

# Comparaison et impact de différentes méthodes d'extraction d'eau sur l'analyse non ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution

C. Guillemain, F. Lestremau, D. Léonço, C. Soulier,  
C. Coureau, A. Togola, C. Margoum

Avec la participation de S. Lardy Fontan

Juillet 2019

Rapport final



## Contexte de programmation et de réalisation

---

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2016-2018, au titre de l'action « G » « Méthodes et technologies innovantes »

Auteur (s) :

*Céline Guillemain*  
Irstea Lyon Villeurbanne  
[celine.guillemain@irstea.fr](mailto:celine.guillemain@irstea.fr)

*François Lestremou*  
Ineris Verneuil en Halatte  
[Francois.LESTREMAU@ineris.fr](mailto:Francois.LESTREMAU@ineris.fr)

*Daniel Léonço*  
Ineris Verneuil en Halatte

*Coralie Soulier*  
BRGM Orléans  
[C.Soulier@brgm.fr](mailto:C.Soulier@brgm.fr)

*Charlotte Coureau*  
BRGM Orléans  
[c.coureau@brgm.fr](mailto:c.coureau@brgm.fr)

*Anne Togola*  
BRGM Orléans  
[a.togola@brgm.fr](mailto:a.togola@brgm.fr)

*Christelle Margoum*  
Irstea Lyon Villeurbanne  
[christelle.margoum@irstea.fr](mailto:christelle.margoum@irstea.fr)

---

Vérification du document :

*Yann Aminot*  
Ifremer Nantes  
[yann.aminot@ifremer.fr](mailto:yann.aminot@ifremer.fr)

## Les correspondants

---

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

IRSTEA : Marina COQUERY, marina.coquery@irstea.fr

Référence du document : C. Guillemain, F. Lestremou, C. Soulier, C. Coureau, A. Togola, C. Margoum - Comparaison et impact de différentes méthodes d'extraction d'eau sur l'analyse non ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution - Rapport AQUAREF 2019 - 24 p.

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

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>7</b>
<b>2. METHODE DE TRAVAIL</b> .....	<b>7</b>
2.1 préparation des échantillons .....	7
2.2 Méthodes d'analyses HRMS.....	9
Conditions chromatographiques pour l'analyse en ESI (+) .....	9
Conditions chromatographiques pour l'analyse en ESI (-) .....	9
2.3 Molécules suspectées à rechercher .....	10
<b>3. RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	<b>11</b>
3.1 Resultats des analyses en ESI (+) Irstea .....	11
Effet matrice / cas du diuron D6 .....	11
Traceurs deutérés .....	12
Contamination des blancs .....	13
Molécules recherchées en suspect screening .....	14
3.2 Resultats des analyses en ESI (-) ineris.....	19
Contrôles et blancs .....	19
Analyse en mode négatif auto MS/MS dans les échantillons du Gier .....	19
Analyse des blancs d'eau d'EVIAN .....	20
Analyse des échantillons.....	20
Confirmation avec les temps de rétention et les spectres de la base de données .....	21
3.3 Comparaison des analyses en ESI (+) et ESI (-).....	22
Contamination des blancs .....	22
Détection des traceurs deutérés .....	22
Détection des molécules communes aux 2 modes d'ionisation recherchées dans les extraits d'eau de rivière (Gier) .....	22
<b>4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>23</b>

*COMPARAISON ET IMPACT DE DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION D'EAU SUR L'ANALYSE NON CIBLEE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION*  
C. Guillemain, F. Lestremou, C. Soulier, C. Coureau, A. Togola, C. Margoum

RESUME

Les approches d'analyses non ciblées ou « non-target screening » (NTS) réalisées en spectrométrie de masse haute résolution couplée à des techniques chromatographiques permettent d'identifier un grand nombre de composés organiques anthropogéniques ou naturels présents dans les échantillons d'eau.

Or, ces échantillons d'eau subissent généralement des étapes de préparation comme la filtration, l'extraction, la concentration et la purification qui peuvent impacter la qualité des informations obtenues.

Dans cette étude cinq méthodes de préparation d'échantillons d'eau de rivière par extraction sur phase solide (SPE) et à différents pH ont été testées et comparées en fonction des résultats obtenus par analyse non ciblée de suspects (analyse suspectée par la suite du rapport) en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution.

L'eau du Gier (Givors, Rhône) après filtration, dopage en traceurs d'extraction deutérés et ajustement du pH (pH 3 et 7) a été extraite selon cinq protocoles distincts en terme de cartouches SPE utilisées (HLB ou multicouches) et de solvants d'élution (méthanol, mélange méthanol / dichlorométhane, mélange méthanol / acétate d'éthyle). Les analyses ont été réalisées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution dans les deux modes d'ionisation ESI (+) et ESI (-). La recherche suspectée s'est basée sur une liste prédéfinie de 28 molécules à rechercher qui avaient été précédemment retrouvées dans les eaux du Gier.

La variabilité des résultats obtenus en terme de détection de substances ne permet pas de conclure sur le choix d'une méthode d'extraction unique à utiliser qui soit la moins spécifique possible pour répondre aux objectifs d'une analyse suspectée la plus large possible.

Toutefois les résultats obtenus avec les trois méthodes d'extraction à pH 7 permettent de mieux détecter les molécules suspectées (intensité des signaux plus importantes), ce pH d'extraction doit alors être privilégié.

Les analyses dans les deux modes d'ionisation ESI (+) et ESI (-) sont nécessaires car elles apportent des informations complémentaires (certaines molécules ne sont ionisables que dans un des deux modes) mais aussi une confirmation supplémentaire de la présence des molécules ionisables dans les deux modes d'ionisation.

**Mots clés :**

Eau, préparation d'échantillon, LC-HRMS, analyse non ciblée de suspects

*COMPARISON AND INFLUENCE OF DIFFERENT WATER EXTRACTION METHODS ON NON-TARGET ANALYSIS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY*

C. Guillemain, F. Lestremau, C. Soulier, C. Coureau, A. Togola, C. Margoum

**ABSTRACT**

Non-target screening (NTS) approaches based on high-resolution mass spectrometry coupled with chromatographic techniques allow the identification of a large number of chemical compounds of anthropic or natural origin present in water samples.

However, these water samples generally require pre-treatment steps such as filtration, extraction, concentration and purification that may impact the quality of the information obtained.

In this study, five different solid phase extraction methods (SPE) at different pH were applied to the same river water and compared based on the results obtained by suspected non-targeted analysis in liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry.

Surface water from the Gier River (Givors, Rhône) was filtered, spiked with deuterated surrogates and pH adjusted (pH 3 and 7). Then the water was extracted according to five distinct protocols in terms of SPE cartridges used (HLB or multilayer) and elution solvents (methanol, methanol/dichloromethane mixture, methanol/ethyl acetate mixture). The analyses were carried out using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry in both ionization modes ESI (+) and ESI (-). The suspected research was based on a predefined list of 28 molecules to be investigated.

