés d'intérêt : le 4-tert-butyl phénol (4-t-BuP), le 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (4s26dtBuP) et le tétrabromo bisphénol A (TBBPA).

Un développement de méthode chromatographique a dû être réalisé pour intégrer les 2 composés supplémentaires que sont le 2,6-di-tert-butyl-4-phenylphenol (26dtBu4pP) et le dodécylphénol (le tétrabromobisphénol A bis (2,3-dibromopropyl éther), ne s'ionisant pas en ESI-LC/MS/MS, a été exclu). Par ailleurs, d'autres composés tels que le BPA, le 4-NP, le BHT ont été ajoutés afin d'appréhender la séparation chromatographique possible avec d'autres alkylphénols d'intérêt.

La première partie du développement analytique a été réalisée sur un couplage LC/HRMS-Q-TOF Agilent 6550. Ces essais ont été effectués en mode MS scan avec une précision en masse inférieure à 5 ppm. L'ionisation des alkylphénols est obtenue en mode electrospray en polarité négative (ESI-neg). Les conditions de chromatographie liquide utilisées sont décrites en annexe 9. Les conditions chromatographiques suivies par le LPTC ont été reproduites sur la colonne Acquity C18 (50 x 2,1 mm ; 1,7 μ m) (Waters). La coupe de 4-nonylphénol et le 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol ne sont alors pas séparés dans ces conditions. Le 4-dodécylphénol n'est également pas séparé du 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphénol (annexe 10 – A). De plus, leurs masses exactes sont identiques, ce qui ne permet pas d'obtenir une sélectivité spectrométrique sur un analyseur temps de vol :

Nom des composés	Acronyme	Formule brute	Masse exacte
4-tert-butylphénol	4tBuP	$C_{10}H_{14}O$	150,10447
2,6-di-tert-butyl-4-phenylphenol	26dtBu4pP	C ₂₀ H ₂₆ O	282,19837
Bisphénol A	BPA	$C_{15}H_{16}O_2$	228,11503
4-dodécylphénol	4-DDcP	C ₁₈ H ₃₀ O	262,22967
4-sec-butyl-2,6-di-tert-butyl-phenol	4sBu26dtBuP	C ₁₈ H ₃₀ O	262,22967
Tétrabromobisphénol A	TBBPA	$C_{15}H_{12}Br_4O_2$	539,75708

Tableau 6 :	Noms e	t masses	exactes	des alk	vlphénols
rabioaa o .	1101110 0	111111111111111111111111111111111111111	0///0/00	acc and	, 101101010

Une seconde colonne a été testée, la colonne Kinetex C18 (2,1 x 100 mm ; 2,6 μ m) – Phenomenex. Le profil et la séparation chromatographique obtenus sont très proches de celui obtenu sur la colonne Acquity C18, même si les temps de rétention sont sensiblement différents. Les pics sont plus fins avec cette colonne (annexe 10 - B).

Une autre condition analytique utilisée en tant que méthode générique à l'INERIS a été testée sur cette famille de composés. La colonne utilisée était une colonne ZORBAX SB-Aq 2,1 x 150 mm ; 1,8 μ m – Agilent. Ces conditions n'ont pas permis de résoudre le problème de coélution entre le BHT et le 4-NP, et entre le 4-DDcP et le 4sBu26dtBuP qui sont partiellement séparés (annexe 10 - C). Afin de tenter de séparer ces 2 composés, une modification du gradient a été testée (annexe 9). Les pics obtenus sont plus fins, et les coupes d'isomères du 4-nonylphenol et du 4-dodecylphenol peuvent être distinguées (annexe 10 – D). Un autre gradient plus long en temps a été testé (annexe 9, conditions n°2) ce qui a permis d'améliorer la séparation mais au détriment d'un élargissement des pics. Le 4-dodécylphénol et le 4sBu26dtBuP sont légèrement mieux séparés, mais sans retour à la ligne de base (Annexe 10 – E).

Les alkylphénols possédant un groupement aromatique, des colonnes de type phénylhexyl ont été évaluées pour tenter d'améliorer leur séparation (Luna Phenyl-Hexyl 150 x 4,6 mm ; 3 µm - Phenomenex) ou Pentafluorophenylpropyl (Discovery HS-F5, 150 x 2,1mm ; 3µm - Supelco). Sur la colonne Luna phényl-hexyl, les conditions de gradient ont été adaptées par rapport à celles suivies sur la Zorbax SB-Aq pour tenir compte du fait que la colonne phényl-hexyl ne peut pas supporter 100 % de phase aqueuse (annexe 9). Les pics alors obtenus sont moins bien résolus que sur la colonne Zorbax SB-Aq (annexe 10 - F). Avec la colonne Discovery HS-F5, 9 pics ont été obtenus, chacun pour un composé distinct sauf dans le cas du 4-DDcP et du 4-sec-Bu2,6-ditertBuP où la séparation n'est pas totale (annexe 10 - G).

Aucune des colonnes testées n'a permis de séparer chromatographiquement tous les alkylphénols testés. La meilleure séparation est obtenue avec la colonne Zorbax SB-Aq selon les conditions de la méthode standard (annexe 9) où seule une co-élution forte persiste entre le 4-NP et BHT et partielle entre le 4-DDcP et le 4sBu26dtBuP.

6.2 PARAMETRES DE DETECTION ET PERFORMANCES ANALYTIQUES PAR LC/TQD

Afin de se rapprocher des pratiques et instruments utilisés par les laboratoires prestataires et obtenir une solution technique aux problèmes de co-élution observés avec le LC/QTOF, les analyses ont été effectuées sur LC/triple quadripôle (TQD) (Acquity, Waters). Les transitions spécifiques (MRM) de chaque composé ont été d'abord déterminées en ESI-neg. Les conditions d'ionisation sont présentées en annexe 11. Pour le 4-tert-ButylPhénol, aucune transition de qualification n'a pu être détectée : la transition de qualification retenue par le LPTC sur le spectromètre de masse TQD Agilent 6490 (MRM 149 ua > 117 ua) ne fournit pas de signal sur le spectromètre de masse TQD Acquity. Par ailleurs, une étude de la littérature [9] cite une autre transition possible : 149 ua > 120 ua, obtenue en présence d'un tampon acétate d'ammonium (1 mM), sur un spectromètre de masse 1100 LC-MSD Trap – Agilent. Cette transition ne fournit également pas de signal sur le TQD Waters Acquity.

Pour cette partie, la séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Kinetex-C18, identique à celle testée sur le couplage LC/Q-TOF et qui a montré une bonne finesse de pics. Le problème de coélution de pics entre le 4-dodécylphénol et le 4sBu26dtBuP observé sur le LC/Q-TOF est résolu par la séparation spectrale possible sur le TQD à partir de MRM spécifiques (annexe 11). Compte tenu de la sélectivité spectrométrique, le gradient a été adapté (raccourci) en modifiant les conditions initiales, la pente de gradient et le débit (annexe 9 – Conditions TQD). L'analyse LC/MS/MS obtenue sur un étalon à 50 ng/mL (EMQ/MeOH (70:30)) est présentée ci-dessous :



Figure 5 : Analyse LC/MS/MS des alkylphénols « substances pertinentes » - Kinetex C18 avec LC/TQD

Une différence de sensibilité, d'un facteur 4 à 10, a été observée entre le LC/Q-TOF, plus sensible, et le LC/TQD. Les appareils de type TQD sont généralement plus sensibles que les Q-TOF. Cependant, dans notre cas, l'appareil LC/Q-TOF est de dernière génération (acquis en 2016) et le LC/TQD date de 2009. La différence de sensibilité a été partiellement compensée en augmentant le volume d'injection de 5 μ L (LC/Q-TOF) à 20 μ L (LC/TQD). Une comparaison des performances instrumentales est présentée en tableau 7.