The variability of the results in terms of substance detection does not allow selecting one single extraction method to be used that is the least specific possible to meet the objectives of the broadest non-targeted analysis.

However, the results obtained with the three extraction methods at pH 7 make it possible to better detect suspected molecules (higher signal intensity), this pH should then be preferred for the extraction of water.

Analysis in both ionization modes ESI (+) and ESI (-) is important because it provides additional information (some molecules are ionizable in only one of the two modes) and also further confirmation of the presence of ionizable molecules in both ionization modes.

**Key words :**

Water, sample preparation, LC-HRMS, suspect analysis

## **1. INTRODUCTION**

Le besoin de développer et d'étudier l'applicabilité opérationnelle d'outils et de stratégies innovantes est crucial pour permettre dans le futur d'identifier et d'anticiper les risques émergents associés aux contaminants chimiques de manière plus pertinente et plus efficace (cost-effective) et de faire évoluer la liste des substances réglementaires.

Les technologies basées sur la spectrométrie de masse haute résolution en couplage avec les techniques chromatographiques semblent donc prometteuses car elles permettent d'identifier un grand nombre de contaminants chimiques présents dans un échantillon. Ainsi, l'intégration des approches d'analyses non ciblées ou « non-target screening » (NTS) permettrait d'améliorer les programmes de surveillance de la contamination chimique.

Pour la surveillance chimique, il est d'usage de préparer (filtrer, extraire, concentrer et purifier) les échantillons d'eau afin d'améliorer la détection des substances. Or on sait qu'il peut exister un fort impact de l'étape de préparation des échantillons sur les informations obtenues. Il convient de procéder à une étape de préparation la plus réduite possible afin d'en minimiser l'impact (perte ou contamination) sur l'échantillon. Cependant, concernant les contaminants organiques il est nécessaire de préconcentrer les échantillons afin de détecter les composés à des concentrations compatibles avec les requis réglementaires et les potentiels effets environnementaux de ces substances.

Les analyses ciblées ont été développées depuis des années en essayant de bâtir la méthode de préconcentration la plus performante et la plus spécifique possible, permettant d'assurer les meilleurs taux de recouvrement et d'éliminer le maximum d'interférents.

Dans le cas de l'analyse non ciblée, l'objectif est certes d'améliorer la détection en préconcentrant l'échantillon mais, avec la plus faible spécificité possible puisque de fait, il n'y a pas de molécules pré-identifiées. Ce sont donc des techniques de compromis qui vont être déployées.

Dans cette étude, 3 méthodes de préparation d'échantillons d'eau de rivière par extraction sur phase solide (SPE) à différents pH seront testées et comparées sur la base des résultats obtenus par analyse suspectée en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution avec deux modes d'ionisation (positif - ESI(+)) et négatif - ESI(-)) et approche suspectée pour le traitement des résultats acquis.

## **2. METHODE DE TRAVAIL**

### **2.1 PREPARATION DES ECHANTILLONS**

12,5 L d'eau du Gier (Givors, Rhône) ont été prélevés et filtrés sur filtre en fibre de verre GF/F 0,7 µm.

L'eau du Gier filtrée a été dopée par Irstea en Estrone D4, Diclofénac D4, Atrazine D5 et Tébuconazole D6 à une concentration de 0,04 µg/L (traceurs d'extraction deutérés) puis congelée avant envoi aux 2 autres laboratoires du consortium Aquaref (BRGM et Ineris) pour extraction.

Chacun des 3 laboratoires a réalisé un protocole d'extraction SPE différent (Tableau 1) en triplicat ainsi qu'un triplicat de blanc avec de l'eau Evian en bouteille verre.

Chaque laboratoire a évaporé les éluats à sec pour reprise dans 1 mL de méthanol (facteur de concentration = 500) qui est divisé en 2 \* 500 µL pour envoi pour analyses LC-HRMS : 500 µL pour l'analyse en ESI (+) qui sera réalisée par Irstea et 500 µL pour l'analyse en ESI (-) qui sera réalisée par l'Ineris.

Pour l'analyse en ESI (+), les extraits en méthanol sont évaporés à sec puis repris avec 500 µL d'une solution de traceur d'injection de Diuron D6 à 10 µg/L dans un mélange eau / acétonitrile (95/5, v/v).

Pour l'analyse en ESI (-), évaporation à sec et reprise dans un mélange eau/méthanol (50/50, v/v).

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes méthodes SPE des 3 laboratoires participants

Laboratoire	Irstea		BRGM		Ineris
Cartouche SPE	HLB 200 mg 6 cc		HLB 200 mg 6 cc		200 mg OASIS HLB+ 100 mg Strata-X-AW + 100 mg Strata-X-CW + 150 mg Isolute ENV+
pH	3	7	3	7	7
Conditionnement	5 mL méthanol + 5 mL eau Evian		5 mL de dichlorométhane + 5 mL méthanol + 5 mL eau Evian		5 mL méthanol + 5 mL eau Evian
Débit de conditionnement	1 mL/min		/		5 mL/min
Volume d'échantillon	500 mL		500 mL		500 mL
Débit de percolation	10 mL/min		/		10 mL/min
Rinçage	5 mL eau Evian		/		/
Débit de rinçage	1 mL/min		/		/
Séchage	45 min sous azote		60 min sous azote		30 min sous azote
Elution	2 * 4mL méthanol		5 mL méthanol + 5 mL méthanol/dichlorométhane (50/50) + 5 ml dichlorométhane		4mL méthanol/éthylacétate (50/50) 2% ammoniac + 2 mL méthanol/éthylacétate (50/50) 1,7% acide formique
Débit élution	1 mL/min		/		5 mL/min

Au total, 15 extraits SPE (5 méthodes en triplicats) et 15 blancs ont été traités par chacun des 2 laboratoires en charge de l'analyse ESI (+) et ESI (-).



## 2.2 METHODES D'ANALYSES HRMS

### Conditions chromatographiques pour l'analyse en ESI (+)

L'analyse a été réalisée à Irstea sur un chromatographe UPLC Acquity H Class couplé à un spectromètre de masse haute résolution Xevo G2S QTOF (Waters). La colonne utilisée est une HSS T3 (C18) 2,1 mm x 10 cm ; 1,7 µm (Waters). Le volume d'injection est de 10 µL et la température du four est de 30°C. La phase mobile est un gradient eau et acétonitrile acidifiés avec 0,1% d'acide formique à un débit de 0,5 mL/min (Tableau 2). La gamme de masse d'acquisition est de 50 à 950 uma. L'acquisition a été réalisée en mode MSe (fragmentation MSMS en faisant varier l'énergie de collision) grâce au logiciel MassLynx de Waters.