	LC/TQD Acq	uity Waters	LC/Q-TOF 6	550 Agilent	
	Domaine de linéarité (ng/mL)	LQ instrumentale (ng/mL)	Domaine de linéarité (ng/mL)	LQ instrumentale (ng/mL)	
Volume d'injection	20	μL	5 µL		
BPA	2 -200	2	2 à 400	2	
4tBuP	10 – 200	10	10 à 300	10	
ТВВРА	2 – 200	2	1 à 400	1	
4 DDcP	5 – 200	5	1 à 500	1	
26dtBu4pP	10 – 200	10	2 à 400	2	
4sBu26dtBuP	5 – 200	5	2 à 500	2	

Tableau 7 : Performances instrumentales obtenues par LC/TQD et LC/Q-TOF sur l'analyse des alkylphénols « substances pertinentes »

6.3 STABILITE DES ETALONS

L'étude de la stabilité d'un étalon à 200 ng/mL conservé à 4°C a été effectuée à 3 dates : temps initial (T0), après 1 jour (T1) et 5 jours (T5) sur le couplage LC/TQD. Une chute de signal d'un facteur 10 pour le 4-sec-2,6-di-tert-butylphénol et une augmentation du 4-tert-butyl-phénol de 20% sont observés alors que les autres composés sont stables à ±10%. La réponse obtenue pour chacun des composés est normalisée par rapport au signal obtenu à T0 (figure 5) :



Figure 6 : Stabilité de la réponse d'un étalon à 200 ng/mL du 4tBuP

La baisse importante constatée pour le 4-sec-2,6-di-tert-butylphénol semble indiquer une instabilité de ce composé dans le solvant utilisé par rapport aux autres composés dont la réponse est globalement stable.

6.4 ETUDE SUR LE TRAITEMENT D'ECHANTILLONS

Les expériences suivantes ont été réalisées sur la colonne Kinetex-C18 selon les conditions chromatographiques décrites en annexe 9 (conditions TQD) sauf pour les premiers essais sans purification et les essais de purifications sur gel de silice qui ont été réalisés sur le LC/Q-TOF, sur la colonne Zorbax selon les conditions standards (annexe 9 – Méthode standard).

Des étalons internes ont été utilisés à partir de l'étude de comparaison de rendement avec et sans purification sur PSA (3.1.3). Pour certains alkylphénols, les étalons internes spécifiques n'étaient pas disponibles (4-sec-Bu-26dtBuP, 4-phényl-26dtBuP, 4-DDcP).

Les étalons internes ont été attribués à chaque composé en fonction de leur temps de rétention en LC, qui doit être le plus proche du composé d'intérêt. La concentration en étalon interne a été adaptée au domaine de travail :

	Etalon Interne attribué	Concentration d'étalon interne (extrait final ou étalon) ng/mL
BPA	BPA ¹³ C ₁₂	50
4-t-BuP	4-t-BuP-D ₁₃	200
ТВВРА	TBBPA ¹³ C ₁₂	50
26dtBu4pP		
4sBu26dtBuP	4-363-NP- ¹³ C ₆	30
4-DDcP		

Tableau 8. Liste des étalons internes marqués attribués

6.5 ESSAIS SUR LA PURIFICATION DE L'EXTRAIT

6.5.1 Analyse sans étape de purification

Aucune étape de purification n'est utilisée dans la méthode développée dans les sédiments par le LPTC concernant l'analyse en ESI en mode négatif (ce qui est le cas des composés analysés dans cette étude).

Des analyses d'extraits de sédiment non enrichis et enrichis (300 ng/g) ont été réalisées (sans mise en œuvre d'étape de purification). Le sédiment (10 g) a été extrait au dichlorométhane (60 mL) par agitation pendant 10 min, puis l'extrait a été concentré à 5 mL. Afin d'analyser l'impact de la matrice sur l'ionisation des composés, l'extrait de sédiment (150 μ L d'extrait (qui correspond à 0,3 g de sédiment extrait), après concentration à sec, était repris par 90 μ L de MeOH et 900 μ L d'eau ultrapure puis dopé par 10 μ L d'une solution à 10 ng/ μ L d'alkylphénols dans le méthanol).

Les résultats sont présentés dans le Tableau 9. Des teneurs en 4-tert-butylphénol (79 ng/g) et BPA (100 ng/g) ont été observées dans les analyses d'extrait de sédiment non enrichis. Ces valeurs ont été soustraites aux teneurs des extraits de sédiment enrichis. Dans le cas du 4-tert-butylphénol, la valeur déterminée dans le sédiment est proche de la valeur d'enrichissement ce qui a probablement entrainé un biais dans le calcul de la récupération de ce composé (déterminée à 24% en moyenne). Un biais positif de signal sur le 4-DDcP dans les extraits dopés est observé menant à un rendement moyen de 439% alors que l'extrait non dopé ne montre pas de présence élevée de 4-DDcP pouvant expliquer ces rendements. Par ailleurs, le suivi de réponse des étalons de 4-DDcP sur les séquences analytiques obtenues sur le LC/Q-TOF montrent une chute de signal (annexe 12).

Tableau 9 :	Taux de	récupération	des alkvlphénols	sans purification*

Récupération (%) corrigé du blanc sédiment							
	BPA	4-t-BuP	TBBPA	4-DDcP	26dtBu4pP		
Moyenne (n=3)	90%	24%	76%	439%	73%		
CV (n=3)	2%	2%	2%	1%	4%		

* Le 4-sec-2,6-di-tert-butylphénol n'a pas été inclus pour ces expériences car sa détection était masquée par celle du 4-DDcP.

Les résultats obtenus ont conduit à effectuer des essais de purification du sédiment afin d'étudier si l'ajout de cette étape pouvait améliorer l'ionisation des composés visés. En effet, la présence de composés polaires tels que les acides humiques pourrait avoir interféré pour l'analyse du 4-DDcP et du 4-tert-butylphénol.

6.5.2 Purification sur cartouche SPE de silice (SiOH)

De précédents essais effectués au laboratoire sur la mesure des AKP (4-t-OP et 4-NP), AKP polyéthoxylés (NP1EO, NP2EO, OP1EO et OP2EO) et BPA dans les sédiments [8] ont abouti à une méthode de purification sur gel de silice. L'approche d'une purification par de la silice a été testée sur cette nouvelle liste de composés.

Les premiers essais (n = 3), menés sur des étalons (entre 100 et 400 ng/L suivant les composés) ont eu pour objectif de déterminer les fractions et solvants d'élution de chaque composé suivi. Un essai en solvant non enrichi a été également réalisé afin de s'assurer de l'absence de pollution.

La purification est réalisée sur une cartouche de silice (500 mg – 3CC) par chargement avec 1 mL d'hexane/acétone (9 : 1) enrichi ou non en composés d'intérêt puis récupération de l'exhaure de chargement (fraction 1), élution par 2 fois 5 mL d'hexane (fractions 2 et 3) et 2 fois 5 mL d'acétone (fractions 4 et 5). Chaque fraction est concentrée à sec sous azote, reprise par 100 μ l de MeOH (Vortex) puis 900 μ l d'eau MilliQ (Vortex) pour être analysée selon les conditions A.





Figure 7 : Résultats des tests de purification sur SiOH

Une répartition des composés dans les fractions en fonction de leur polarité est observée : les plus polaires (4-tert-butylphénol et TBBPA) sont piégés sur la silice puis élués dans l'acétone, les plus apolaires (4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphénol, et 2,6-di-tert-butyl-4-phénylphénol) sont moins retenus et élués par l'hexane. Le 4-DDcP qui est un mélange de nombreux isomères se répartit à 45 % sur la phase acétone et à 22 % sur la phase hexane.

Afin d'affiner la purification, des fractions de polarité intermédiaire ont été mises en œuvre avec des mélanges hexane/acétone (9:1) ou (7,5:2,5). Ainsi les composés interférents plus apolaires sont éliminés dans la première fraction (hexane) et les plus polaires sont retenus sur la cartouche et élués dans la dernière fraction (100% acétone).

La seconde méthode testée est donc : chargement avec 1 mL d'hexane/acétone (9:1) enrichi de composés d'intérêt puis récupération de l'exhaure de chargement avec le 1er rinçage de 5 mL d'Hexane (fraction 1), élution par 5 mL Hexane/Acétone 9:1 (fraction 2), élution par 5 mL Hexane/Acétone 7,5:2,5 (fraction 3) enfin élution par 2x5 mL Acétone (fractions 4 et 5). Chaque fraction est concentrée à sec sous azote puis reprise par 100 µl de MeOH (Vortex) puis 900µl d'EMQ Vortex).



Figure 8 : Résultats des tests de purification sur SiOH après modification des fractions d'élutions

La récupération des composés est la suivante :

- Les plus apolaires (4sBu26dtBuP; 26dtBu4pP et 4DDcP) en phase Hexane 100% et Hexane/Acétone (9 :1).
- Les plus polaires en phase Hexane/Acétone (7,5 :2,5) avec un bon taux de récupération pour le BPA (95 %), un taux de récupération moyen pour TBBPA (58%) et un faible taux de récupération pour le 4tBuP récupéré en F2 (21%) mais pas en F3 qui a une force d'élution plus polaire.
- Aucun composé n'est récupéré en phase 100 % acétone, les composés d'intérêt sont donc séparés et élués avant les composés les plus polaires (retenus sur la cartouche ou élués en phase acétone).L'essai non enrichi ne montrant pas de présence de 4-DDcP, les résultats de rendement élevé du 4-DDcP (146 %) peuvent être expliqués par l'observation d'une dérive de signal importante sur les injections d'étalons de contrôle au cours de la séquence d'analyse (annexe 12). Une dérive progressive du signal pouvant être attribuée à un encrassement du système analytique est également observée sur 2 autres composés : le 2,6-ditertbutyl-4-phénylphénol et le 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphénol.

6.5.3 Purification sur cartouche SPE PSA

La méthode développée par le LPTC sur les alkylphénols incluait une division de l'extrait avec une partie des composés, analysés en mode ESI négatif et sans purification et une autre partie (les alkylphénols éthoxylés) analysés en mode positif avec mise en œuvre d'une étape de purification. Ce protocole de purification était effectué sur des cartouches SPE Bond Elut - PSA 500 mg-3cc (Agilent) (PSA= primary and secondary amines). Compte tenu des faibles taux de récupération obtenus pour le 4-tert-butylphénol et le TBBPA par purification sur SPE SiOH, cette purification a été testée.

Le conditionnement de la cartouche a été mis en œuvre par passage de 3 mL de méthanol puis 3 mL de mélange dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v). L'échantillon est déposé en tête de colonne (après reprise de l'extrait dans 2 mL d'un mélange dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v) puis l'élution est réalisée avec 10 mL d'un mélange dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v).

L'extrait est concentré sous flux d'azote à 40°C et repris par 150 µL de méthanol puis ajout de 350 µl d'eau ultrapure (EMQ).

Les premiers essais ont été réalisés sur un étalon préparé dans un mélange dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v) aux teneurs correspondant à 80 % du domaine de linéarité (n=3) ainsi que sur un mélange non enrichi (n=3), en présence d'étalons internes (entre 10 et 100 ng/mL). Ni le TBBPA ni son homologue marqué ne présentent des taux de récupération élevés. Les autres composés le sont avec un rendement compris entre 77 % (4-DDcP) et 136 % (4sBu26dtBuP) :

Tableau 10 : Rendement des alkylphénols lors de la purification sur PSA sur une solution étalon

			Render	ment (%)		
	BPA	4-tert- butylphenol	TBBPA	4DDcP	4sBu26dtBuP	26dtBu4pP
Moyenne (n=3)	98%	114%	Pas de	77%	136%	113%
CV (n=3)	2%	10%	récup	6%	24%	3%

Des essais ont ensuite été réalisés sur des sédiment enrichis à la LQ visée (5 ng/g pour BPA, TBBPA et 4-DDcP, 10 ng/g pour le 26dtBu4pP et 4sBu26dtBuP et 20 ng/g pour le 4tBuP), à 2 fois la LQ visée et à 80 % du domaine de linéarité (80 ng/g pour BPA, TBBPA, 4-DDcP, et 26dtBu4pP et 160 ng/g pour 4sBu26dtBuP et le 4tBuP). Aucun blanc de sédiment n'a été réalisé pour ces essais. Afin de ne pas apporter de biais provenant de la variation de rendement de l'étape d'extraction des échantillons, tous les extraits d'une même concentration d'essai ont été réunis puis divisés en 2 : l'un pour analyse sans purification et l'autre avec purification PSA.

				oodiin	Rene	dement (%)			
				1 tort		(n=2)	4 606	2.6 di tort	
			BPA	butylphenol	TBBPA	4DDcP	Bu2.6dtBuP	Bu4pP	
	LQ	Moyenne	528%	151%			67%		
F. due las		CV	16 %	1 %		Non	(n=1)	Νουπόσμο	
Extraits	2xLQ	Moyenne	200%	124%	Non	récupéré	32%	Non recupere	
DCA		CV	3 %	3 %	récupéré		(n=1)		
гзя	80 %	Moyenne	111%	89%		48%	29%	33%	
	(n=2)	CV	2 %	2 %		(n=1)	(n=1)	(n=1)	
	LQ	Moyenne	293%	122%	105%	140%	720%	136%	
F. due las		CV	15%	3 %	2 %	8%	2 %	7 %	
Extraits	2xLQ	Moyenne	137%	94%	105%	128%	745%	154%	
nurifiós		CV	1 %	2 %	15 %	2%	10 %	20 %	
purmes	80 %	Moyenne	100%	82%	96%	121%	666%	117%	
		CV	1%	4 %	1%	6%	4 %	6 %	

Tableau 11 : Rendement des alkylphénols lors de la purification sur PSA sur des extraits sédiment

Une pollution en BPA plus importante a été observée avec l'utilisation d'une étape de purification (comparée à sans étape de purification) ce qui ne permet pas d'opérer à la limite de quantification visée ni à 2 fois la LQ visée. Une pollution en 4-tert-BuP est constatée sur les essais avec purification à la LQ et 2xLQ visée. Il n'y a pas de récupération de TBBPA sur les extraits purifiés, comme déjà observé sur les essais étalons. Après purification, le 4-DDcP et 2,6-di-tertBu4pP ne sont récupérés respectivement qu'à 48 % et 33 % sur les essais à 80 % du domaine de travail, aucune récupération n'est observée à la LQ et 2xLQ. Un biais positif très important (de 666 % à 745 %) est obtenu pour le 4-sec-butyl-2, 6-di-tert-butylphénol sur les extraits non purifiés. En raison de ces divers éléments, cette méthode de purification n'a pas été retenue pour la suite des essais.

6.5.4 Conclusion sur les essais de purification

Les essais de purification par cartouche SPE SiOH et cartouche SPE PSA n'ayant pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants, il a été décidé, en cohérence avec la méthode du LPTC, de poursuivre les travaux sans mettre en œuvre d'étape de purification.

6.6 EXTRACTION AUX MICRO-ONDES

L'extraction aux micro-ondes a été sélectionnée car ce mode d'extraction avait été utilisé par le laboratoire LPTC pour l'analyse de ces composés. Le micro-ondes MARS 6 – CEM, utilisé au laboratoire pour des analyses inorganiques, a été configuré en mode solvant avec l'installation d'un capteur de solvant. Les conditions d'extraction suivies dans un premier temps sont celles de la méthode du LPTC. Aucune purification n'est mise en œuvre.

L'extraction aux micro-ondes a été réalisée sur un 1 g de sédiment lyophilisé contenant chacun 1 barreau aimanté et 30 mL de DCM. Des essais avec des sédiments non dopés et dopés avec ~200 ng/g/composé ont été réalisés. Les sédiments ont été également dopés en étalon interne (~15 ng/g à 100 ng/g). Entre chaque étape d'extraction MAE d'une même méthode, le solvant a été récupéré par filtration sur laine de quartz en prenant garde à perdre un minimum de sédiment resté dans le matras. Pour cela il est nécessaire de bien laisser décanter l'extrait (10 min de décantation sont suffisantes) et de manipuler le matras sans à-coup, en versant son contenu lentement et en une seule fois sur l'entonnoir qui contient de la laine de quartz. Les extraits sont ensuite concentrés par évaporation du solvant et repris par 150 μ l de MeOH puis 350 μ L d'eau ultrapure (volume final = 0,5 mL).

De faibles teneurs (< 2 ng/g) ont été observées sur le 4-t-BuP et le BPA sur les échantillons non dopés.

Selon cette méthode, de faibles taux de récupération ont été obtenus, compris en moyenne entre 5% (4-sec-2,6-di-tert-butyl-Phénol et 4-phényl-2,6-di-tert-butyl-Phénol) et 18 % (4-tert-ButylPhénol). Même avec correction des étalons internes, les rendements de ces 2 composés sont faibles, respectivement à 34 et 40%. Pour les autres composés, les récupérations sont également faibles, entre 5 et 13 % mais les étalons internes arrivent à compenser efficacement les pertes subies lors du protocole analytique (rendements entre 86 et 112%).