Tableau 2 : Gradient des phases mobiles de la méthode d'analyse ESI (+)

% ACN acidifié	Temps (min)
2	0
2	2
99	22
99	24

### Conditions chromatographiques pour l'analyse en ESI (-)

L'analyse a été réalisée à l'Ineris sur un chromatographe UHPLC Agilent 1290 couplé à un spectromètre de masse haute résolution Q-TOF 6550 (Agilent). La colonne utilisée est une Zorbax SB-Aq (C18) 2,1 mm x 15 cm ; 1,8 µm (Agilent). Le volume d'injection est de 5 µL et la température du four est de 40°C. La phase mobile est un gradient eau avec 1 mM d'acétate d'ammonium et méthanol à un débit de 0,4 mL/min (Tableau 3). La gamme de masse d'acquisition est de 50 à 1050 uma. L'acquisition a été réalisée en mode « auto MS/MS » (acquisition en mode scan et avec 3 énergies de collision suivies à 10, 20 et 40 eV) grâce au logiciel Masshunter de Agilent.

Tableau 3 : Gradient des phases mobiles de la méthode d'analyse ESI (-)

% méthanol	Temps (min)
0	0
98	14
98	16
0	19
0	19,5



### **3. RESULTATS ET DISCUSSIONS**

#### **3.1 RESULTATS DES ANALYSES EN ESI (+) IRSTEA**

L'analyse en mode positif MSe a été effectuée de manière aléatoire pour les 30 extraits (ordre de passage aléatoire des blancs et des différents échantillons). Des blancs solvant eau/acétonitrile avec du Diuron D6 ont été ajoutés en début et en fin de séquence d'analyse pour s'assurer qu'il ne restait pas d'effet de mémoire dans le système analytique.

Une bibliothèque spécifique contenant la liste des molécules préalablement listées a été créée pour cette étude (Tableau 4 et traceurs deutérés). Les données ont été traitées via le logiciel Unifi (Waters). Le logiciel permet une identification des molécules par :

- leur formule,
- leur masse exacte (déviations en masse acceptable comprise entre -5 et 5 ppm),
- le ratio isotopique (comparaison des profils isotopiques obtenus et théoriques),
- les fragments obtenus (comparaison des fragments obtenus avec des données de fragmentation MassBank ou les fragments obtenus pour des standards injectés)
- le temps de rétention Tr (différence acceptable de  $\pm 0,2$  min entre le Tr obtenu et le Tr prédit ou les Tr de standards injectés)

Effet matrice / cas du diuron D6

L'aire du pic de l'étalon interne d'injection (diuron D6) est mesurée pour chaque extrait ou blanc solvant. On note sur la Figure 1 que l'aire est impactée par la matrice. En effet, on constate une suppression de signal dans les extraits de l'eau du Gier avec une augmentation de la variation du signal dans les triplicats d'injection. Le signal du diuron D6 peut être inhibé d'un facteur 2 à 3 dans les différents extraits d'eau du Gier en comparaison des blancs SPE ou des blancs solvants. La méthode qui présente le plus de suppression de signal est la méthode Irstea à pH 3, suggérant un effet du pH de l'échantillon sur la récupération d'interférents co-extraits (en particulier acides humiques et fulviques), cette influence n'étant pas observée sur la méthode BRGM qui utilise pourtant du dichlorométhane pour l'élution. Les résultats obtenus avec chaque méthode seront donc à nuancer en fonction de ces effets de matrice.

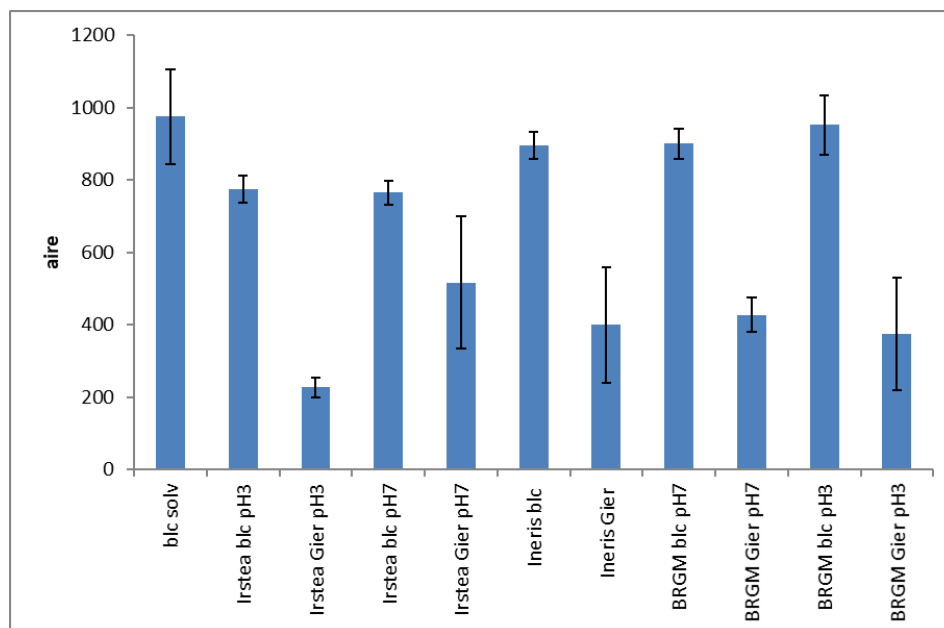


Figure 1 : Signal du traceur d'injection (diuron D6) dans tous les extraits (n=3 injections)

### Traceurs deutérés

Pour les 3 traceurs d'extraction deutérés analysés en ESI (+), aucune des 5 méthodes ne semble favoriser l'extraction sauf pour le diclofénac D4 pour lequel l'aire du pic est 2 à 3 fois plus grande avec la méthode d'extraction Irstea à pH 7. La comparaison des aires des pics de ces traceurs, montre que pour l'atrazine D5 il n'y a aucune différence entre les 5 méthodes d'extraction. Pour le tébuconazole D6, l'extraction Irstea à pH 3 donne les moins bons résultats mais cela peut être dû aux effets matrices identifiés ci-dessus avec le Diuron D6 (Figure 2).