	2,6-di- butyl phénylP	tert- -4- Phénol	тве	PA	4-DD	сP	4-sec-2 tert-bi Phéi	2,6-di- utyl- nol	BF	PA	4-tert-But	ylPhénol
	Récup	Rdt	Récup	Rdt	Récup	Rdt	Récup	Rdt	Récup	Rdt	Récup	Rdt
Moyenne (n=4)	5%	40%	13%	100%	13%	86%	5%	34%	10%	100%	18%	112%
Ecart type (n=4)	1%	3%	1%	2%	2%	3%	2%	2%	1%	7%	5%	8%

Tableau 12 : Taux de Récupération (Récup) et Rendements (Rdt) des alkylphénols par
extraction MAE selon la méthode LPTC.

Deux pistes de développement ont ainsi été envisagées : changer de solvant ou augmenter la durée d'extraction. Des solvants d'extraction alternatifs ont été sélectionnés à partir de la bibliographie [10] qui indiquait que le MeOH et le mélange Hexane-Acétone (1 :1) étaient les solvants les mieux adaptés pour l'extraction des alkylphénols. Ces 2 solvants d'extraction ont été comparés avec des extractions par DCM.

Comme pour le DCM (Pt. eb = 40°C, T°extr =80°C), la température d'extraction du MeOH a été fixée à 200% de la température de son point d'ébullition (Pt.eb = 65°C), soit à 130°C. Celle du mélange hexane/acétone a été reprise des travaux de Liu *et al.*, 2014 [10] et utilisée à 110°C. Le palier de température est fixé à 15 min. Les méthodes testées sont détaillées en annexe 13.



Figure 9 : Taux de récupération pour différentes durées et différents solvant d'extraction par MAE

La comparaison des essais de différents temps d'extraction avec le DCM (5 et 15 min) ont mis en évidence qu'une augmentation de la durée permettait d'améliorer les taux de récupération. La durée de 15 minutes a donc été retenue pour la suite des analyses.

La comparaison des extractions effectués avec différents solvants montrent que de meilleurs taux de récupération sont obtenus :

- avec le DCM pour 3 composés : 4-sec-butyl-2,6-ditertbutylphénol (77%), le 4 tertbutylphénol (48%), le 4-DDcP (29 %)
- avec le mélange hexane/acétone (1 :1) également 3 composés : le 4-phényl-2,6di-tert-butyl-Phénol (60%), le BPA (67%) et le TBBPA (64%).
- que le méthanol n'a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats par rapport aux autres solvants testés.

Les essais d'extraction suivants ont été mis en œuvre en fonction :

- de la polarité des mélanges hexane/acétone
- de la combinaison des extractions par du DCM et de l'hexane/acétone (1 :1).

Deux méthodes différentes ont été effectuées :

- Une première méthode (Annexe 13 Méthode 1) qui combine des extractions successives avec un mélange hexane/acétone dans deux proportions de polarité différentes : v/v (1 :3) puis v/v (3 :1).
- Une seconde méthode (Annexe 13 Méthode 2) qui combine des extractions successives au DCM et à l'hexane/acétone (1 :1).

Pour ces essais de comparaison, les pertes de signal analytique sur l'ionisation, dues à l'effet de matrice, ont été pris en compte en calculant les taux de récupération d'extraction par rapport à un étalon préparé dans un extrait matrice vierge. Les résultats de récupération des étalons internes sont également présentés (tableau 13) :

	Méthode 1 hexane/acétone (1 :3) et (3 :1) (n=3)	Méthode 2 hexane/acétone (1:1) et DCM (n=3)
BPA	70 ± 16	84 ± 6
BPA- ¹³ C ₁₂ EI	70 ± 19	87 ± 6
4-tert-butylphenol	57 ± 2	42 ± 5
4-tert-butylphenol-d ₁₃ El	56 ± 11	48 ± 4
ТВВРА	54 ± 19	78 ± 11
TBBPA- ¹³ C ₁₂ EI	50 ± 18	87 ± 14
4 DDcP	69 ± 21	93 ± 6
26dtBu4pP	56 ± 26	89 ± 3
4sBu26dtBuP	35 ± 11	42 ± 13
4-363-NP13C12 EI	57 ± 25	92 ± 2

Tableau 13 : Taux de récupération (%) obtenus par extraction MAE corrigé de l'effetmatrice

Globalement, de meilleurs taux de récupération sont obtenus avec la méthode 2. Seuls le 4-tert-butylphénol et son homologue marqué sont moins bien récupérés (respectivement 42% et 48% contre 57 % et 56% avec la méthode 1). Pour ce composé, une bonne sensibilité instrumentale est obtenue, à 10 ng/mL (Tableau 7) par rapport à la LQ ciblée (correspondant à une LQ dans l'extrait sédiment de 40 ng/mL). Ainsi, un taux de récupération à ~40% peut être utilisé pour ce composé car il n'empêche pas l'atteinte de la LQ exigée.

Le choix de l'étalon interne pour le 4sBu26dtBuP a été changé, en remplaçant le 4-363-NP13C12 initialement retenu par le 4-tert-butylphenol-d13 car le taux de récupération obtenu pour ce composé est plus proche de celui du 4sBu26dtBuP.

6.7 ESSAIS EN MATRICE AUX LIMITES DE QUANTIFICATION CIBLEES

Des essais aux différentes limites de quantifications ciblées ont été réalisés par extraction au micro-ondes selon la méthode 2 sans purification.

Les extractions ont été réalisées sur des sédiments vierges et enrichis à 5, 10 et 20 ng/g (n=3). Les étalons internes marqués sont ajoutés avant extraction à 25 ng pour le BPA 13C12 et le TBBPA 13C12 ; à 12,5 ng pour le 4-363-NP-13C6 et à 100 ng pour le 4-t-BuP-D13.

Tableau 14 : Rendements de la méthode aux limites de quantifications ciblées (corrigés
du blanc) (so : valeur cible plus basse que les limites de quantification atteignables , nd :
non détecté)

Rendement corrigé du blanc (%) (n=3)											
Valeur cible (ng/g)	BPA	4-tert- butylphenol	ТВВРА	4 DDcP	2.6-di-tert- Bu4pP	4-sec-Bu-2,6- ditertBuP					
5	116% ± 13 %	SO	94% ± 22 %	97% ± 6 %	SO	SO					
10	128% ± 11 %	SO	107% ± 1 %	96% ± 1 %	120% ± 7 %	55% ± 6 %					
20	105% ± 2 %	90% ± 18 %	93% ± 6%	90% ± 1 %	122% ± 5 %	32% ± 8 %					
Blanc ng/g	2,4 ± 0,1	nd	nd	0.4 ±0.2	nd	nd					

Les rendements obtenus pour le BPA, 4-tert-butylphénol, TBBPA, 4-DDcP, 26dtBu4pP sont compris entre 90 et 120 % à la LQ ciblée. La pollution en 4-tert-butylphénol, à 79 ng/g lors des premiers essais sans purification (3.1.1) n'est plus observée ici. Les premiers essais ayant été effectués par LC/Q-TOF (contre la LC/TQD ici), cette pollution était d'ordre instrumentale et probablement située au niveau du port d'injection.

Les rendements obtenus sur le 4sBu26dtBuP (55% à la LQ ciblée), corrigés de l'étalon interne, restent relativement faibles. Un encrassement du cône de la source d'ionisation a été observé après ces analyses qui a dû entraîner une différence de comportement (d'ionisation) entre le 4sBu26dtBuP et son étalon interne (4-tert-butylphenol-d13) car ces 2 composés sont relativement éloignés en termes de temps de rétention chromatographique.

6.8 ESSAIS EN CONDITIONS DE FIDELITE INTERMEDIAIRE

Les essais suivants ont été réalisés en conditions de fidélité intermédiaire (traitement d'échantillon effectué sur des jours différents et un même opérateur) sur un échantillon de sédiment dopé à 4 niveaux de concentration différentes : la limite de quantification visée, 2 fois la limite de quantification et à 20% et 80 % du domaine de travail.

Un blanc d'essai a été réalisé en triplicat. Seule une pollution en BPA a été constatée, à 6,4 ±2,0 ng/g (n=3). Cette valeur est comprise entre la LQ (5 ng/g) et 2XLQ (10 ng/g), ce qui explique le biais de rendement à ces niveaux pour ce composé.