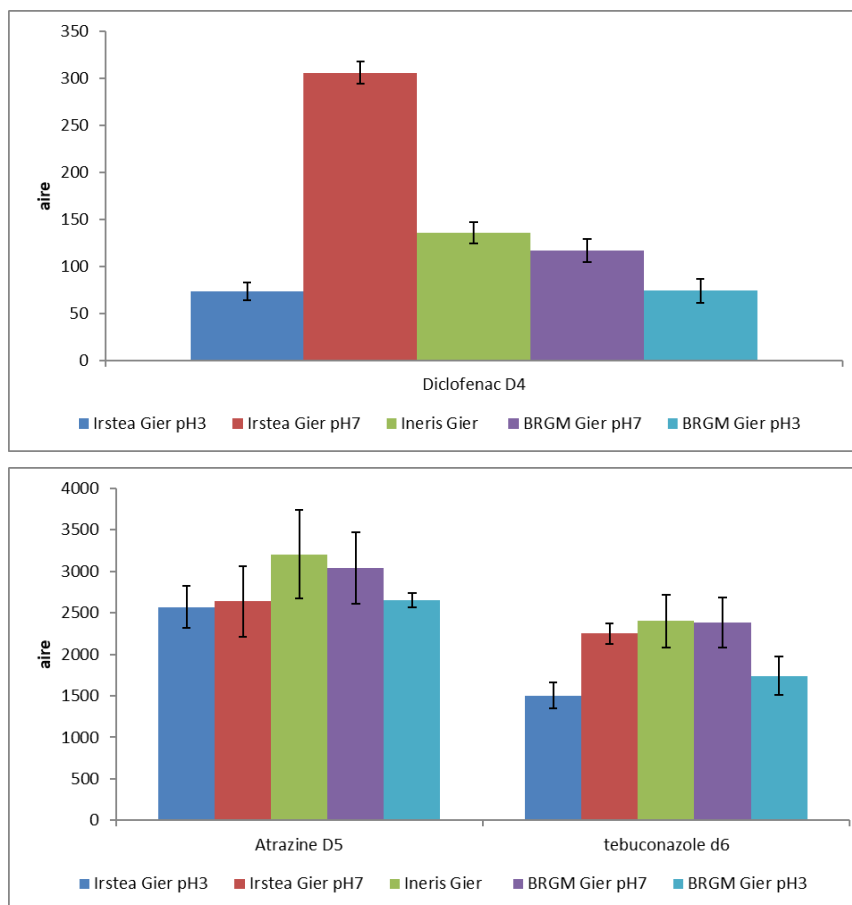


Figure 2 : Signaux des différents traceurs d'extraction deutérés dans les extraits (n=3)

### Contamination des blancs

Nous n'avons pas observé de contamination des blancs solvants ni des blancs SPE pour 26 molécules sur les 28 recherchées.

Le DEHP, composé avec le plus fort Log D à 8,03, est retrouvé dans tous les blancs et extraits (Figure 3). Le signal obtenu pour le DEHP est toutefois plus élevé avec la méthode Irstea à pH 7.

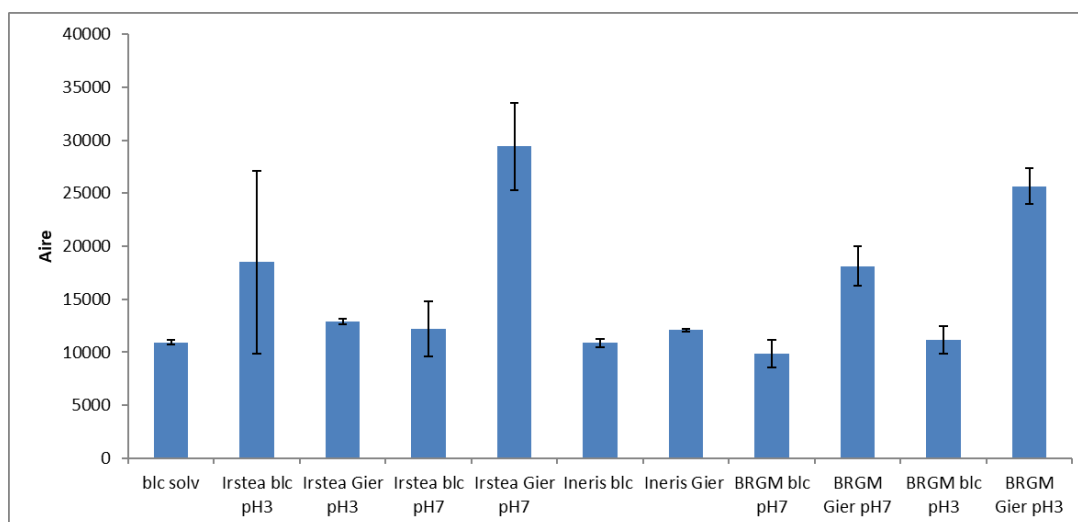


Figure 3 : Signal du DEHP dans les différents extraits (n=3)

De plus, on constate une contamination des blancs SPE pour l'Irbesartan (Figure 4) qui pourrait être liée à un effet mémoire mais qui n'est pas présent dans les blancs solvants. L'irbesartan est retrouvé dans tous les extraits avec une déviation en masse inférieure à 5 ppm et un temps de rétention observé à moins de 0,05 min du temps de rétention prédit. Ce composé semble par ailleurs plus présent dans les extractions Ineris, Irstea et BRGM à pH 7. Dans tous les cas, on note cependant une intensité dans les extraits d'eau très supérieure à celle dans les blancs correspondants (> 10 fois) ; cette contamination est donc jugée négligeable pour cette étude.

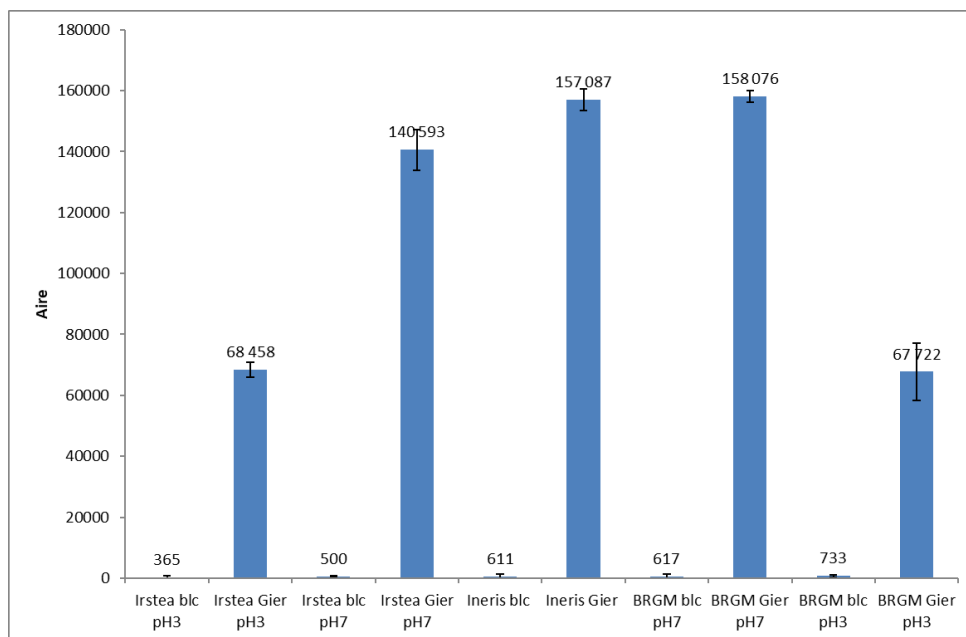


Figure 4 : Signal de l'Irbesartan dans les différents extraits (n=3)

### Molécules recherchées en suspect screening

Sur les 28 molécules recherchées en suspect screening, 4 n'ont jamais été détectées quelle que soit la méthode d'extraction : cotinine, méthylparabène, métolachlore-ESA et paracétamol. Le méthylparabène et le métolachlor-ESA n'ont pas été détectés en ESI (-). Ils sont ne sont donc pas présents ou présents à de très faibles niveaux de concentrations dans l'eau du Gier.