Les résultats sont présentés ci-dessous, sans correction des valeurs de blancs.

	LQ (n=3)		2XLQ (n=2)		20 % du domaine (n=2)		80 % du domaine (n=2)	
	Rendement	CV (%)	Rendement (%)	CV (%)	Rendement (%)	CV (%)	Rendement (%)	CV (%)
BPA	152%	4%	167%	32%	107%	1%	102%	0%
4tBuP	87%	8%	96%	13%	117%	1%	104%	8%
ТВВРА	117%	16%	103%	16%	98%	1%	86%	5%
4-DDcP	66%	4%	60%	14%	48%	10%	67%	4%
4sBu26dtBuP	26%	17%	24%	52%	21%	29%	28%	38%
26dtBu4pP	65%	2%	64%	9%	49%	39%	78%	1%

Tableau 15 : Rendements de la méthode (non corrigés du blanc)

De bons rendements, compris entre 87 % et 117 % pour le 4-tert-butylphénol et entre 86 % et 117 % pour le TBBPA, sont obtenus sur l'ensemble du domaine de concentrations. En revanche pour les composés qui sont élués le plus tardivement de la colonne analytique : le 4-DDcP et le 26dtBu4pP, les rendements sont plus bas, compris entre 48 % et 67 % pour le 4-DDcP et 49 % et 78 % pour le 26dtBu4pP.

Ces résultats peuvent être mis en corrélation avec l'usage d'étalons internes spécifiques (dilution isotopique). En effet, les 3 composés pour lesquels des résultats satisfaisants ont été obtenus sont ceux où un étalon interne spécifique a été utilisé. Les composés pour lesquels un étalon interne marqué isotopiquement n'a pu être utilisé (car non trouvé auprès des fournisseurs d'étalons internes) ont fournis des résultats moins bons.

Concernant le 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphénol, les rendements sont bas, entre 21 % et 28 % sur l'ensemble du domaine. Pour ce composé, comme observé et indiqué en 2.3.4, une chute de réponse sur les étalons de contrôle du 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butylphénol a été observée par rapport à ceux analysés en fin de séquence, après 12 analyses d'extraits de sédiments ce qui semble également indiquer des problèmes de stabilité :



Figure 10 : Evolution de la réponse du 4-sec-Bu-2,6-di-tert-Butylphénol au cours d'une séquence analytique

La correction de réponse par l'étalon marqué non spécifique de ce composé, le 4-tertbutylphenol-d13, ne permet pas de corriger cette variation de signal car sa réponse ne change pas au cours de la séquence d'analyse.
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'arrêté du 7 août 2015 a introduit 6 alkylphénols (ou assimilés alkylphénols) dans la surveillance régulière des milieux aquatiques.

Le tétrabromobisphenol A bis (2,3-dibromopropyl éther) n'a pas pu être inclus dans les méthodes LC/MS ou GC/MS développées pour les autres alkylphénols. Son analyse exige une méthode spécifique. Au vu des contraintes analytiques importantes pour sa mesure (forte hydrophobicité, non ionisable en LC/MS, poids moléculaire trop élevé pour être analysable en GC/MS), une réflexion doit être menée par rapport à son importance et son maintien dans le suivi réglementaire.

Pour les autres AKP, des essais ont été menés en GC/MS afin de développer une méthode compatible avec l'analyse des alkylphénols déjà réglementés. Malgré des optimisations effectuées au niveau de l'analyse chromatographique et de l'étape de dérivation, les essais en matrices réelles n'ont pas permis de proposer une méthode satisfaisante pour l'ensemble des composés visés en raison des effets de matrice, principalement lors de l'étape de dérivation.

Sur la base de la méthode mise en œuvre lors de l'étude prospective, une étude a également été effectuée par extraction par micro-ondes et analyse par LC/MS. Les limites de quantification réglementairement exigées ont pu être atteintes par couplage LC/MS-TQD.

L'extraction par micro-ondes avec 2 extractions successives, une par un mélange hexane/acétone (1:1) et l'autre par du DCM, a permis d'obtenir les meilleures performances. Les méthodes de purifications mises en œuvre n'ont cependant pas pu fournir des résultats concluants pour l'ensemble des substances visées.

Les rendements obtenus par essais sur sédiments sans purification sont satisfaisants pour le 4-tert-butylphénol (compris entre 87 % et 117 %) et pour le tétrabromobisphénol A (compris entre 86 % et 117 %). Pour le 4-dodécylphénol et le 2,6-di-tert-butyl-4-phenylphenol, des rendements plus faibles, aux alentours de 60% ont été obtenus qui peuvent être partiellement expliqués par l'absence d'une étalon interne marqué spécifique.

En perspective, pour ces 2 composés, des travaux spécifiques pourraient être menés afin soit de déterminer un étalon interne plus adapté, soit de développer un protocole spécifique de mesure.

Pour le 4-sec-butyl-2,6-di-tert-butyl-phenol, des rendements faibles ont été observés (entre 21 et 28%). Pour ce composé, les différents résultats obtenus semblent indiquer un problème de stabilité des étalons et de ce composé dans les extraits (en plus d'un manque d'étalon interne marqué spécifique). Des études spécifiques de stabilité pourraient ainsi être menées sur ce composé.

8. <u>REFERENCES</u>

[1] Directive n° 2013/39/UE du 12/08/13 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau

[2] F. Botta, V. Dulio, Résultats de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents dans les eaux de surface continentales de la métropole et des DOM. Rapport INERIS, 2014

[3] Arrêté du 7 août 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement

[4] Avis relatif aux limites de quantification des couples « paramètre-matrice » de l'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques, 14 avril 2018

[5] NF EN ISO 18857-1 - Qualité de l'eau - Dosage d'alkylphénols sélectionnés - Partie 1 : méthode pour échantillons non filtrés par extraction en phase liquide-liquide et chromatographie en phase gazeuse avec détection sélective de masse – 2006

[6] NF EN ISO 18857-2 - Qualité de l'eau - Dosage d'alkylphénols sélectionnés - Partie 2 : dosage par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse d'alkylphénols, de leurs éthoxylates et de bisphénol-A dans des échantillons non filtrés après extraction en phase solide et dérivation – 2012

[7] L.H. Liu, A.F. Liu, Q.H. Zhang, J.B. Shi, B. He, Z.J. Yun, G.B. Jiang, Determination of tetrabromobisphenol-A/S and their main derivatives in water samples by high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 2017, 1497, 81-86

[8] O. Diago, F. Lestremau, Analyse de substances prioritaires dans les sédiments mesure des alkylphénols, des alkylphénols polyéthoxylés à courte chaine et du bisphénol A dans les sédiments : étude des conditions d'extraction et d'analyse, rapport AQUAREF, 2011

[9] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion trap-MS/MS, Anal. Chem. 2004, 76, 704-711

[10] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments, J. Chromatogr. A, 2004, 1038, 19-26.

9. LISTE DES ANNEXES

Annexe	Désignation	Nombre de pages
Annexe 1	Formules semi-développées des alkylphénols	3
Annexe 2	Conditions de chromatographie gazeuse sur la colonne DB5-MS	1
Annexe 3	Tableau des temps de rétention et des ions de spécifiques aux AKP en GC/MS sur la colonne DB5-MS	1
Annexe 4	Tableau des temps de rétention et des ions de spécifiques aux AKPaprès silylation en GC/MS colonne RTX 1614	1
Annexe 5	Bilan des rendements de dérivation dans l'acétone	1
Annexe 6	Bilan des rendements de dérivation dans l'acétonitrile	1
Annexe 7	Bilan des rendements de dérivation dans l'acétonitrile en présence d'un catalyseur : pyridine à 10%	1
Annexe 8	Méthode d'analyse des sédiments pour analyse GC/MS	2
Annexe 9	Conditions de chromatographie liquide testées	3
Annexe 10	Séparations chromatographiques des alkylphénols sur différentes colonnes de chromatographie liquide	1
Annexe 11	Conditions d'ionisation du Q-TOF 6550 Agilent et du TQD Acquity WATERS	1
Annexe 12	Dérive du signal du 4-DDcP par analyse LC/TQD	1
Annexe 13	Méthodes MAE	2

Formules semi-développées des alkylphénols

- Bisphenol A (80-05-7)