Le paracétamol est régulièrement détecté dans l'eau du Gier en analyse ciblée à des niveaux de concentration de l'ordre de la dizaine de ng/L. L'analyse non ciblée en spectrométrie de masse haute résolution ne permet pas d'atteindre ce niveau de sensibilité pour ce composé.

Pour ces 4 molécules, nous ne pensons pas qu'il s'agisse de faux négatifs puisqu'ils n'ont pas été détectés avec les 5 méthodes d'extraction différentes.

L'extraction de 4 molécules est affectée par la méthode SPE :

- Le 2-hydroxyatrazine et le benzoylecgonine ne sont pas extraits par la méthode Ineris (Figure 5). Ce résultat pourrait être expliqué par une élution avec moins

de solvant (6 mL) pour la méthode Ineris en comparaison des 4 autres méthodes qui présentent des éluions avec 8 et 15 mL de solvant.

- La metformine n'est pas extraite par les 2 méthodes BRGM et Irstea à pH 3 (Figure 5). La metformine présente le Log D le plus faible à -5,75. Elle ne doit pas être retenue sur la phase HLB à pH 3 mais être retenue sur la phase multicouches anionique/cationique.

- L'aténolol n'est pas extrait par la méthode BRGM pH 3, et présente une intensité faible après extraction par la méthode IRSTEa pH 3 (Figure 6). L'aténolol présente un Log D à -2,82 et ne doit donc pas être retenu sur les phases SPE à pH 3.

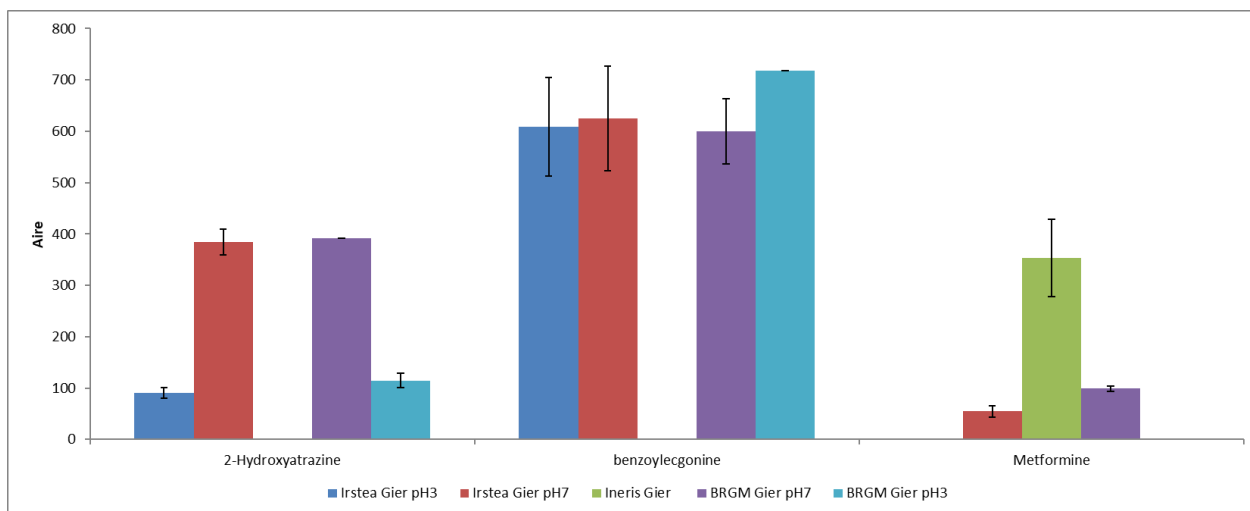


Figure 5 : Variation des signaux obtenus pour 3 molécules avec toutes les méthodes SPE

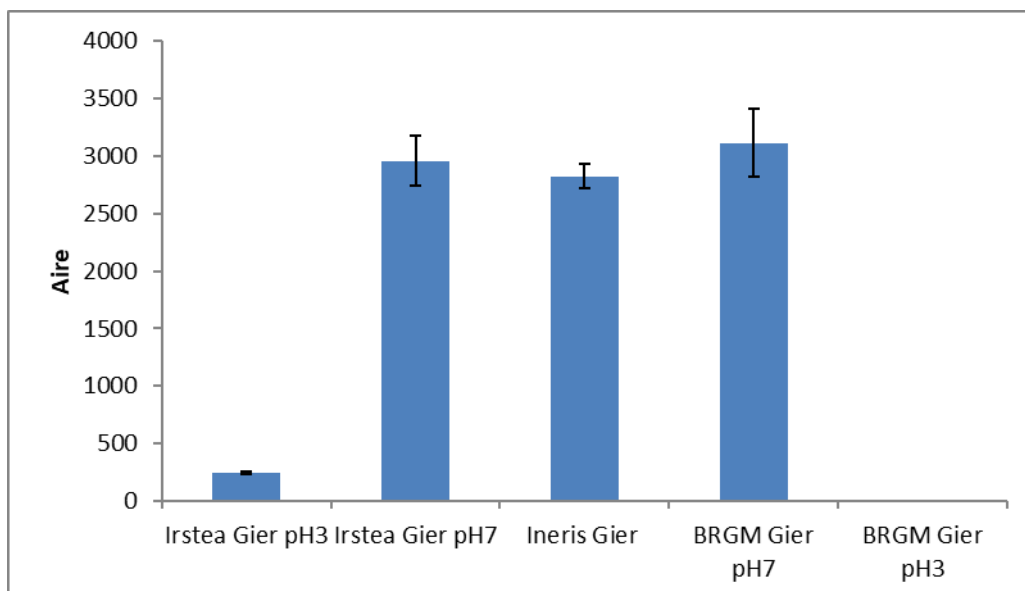


Figure 6 : Variation du signal de l'aténolol obtenu avec toutes les méthodes SPE

Les 18 molécules restantes ont été retrouvées dans tous les extraits quelle que soit la méthode d'extraction (Figure 7).

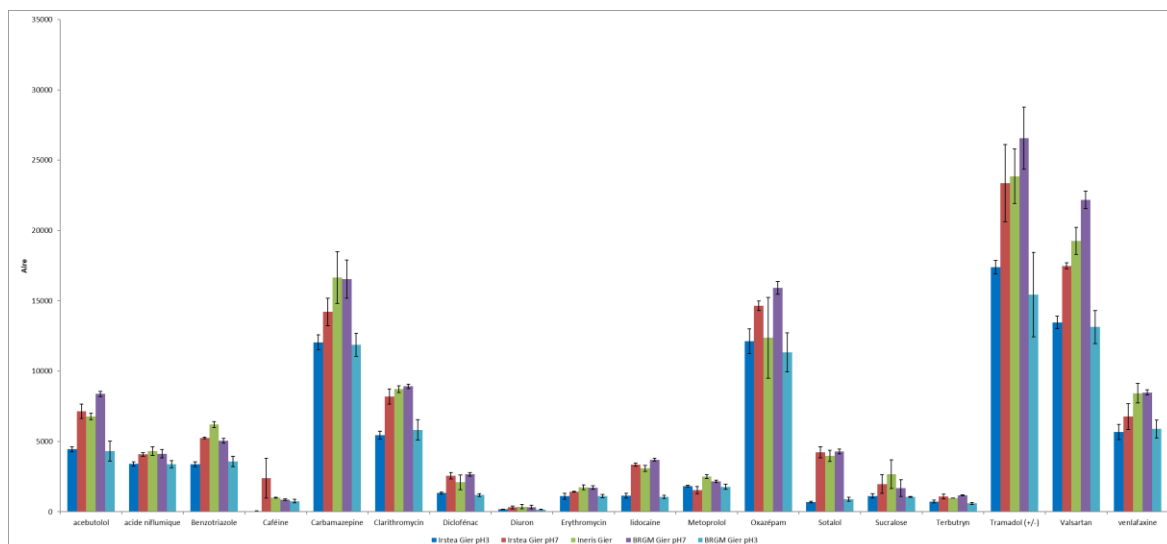


Figure 7 : Molécules détectées dans tous les extraits

Pour l'ensemble des composés, les 2 extractions à pH 3 conduisent à des intensités systématiquement inférieures à celles des 3 extractions à pH 7 ; les données à pH 3 ne sont donc pas présentées dans les graphiques suivants.

La figure 8 présente les 10 molécules pour lesquelles aucune différence n'est constatée en fonction de la méthode d'extraction. On note néanmoins que le diclofénaç D4, contrairement au diclofénaç, semble favorisé par l'extraction Irstea à pH 7. Cette différence de comportement ne peut toutefois pas être expliquée ici, car les molécules et leurs analogues deutérés sont généralement reconnus pour avoir des comportements similaires.

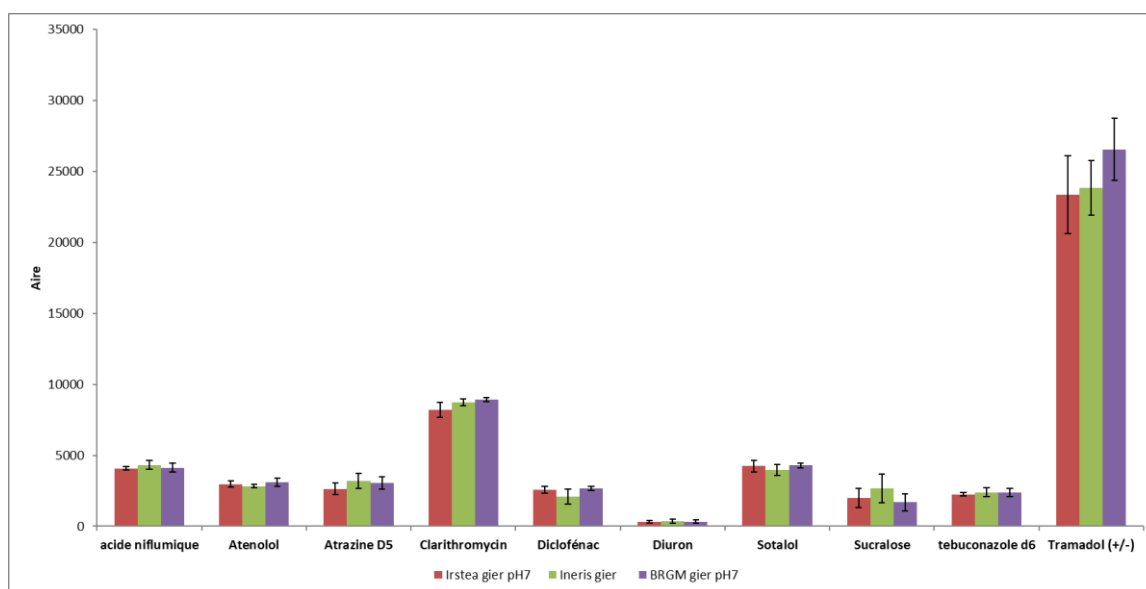


Figure 8 : Molécules pour lesquelles les 3 extractions à pH 7 n'ont pas de différence

La méthode Irstea à pH 7 donne un signal plus intense pour 2 molécules (Figure 9).



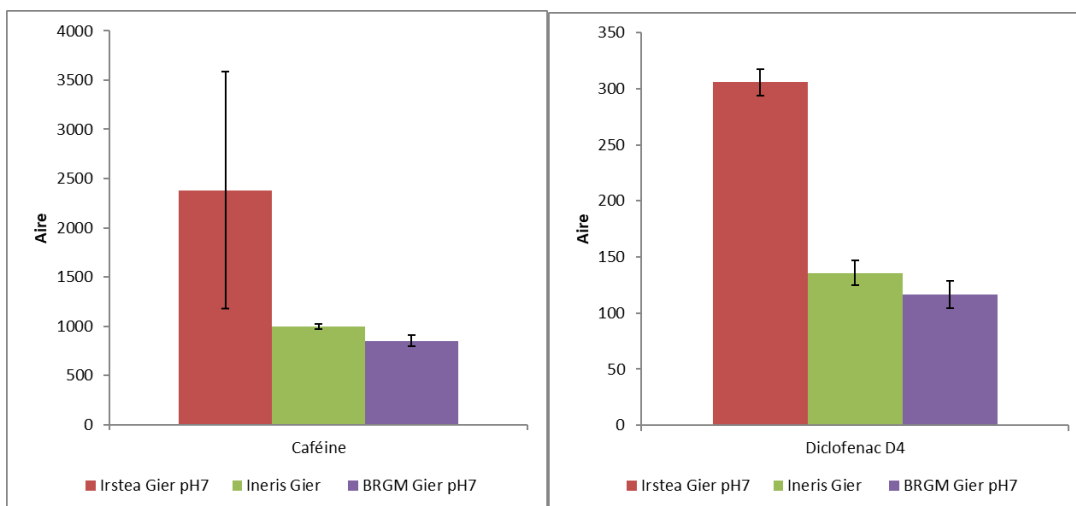


Figure 9 : Molécules pour lesquelles l'extraction Irstea pH 7 donne des intensités supérieures

La méthode BRGM à pH 7 donne un signal plus intense pour 7 molécules (Figure 10).