- Tetrabromobisphenol A (79-94-7)



- Tetrabromobisphenol A bis-di-bromo-propyl-ether (21850-44-2)



- 4-tert-butylphenol (98-54-4)



- 4-sec-butyl-2.6-di-tert-butylphenol (17540-75-9)



- 2.6-di-tert-butyl-4-phenylphenol (2668-47-5)



- Dodecylphenol : plusieurs CAS existent :
 - CAS 210555-94-5 : 4-Dodécylphénol : mélange d'isomères tous en position 4 (para) et à branche carbonée ramifiée :



Exemple d'un isomère :



• CAS 27193-86-8 : Dodécyl phénol ou n-Dodécylphénol : mélange d'isomères de position avec <u>chaîne carbonée linéaire</u> (n° CAS disponible commercialement mais il y a probable une confusion avec CAS 210555-94-5)

L1	ANSWER 1 OF 1 REGISTRY COPYRIGHT 2018 ACS on STN
RN	27193-86-8 REGISTRY
ED	Entered STN: 16 Nov 1984
CN	Phenol, dodecyl- (CA INDEX NAME)
OTHE	R CA INDEX NAMES:
CN	Dodecylphenol
OTHE	R NAMES:
CN	ADX 100
CN	n-Dodecylphenol
DR	1331-57-3
MF	C18 H30 O
CI	IDS, COM
Ring	System Data
	4
Eleme	ental Elemental Size of Ring System Ring RID
Analy	/sis Sequence the Rings Formula Identifier Occurrence
EA	A ES SZ RF RID Count
===== a.c	
C6	C6 6 C6 46.150.18 1
	~
	D4 01
	D1-OH
	DI-OH
И	



• CAS 121158-58-5 : Dodécylphénol, branched (non commercialisé à ce jour).

Conditions de chromatographie gazeuse

Conditions chromatographiques

Colonne : DB5 MS (5 % diphényl et 95 % diméthyl polysiloxane) (longueur : 30 m, diamètre interne : 0,25 mm, épaisseur de phase stationnaire : 0,25 µm) Gaz vecteur : Hélium. Débit : 1,0 mL/min. Volume injecté : 2 µL. Injecteur : 1177 (VARIAN) Température de l'injecteur : 250 °C Mode split :

Temps	Etat du split	Ratio du split
Initial	on	20
0.00	off	off
1.50	on	20

L'injection est en mode splitless mais une programmation du split est effectuée pour nettoyer l'injecteur entre les injections.

Programmation en température du four :

Température (°C)	Rampes (°C/min.)	Paliers (min.)	Total (min)
60	-	1	1.00
280	10	10	33.00

Conditions de spectromètre de masse :

Source externe Température de la trappe : 200 °C Température de la source : 220 °C Température du manifold : 50 °C Température de la ligne de transfert : 280°C Courant d'émission : 25µA Full scan : 100 à 1000 uma

Tableau des temps de rétention et des ions de spécifiques aux AKP en GC/MS sur la colonne DB5-MS

NOM	ACRONYME	TR MIN	IONS
4-tert-butyl-phenol	4tBuP	9.417	135,107(34)
2-tert-butyl-4-methylphenol	2tBu4mP	10.179	149,121(83)
2,6-di-tert-butyl-4-	26dtBu4mP	12.137	205,177(24)
methylphenol	(BHT)		
4-tert-octylphenol	4tOP	13.356	135,107(16)
4-sec-butyl-2,6-di-tert-butyl- phenol	4sBu26dtBuP	13.534	233,247(33)
4-nonylphenol	4NP	14.4- 15.1	135,121(43),149(36),107(32)
4-n-octylphenol	4nOP	15.175	107,205(16)
4-n-nonylphenol	4nNP	16.259	107,219(21)
4-dodecylphenol	4DDcP	15.8- 18.2	135,121(22),107(19),149(13)
2,6-di-tert-butyl-4-	26dtBu4pP	18.465	267,282(31),268(22),239(19)
phenylphenol			
Bisphenol A	BPA	19.162	213,119(18),214(14)
Tetrabromobisphenol A	TBBPA	27.022	529,531(68),527(63),293(10),544(4)

Tableau des temps de rétention et des ions de spécifiques aux AKP après silylation en GC/MS sur la colonne RTX 1614

NOM	ACRONYME	TR MIN	IONS
4-tert-butyl-phenol-TMS	4tBuP-TMS	5.383	207,242
2-tert-butyl-4-methylphenol-TMS	2tBu4mP-TMS	5.971	221,236(15)
2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol-TMS	26dtBu4mP-TMS (BHT)	9.196	277,292(37)
4-tert-octylphenol-TMS	4tOP-TMS	8.522	207,191(9)
4-sec-butyl-2,6-di-tert-butyl-phenol-TMS	4sBu26dtBuP- TMS	10.269	319,305(94)
4-nonylphenol-TMS	4NP-TMS	9.2-10	221,207,193,179
4-dodecylphenol-TMS	4DDcP-TMS	10.6-12.5	221,207,193,179
2,6-di-tert-butyl-4-phenylphenol-TMS	26dtBu4pP-TMS	14.475	354,339(93)
Bisphenol A-2TMS	BPA-2TMS	14.046	357,358(26)
Tetrabromobisphenol A-2TMS	TBBPA-2TMS	20.400	675,688(26)
Tetrabromobisphenol A bis(2,3- dibromopropylether)-TMS	TBBPA-BDBPE- TMS ???	23.805	563,601,618,761,778

NOM	ACRONYME	TR MIN	IONS
4-tert-butyl-phenol-d13-TMS	4tBuP-d13-TMS	4.497	217
2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol-d21-	26dtBu4mP-d21-	6.949	294
TMS	TMS		
4-tert-octylphenol- 13C6-TMS	4tOP-13C-TMS	8.121	213
4-363-nonylphenol-13C6-TMS	4-363-NP-13C-TMS	9.318	227
Bisphenol A-13C12-2TMS	BPA-13C-2TMS	13.573	369
Tetrabromobisphenol A-13C12-2TMS	TBBPA-13C-2TMS	19.671	687
Phenanthrene-d10	PHE-d10	9.664	188

Bilan des rendements de dérivation dans l'acétone

DERIVATION DANS ACETONE 25°C	4tBuP	2tBu4mP	26dtBu4mP	4sBu26dtBuP	4t0P	4NP	4DDcP	26dtBu4pP	BPA	TBBPA	TBBPA-BDBPE ???
MSFTA	100 %	100 %	4%	3%	100%	100%	100%	85%	100%	100%	
MSFTA+1%TMCS	100 %	100 %	2%	0%	100%	100%	100%	66%	100%	100%	
BSTFA	100 %	100 %	10%	5%	100%	100%	100%	99 %	100%	100%	
BSTFA+1%TMCS	100 %	100 %	6%	3%	100%	100%	100%	94%	100%	100%	
BSA	100 % Bic pop	100 % Bic pop	29% pic	14% pic	100% pic	100% pic	100% pic	55% pic	100% pic	0% pic	
	gaussien	gaussien	é	é	é	é	é	é	é	ti alliant	
		, décalag e Tr									
TMSI	Aucun	Aucun	Aucun	7%	Aucun	Profil	Profil	0%	Aucun	0% pic	
	pic	pic	pic		pic	différen t	différen t	décalag e tr	pic	trainant	
HDMS+30%TMCS	100% pic moins intense+ plus de BF	100% pic moins intense+ plus de BF	0%	0%	100% pic moins intense+ plus de BF	100% pic moins intense+ plus de BF	100% pic moins intense+ plus de BF	0%	100% pic moins intense+ plus de BF	33% pic moins intense+ plus de BF	