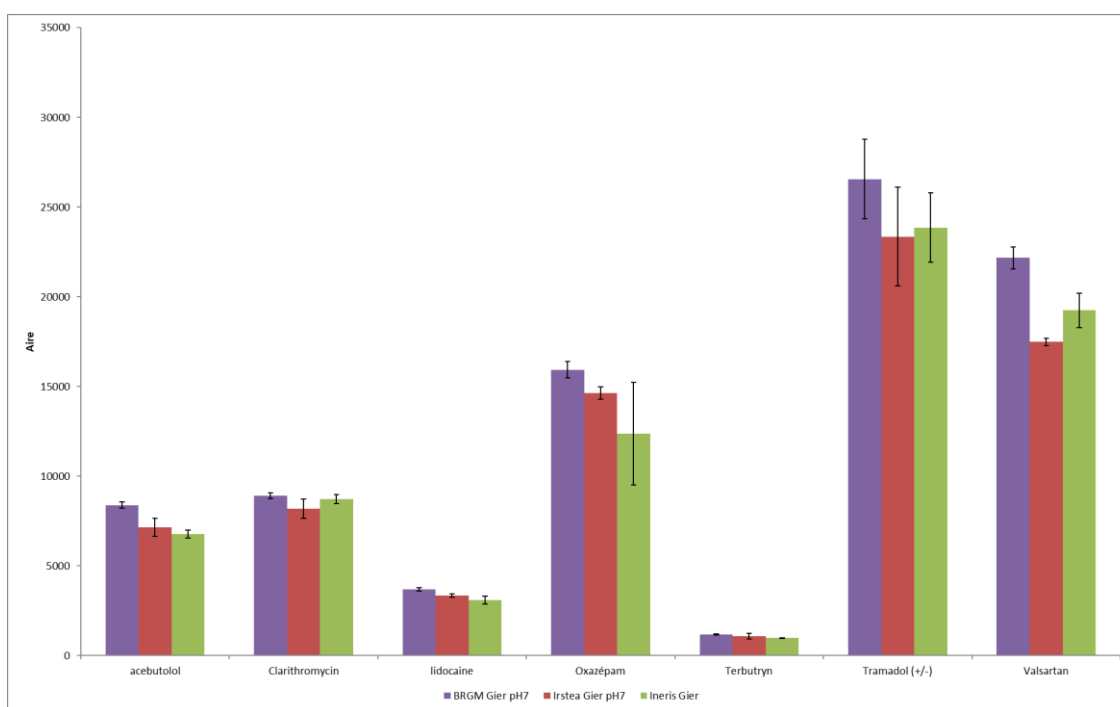


Figure 10 : Molécules pour lesquelles l'extraction BRGM pH 7 donne des intensités supérieures

La méthode Ineris donne un signal plus intense pour 6 molécules (Figure 11).

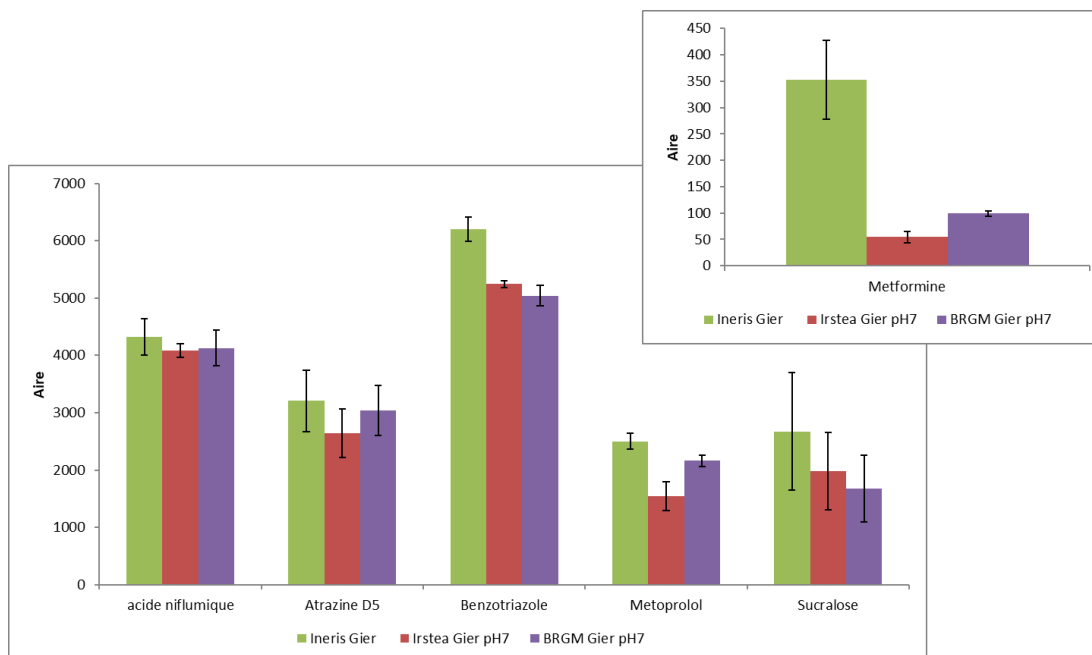


Figure 11 : Molécules pour lesquelles l'extraction Ineris donne des intensités supérieures

La méthode d'extraction BRGM à pH 7 semble être la méthode la plus performante en termes d'intensité des pics mais n'est pas forcément la plus exhaustive (nombre de molécules détectées). La méthode Ineris que l'on aurait pu penser la plus exhaustive avec les multi-couches SPE ne permet pas d'extraire 2 composés retrouvés avec les autres méthodes SPE. Le volume d'éluion (6 mL) moins élevé que pour les 4 autres méthodes monocouche (8 mL et 15 mL) pourrait expliquer ce résultat.

Le Tableau 5 ci-dessous présente un récapitulatif des molécules recherchées et détectées (ou non) en fonction des 5 méthodes d'extraction réalisées avec l'analyse en ESI (+).