DERIVATION DANS ACETONE 60°C	4tBuP	2tBu4mP	26dtBu4mP	4sBu26dtBuP	4t0P	4NP	4DDcP	26dtBu4pP	BPA	TBBPA	TBBPA-BDBPE ???
MSFTA	100 %	100 %	57%	30%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
MSFTA+1%TMCS	100 %	100 %	14%	9 %	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
BSTFA	100 %	100 %	70%	43%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
BSTFA+1%TMCS	100 %	100 %	0%	0%	100%	100%	100%	0%	100%	100%	
BSA	Aucun	100 %	Aucun	36% pic	100% pic	100% pic	100% pic	64% pic	100% pic	0% pic	
	pic	Pic non	pic	dédoubl	dédoubl	dédoubl	dédoubl	dédoubl	dédoubl	trainant	
		gaussien		é	é	é	ė	é	ė		
		, 									
		decalag									
TAACI	Aucup	Aucup	Aucup	0%	Aucup	Aucup	Aucup	0%	Aucup	0% pic	
	nic	nic	nic	décalag	nic	nic	nic	0∕₀ décalag	nic	trainant	
	pic	pic	pic	e tr	pic	pic	pic	e tr	pic	tramant	
HDMS+30%TMCS	100% pic	100% pic	Aucun	Aucun	100% pic	100% pic	100% pic	Aucun	100% pic	Aucun	
	moins	moins	pic	pic	moins	moins	moins	pic	moins	pic	
	intense+	intense+			intense+	intense+	intense+		intense+		
	plus de	plus de			plus de	plus de	plus de		plus de		
	BF	BF			BF	BF	BF		BF		

Bilan des rendements de dérivation dans l'acétonitrile

			-	-	-			-		-	-
DERIVATION DANS ACETONITRILE 25°C	4tBuP	2tBu4m P	26dtBu 4mP	4sBu26 dtBuP	4t0P	4NP	4DDcP	26dtBu 4pP	BPA	TBBPA	TBBPA- BDBPE ? ??
MSFTA	100 %	100 %	20%	11%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
MSFTA+1%TMCS	100 % Pic Dédoubl é	100 % Pic Dédoubl é	0% BF	0% BF	100%	100%	100%	17%	100%	100% meilleur e réponse x2	
BSTFA	100 %	100 %	4%	3%	100%	100%	100%	84%	100%	100%	
BSTFA+1%TMCS	100 %	100 %	4%	2%	100%	100%	100%	80%	100%	100%	
BSA	100 % Pic non gaussien , décalag e tr	100 % Pic non gaussien	94%	85%	100%	100%	100%	21%	100% pic moins intense	0% pic trainant	
TMSI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HDMS+30%TMCS	100%	100%	0%	1%	100%	100%	100%	0%	100%	100%	

DERIVATION DANS ACETONITRILE 60°C	4tBuP	2tBu4 mP	26dtBu 4mP	4sBu26 dtBuP	4tOP	4NP	4DDcP	26dtBu 4pP	BPA	TBBPA	TBBPA- BDBPE ???
MSFTA	100 %	100 %	93%	82%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
MSFTA+1%TMCS	100 % Pic Dédoubl é	100 % Pic Dédoubl é	12% BF	5% BF	100%	100%	100%	100%	100%	100% meilleur e réponse x2	
BSTFA	100 %	100 %	15%	10%	100%	100%	100%	99 %	100%	100%	
BSTFA+1%TMCS	100 %	100 %	12%	8%	100%	100%	100%	99 %	100%	100%	
BSA	100 % Pic non gaussien , décalag e tr	100 % Pic non gaussien	95%	95%	100%	100%	100%	5%	60%, pic non dérivé décalag e tr 0.7min	0% pic trainant	
TMSI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HDMS+30%TMCS	100%	100%	0% pic 2x moins intense	2% pic 2x moins intense	100%	100%	100%	1% pic 2x moins intense	100%	100% pic 2x moins intense	

DERIVATION DANS ACETONITRILE 90°C	4tBuP	2tBu4 mP	26dtBu 4mP	4sBu26 dtBuP	4tOP	4NP	4DDcP	26dtBu 4pP	BPA	TBBPA	TBBPA- BDBPE ???
MSFTA	100 %	100 %	95 %	90%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
MSFTA+1%TMCS	100 % BF	100 % BF pic moins intense	37%	21%	100%	100%	100%	100%	100%	100% meilleur e réponse x2	
BSTFA	100 %	100 %	42%	25%	100%	100%	100%	99 %	100%	100%	
BSTFA+1%TMCS	100 %	100 %	24%	13%	100%	100%	100%	99 %	100%	100%	
BSA	100 % Pic non gaussien , décalag e tr	100 % Pic non gaussien , décalag e tr	96%	97%	100%	100%	100%	5%	65%, pic non dérivé décalag e tr 0.7min	0% pic trainant	
TMSI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HDMS+30%TMCS	100%	100%	aucun pic	0% décalag e tr	100%	100%	100%	0% pic très peu intense	100%	100% pic très peu intense	

Bilan des rendements de dérivation dans l'acétonitrile en présence d'un catalyseur : pyridine à 10%

DERIVATION DANS ACETONITRILE + 10% Pyridine 25°C	4tBuP	2tBu4mP	26dtBu4 mP	4sBu26dt BuP	4tOP	4NP	4DDcP	26dtBu4p P	BPA	TBBPA	TBBPA- BDBPE ???
MSFTA	100 % épaulem ent	100 %	98% épaulem ent	97% épaulem ent	100% épaulem ent	100%	100%	100%	100%	100%	
MSFTA+1%TMCS	100 % BF et épaulem ent	100 % BF pic moins intense	64% épaulem ent	44% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	91%	100%	100% meilleure réponse x2	
BSTFA	100 %	100 %	97%	89%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
BSTFA+1%TMCS	100 %	100 %	92%	82%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
BSA	100 % Pic non gaussien , décalag e tr	100 % Pic non gaussien , décalag e tr	97%	97%	100%	100%	100%	13%	86%, pic non dérivé décalag e tr 0.7min	0% pic trainant	
HDMS+30%TMCS	100%	100%	0%	0%	100%	100%	100%	1%	100%	100% pic très peu intense	
DERIVATION								_			
DANS ACETONITRILE + 10% Pyridine 60°C	4tBuP	2tBu4mP	26dtBu4 mP	4sBu26dt BuP	4tOP	4NP	4DDcP	26dtBu4p P	BPA	TBBPA	TBBPA- BDBPE ???
MSFTA	100 % épaulem ent	100 %	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100%	100% pic moins intense	100%	
MSFTA+1%TMCS	100 % BF et épaulem ent	100 % BF pic moins intense	76% épaulem ent	61% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	98%	100%	100% meilleure réponse x2	
BSTFA	100 %	100 %	97 %	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
BSTFA+1%TMCS	100 %	100 %	96%	90%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
BSA	100 % Pic non gaussien , décalag e tr	100 % Pic non gaussien , décalag e tr	96%	97%	100%	100%	100%	6%	54%, pic non dérivé décalag e tr 0.7min	0% pic trainant	
HDMS+30%TMCS	100%	100%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	100%	40% pic très peu intense	
DEDIVATION		1	1	1	1	1	1	1	1	1	
DANS ACETONITRILE + 10% Pyridine 90°C	4tBuP	2tBu4mP	26dtBu4 mP	4sBu26dt BuP	4tOP	4NP	4DDcP	26dtBu4p P	BPA	TBBPA	TBBPA- BDBPE ???
MSFTA	100 % épaulem ent	100 %	87% épaulem ent	69% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100%	100%	100%	
MSFTA+1%TMCS	100 % BF et épaulem ent	100 % BF pic moins intense	25% épaulem ent	14% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100% épaulem ent	100%	100%	100% meilleure réponse x2	
BSTFA	100 %	100 %	53%	34%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
BSIFA+1%IMCS	100 %	100 %	38% 96%	21% 05%	100%	100%	100%	100% 7%	100%	100%	
JA	Pic non gaussien , décalag	Pic non gaussien , décalag	70/0	73/0	100//	100%	100%	1 /0	os%, pic non dérivé décalag e tr 0.7min	trainant	
HDMS+30%TMCS	100%	100%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	100%	0% pic trainant	

Méthode d'analyse des sédiments pour analyse GC/MS
Méthode AQUAREF 2011 : méthode 1

Extraction ASE d'1g de sédiment sec par un mélange hexane/Acétone 50 :50 Conditions :

- Pression = 100bar
- Temp = 100°C
- Static time = 5'
- Flush Volume = 90%
- Purge time = 200s
- Static Cycle = 3

Evaporation jusqu'à quasi siccité et reprise par 5mL d'hexane. Clean-up SPE SiOH 3mL/500mg Macherey Nagel

Mth Gilson:

- Conditionnement par 2x5mL n-hexane
- Chargement de l'échantillon (élimination de la fraction)
- Rinçage tube échantillon par 5mL acétone
- Elution par les 5mL d'acétone de rinçage (collecte 1)
- Elution par 5mL d'acétone (collecte 2)

Evaporation à quasi siccité et reprise par 500 μ L d'un mélange Acétonitrile/ Pyridine à 10% (v/v). (Conc finale théorique 800ng/mL) Dérivation par ajout de 10 μ L de MSTFA à 50 μ L d'extrait, pendant 30 min à 60°C. Les extraits obtenus et un étalon à 800ng/mL sont analysés en sur le GC/MS ion trap, avec la colonne en ZB-SV 20m ;0.18mm ;0.18 μ m, en mode PTV (1 μ L).

Méthode basée sur celle du LPTC étude exploratoire et adaptée pour cette étude : méthode 2

Extraction ASE d'1g de sédiment sec par du DCM

Conditions :

- Pression = 100bar
- Temp = 100°C
- Static time = 5'
- Flush Volume = 90%
- Purge time = 200s
- Static Cycle = 3

Evaporation à quasi siccité et reprise à 1mL de DCM/MeOH 8 :2.

Clean-up SPE HF Bond Elut PSA 3mL/500mg Agilent Mth Gilson:

- Conditionnement par 3mL MeOH, puis 3mL DCM/MeOH 8 :2
- Chargement de l'échantillon (Collecte1)
- Rinçage tube échantillon par 5mL DCM/MeOH 8 :2

- Elution par les 5mL de DCM/MeOH 8 :2 de rinçage (collecte 1)
- Elution par 5mL de DCM/MeOH 8 :2 (collecte 2)

Evaporation à quasi siccité et reprise par 500 μ L d'un mélange Acétonitrile/ Pyridine à 10% (v/v). (Conc finale théorique 800ng/mL)

Dérivation par ajout de 10 μ L de MSTFA à 50 μ L d'extrait, pendant 30 min à 60°C. Les extraits obtenus et un étalon à 800ng/mL sont analysés en sur le GC/MS ion trap, avec la colonne en ZB-SV 20m ;0.18mm ;0.18 μ m, en mode PTV (1 μ L).

Conditions de chromatographie liquide testées

Méthode LPTC

	H ₂ O 0,5 mM Acétate Ammonium	MeOH	Débit (mL/ min)	Tempéra ture colonne (°C)
0	60	40		35
1 min	60	40		
2 min	10	90	0.0	
3 min	0	100	0,6	
3,1 min	60	40		
4 min	60	40		

Méthode standard

	H2O 0,5 mM Acétate Ammonium	MeOH	Débit (mL/min)	T° (°C)
0	100	0		
2 min	100	0		
14 min	2	98	0.4	40
16 min	2	98	0,4	40
19 min	100	0		
19,5 min	100	0		

Conditions	1
------------	---

	H2O 0,5 mM Acétate Ammonium	MeOH	Débit (mL/min)	T° (°C)
0	40	60		40
2 min	40	60		
20 min	2	98	0.4	
22 min	2	98	0,4	
25 min	100	0		
25,5 min	100	0		

Conditions 2

	H2O 0,5 mM Acétate Ammonium	MeOH	Débit (mL/min)	T° (°C)
0	40	60		40
2 min	18	82		
6 min	13,5	86,5	0,4	
6,5 min	13,5	86,5		

Conditions TQD Kinetex C18 – 2,6 μm (100 x 2,1 mm) Phenomenex

	H ₂ O 0,5 mM Acétate Ammonium	MeOH	Débit (mL/min)	Température colonne (°C)
0	70	30		40
1 min	70	30		
5 min	2	98	0,4	
7 min	2	98		
10 min	70	30		
15 min	70	30		

Séparations chromatographiques des alkylphénols sur différentes colonnes de chromatographie liquide



4

Conditions d'ionisation du Q-TOF 6550 Agilent et du TQD Acquity WATERS

Conditions d'ionisation sur le Q-TOF 6550 Agilent :

Ion polarity : NegativeSource :Gas Temperature : 200 °CDrying gas : 15 L/minNebulizer : 30 psigSheat gas Temperature: 350°CVcap: 3500 VFragmentor: 365 VRF Vpp : 750 V

<u>Acquisition:</u> Mass range: 50-1050 uma Rate: 1,5 spectre/s (4006 transient/spectre) Mode: centroïd

<u>Funnel</u> ExitDC: 50V Funnel RF HP: 200 V Funnel RF LP: 100 V

Conditions d'ionisation sur le TQD Acquiity WATERS : Mode d'ionisation : ESI(-), Tension du capillaire : 3 kV Extractor : 3V RF Lens :0,1 V Température de la source : 150°C, Température du gaz de désolvatation (N2) : 400°C, Débit en gaz de désolvatation (N2) : 800 L/h, Débit en gaz rideau (N2) : 50 L/h, Débit en gaz de collision (Argon) : 0,10 mL/min Mode d'acquisition : MRM (Multiple Reaction Monitoring), Transitions MRM et énergies d'ionisation :

Transitions MRM et énergies d'ionisation :

Composé	Transition MRM	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)	lon de
BPA	227.2 >212.2	40	20	Quanti
	227.2 > 133.2	40	23	Quali
4-tert-ButylPhenol	149.1 > 133	40	20	Quanti
Tetrabromobisphenol-A	543 > 448	55	30	Quanti
	543 > 418	55	40	quali 1
	545 > 448	55	30	quali 2
4 Dodecylphenol	261,3 > 133,1	48	26	Quanti
	261,3 > 147,2	48	26	quali
4-sec-butyl-2.6-	261,3 > 231,2	52	28	Quanti
diterbutylphenol	261,3 > 245,3	52	25	quali
4-phenyl-2.6-	281,3 > 265,3	58	25	Quanti
diterbutylphenol	281,3 > 225,3	58	25	quali
4-3,6,3-NP-13C6	225,3 > 139,1	40	28	Quanti
4-tert-Butylphénol-d ₁₃	162,2 > 142,2	42	18	Quanti
TBBPA- ¹³ C ₁₂	555,0 > 460,0	55	30	Quanti
BPA- ¹³ C ₁₂	239,2 > 224,2	40	20	Quanti

Dérive du signal du 4-DDcP par LC/TQD



Méthodes MAE

Méthode MAE LPTC :

Rampe 10 min jusqu'à 80°C Palier 5 min à 80°C Puissance 600W Option : avec agitation

Méthodes MAE testées selon la publication [10]:

	innent i Ig	-			
Solvant	Puissance	Rampe	Température	Maintien	Guard
d'extraction	(W)	(min)	(°C)	(min)	Température
					(°C)
DCM	600	6	50	/	
		8	80	15	
MeOH	600	6	50	/	
		8	130	15	
Hexane-Acétone	600	6	50	/	155 °C
(Mélange 1 :1)		8	80	/	
		15	110	15	

Prise d'essai de sédiment : 1g

Pour chaque méthode testée : extrait concentré à sec sous azote à 40 °C puis repris avec 150 μ L de MeOH (agitation) + 350 μ L eau ultrapure (agitation).

Méthodes combinées testées pour optimisation :

• Méthode 1

Prise d'essai : 1 g de sédiment

Méthode 1	Solvant	Puissance (W)	Rampe	Température	Maintien	Guard Température
	d'extraction		(min)	(°C)	(min)	(°C)
Etape 1	Hexane-Acétone	600	6	50	/	155 °C
	(Mélange 1 :3)		8	80	/	
	15 mL		15	110	15	
Etape 2	Hexane-Acétone	600	6	50	/	155 °C
	(Mélange 3 :1)		8	80	/	
	15 mL		15	110	15	

Extraits réunis et concentrés à sec sous azote à 40 °C puis repris avec 150 μ L de MeOH (agitation) + 350 μ L eau ultrapure (agitation).

• Méthode 2

Prise d'essai : 1 g de sédiment

Méthode 2	Solvant	Puissance	Rampe	Température	Maintien	Guard Température
	d'extraction	(W)	(min)	(°C)	(min)	(°C)
Etape 1	Hexane-Acétone	600	6	50	/	155 °C
	(Mélange 1 :1)		8	80	/	
	15 mL		15	110	15	
Etape 2	DCM	600	6	50	/	
	15 mL		8	80	15	

Extraits réunis et concentrés à sec sous azote à 40 °C puis repris avec 150 μ L de MeOH (agitation) + 350 μ L eau ultrapure (agitation).