Tableau 5 : Récapitulatif des molécules détectées en ESI (+), en fonction des méthodes d'extraction SPE (+ : détectée ; ++ : détectée avec une intensité du signal plus importante avec la méthode considérée)

Molécule	Méthode SPE				
	Irstea pH 3 (HLB, éluion méthanol)	Irstea pH 7 (HLB, éluion méthanol)	BRGM pH 3 (HLB, éluion méthanol/ dichlorométhane)	BRGM pH 7 (HLB, éluion méthanol/ dichlorométhane)	Ineris pH 7 (multicouche)
2-Hydroxyatrazine	+	++	+	++	non détectée
Acébutolol	+	+	+	++	+
Acide niflumique	+	+	+	+	+
Aténolol	+	++	non détectée	++	++
Benzotriazole	+	+	+	+	++
Benzoylécgonine	+	+	+	+	non détectée
Caféine	+	++	+	+	+
Carbamazépine	+	+	+	++	++
Clarithromycine	+	+	+	+	+

Cotinine	non détectée				
DEHP	+	++	+	+	+
Diclofénac	+	+	+	+	+
Diuron	+	+	+	+	+
Erythromycine	+	+	+	+	+
Irbesartan	+	++	+	++	++
Lidocaïne	+	+	+	++	+
Metformine	non détectée	+	non détectée	+	++
Méthylparabène	non détectée				
Métolachlore ESA	non détectée				
Métoprolol	+	+	+	+	++
Oxazépam	+	+	+	++	+
Paracétamol	non détectée				
Sotalol	+	+	+	+	+
Sucralose	+	+	+	+	+
Terbutryne	+	+	+	+	+
Tramadol	+	+	+	+	+
Valsartan	+	+	+	++	+
Venlafaxine	+	+	+	++	++

### 3.2 RESULTATS DES ANALYSES EN ESI (-) INERIS

#### Contrôles et blancs

Des contrôles qualité (mélange de ~50 composés en solvant) ont été injectés pendant la séquence (début, plusieurs en milieu (à peu près toutes les 10 injections en incluant les injections de blanc d'eau MilliQ (EMQ), fin). Les aires et les intensités ont présenté des valeurs identiques entre le premier et le dernier contrôle.

2 blancs d'EMQ ont été insérés entre les échantillons pour s'assurer qu'il ne restait pas d'effet de mémoire dans le système analytique. Aucun composé n'a été retrouvé dans les blancs d'EMQ.

Aucun des 2 étalons internes n'a été retrouvé dans les extraits. Le système analytique utilisé en mode ESI (-) présente une faible sensibilité pour le diclofénac (en mode négatif) et l'estrone ce qui pourrait expliquer le fait de ne pas avoir retrouvé ces composés.

#### Analyse en mode négatif auto MS/MS dans les échantillons du Gier

L'analyse en mode négatif auto MS/MS a été effectuée en aléatoire pour tous les échantillons (ordre de passage aléatoire des eaux d'Evian et des différents échantillons).

Une bibliothèque spécifique a été créée pour cette étude contenant la liste des composés préalablement listés. Tous les étalons analytiques de la liste ont été injectés individuellement au préalable à l'exception des valsartan, irbésartan et acide niflumique pour lesquels le laboratoire ne disposait pas des étalons. Pour

ces composés, des spectres MS/MS provenant de la base de données Agilent « Water PCDL » étaient disponibles (les comparaisons de spectre MS/MS pour des composés que nous avons injectés et qui sont également présents dans cette base de données (~50 composés) ont montré une très bonne concordance en termes de fragments et d'intensité relative de fragments).

Les données ont été traitées via le logiciel Masshunter. Un premier traitement de données s'effectue par le traitement sous Masshunter « find by formula » ce qui permet d'obtenir un score déterminé pour chaque composé détecté (ce score inclut 3 composantes comprenant la différence sur la masse exacte mesurée et celle de la base de données (déviations en masse acceptable comprise entre -5 et 5 ppm), la différence entre le ratio isotopique théorique et expérimental et l'espacement des isotopes). Les temps de rétention étaient également pris en compte comme critère d'identification pour les composés étalons injectés.

#### Analyse des blancs d'eau d'EVIAN

Dans les blancs d'eau d'Evian traités par Irstea, le bisphénol A a été détecté 3 fois aux 2 pH d'extraction testés (438333 de moyenne d'aire dans les blancs à pH 3 et 640216 de moyenne d'aire dans les blancs à pH 7) et le méthyl parabène 1 fois (109208 d'aire) à pH 7. Ce composé n'a pas été détecté pour les eaux d'Evian extraits à pH 3.

Dans les blancs d'eau d'Evian traités par l'INERIS, le bisphénol A a été détecté dans 2 échantillons (40913 de moyenne d'aire). Aucune détection du méthyl parabène n'a été constatée.

Dans les blancs d'eau d'Evian traitée par le BRGM à pH 3, le méthyl parabène a été détecté 2 fois (69143 de moyenne d'aire). Ce composé n'a pas été détecté pour les blancs extraits à pH 7. Aucune détection pour le bisphénol A n'a été retrouvée.

#### Analyse des échantillons

Le diclofénac, l'oxazépam, le diuron, le valsartan, l'acide niflumique, le benzotriazole, le sucralose, l'irbésartan ont été détectés avec un score supérieur à 70 (généralement des scores supérieurs à 90 sont obtenus, mais le score de 70 a été retenu comme niveau acceptable pour la suite du traitement des composés (ce score est surtout retenu dans le cadre de composés fortement influencés par le bruit)).

Le bisphénol A n'a été détecté à pH 3 qu'avec la méthode de l'Irstea. Les aires sont relativement faibles et sa présence pourrait être attribuée à de la contamination. Le bisphénol S, l'estrone, le méthyl parabène et le métolachlore ESA n'ont pas été détectés quelles que soient les méthodes. Le méthyl parabène et le métolachlor ESA n'ont pas été détectés en ESI (+). Ils ne sont donc pas présents ou présents à de très faibles niveaux de concentrations dans l'eau du Gier.

L'estrone est régulièrement détectée dans l'eau du Gier en analyse ciblée à des niveaux de concentration inférieurs à la limite de quantification. L'analyse non ciblée en spectrométrie de masse haute résolution ne permet pas d'atteindre un niveau de sensibilité suffisant pour ce composé.

Pour ces 4 molécules, nous ne pensons pas qu'il s'agisse de faux négatifs puisqu'ils n'ont pas été détectés avec les 5 méthodes d'extraction différentes.

Confirmation avec les temps de rétention et les spectres de la base de données

Le sucralose et l'oxazepam n'ont pas été confirmés avec les spectres de la base interne car les spectres disponibles dans cette base ont été réalisés en mode positif (les temps de rétention étaient cependant concordants). En revanche, ils ont été confirmés avec les spectres de la base de données Agilent « Water PCDL ».

Le diuron, le valsartan, l'acide niflumique, le benzotriazole, et l'irbésartan ont également été confirmés avec la comparaison des spectres (et les temps de rétention pour les composés dont nous avons injecté les étalons). Les composés ci-dessus ont été tous extraits et détectés avec les méthodes des différents laboratoires exceptés le valsartan, qui a été extrait uniquement avec les méthodes INERIS et Irstea à pH 7.

Seul le diclofénac et le bisphénol A (dans les 2 méthodes Irstea) n'ont pas été confirmés avec les spectres MS/MS (des injections supplémentaires par auto MS/MS avec une liste de préférence ont été spécifiquement effectuées par la suite mais ces composés n'ont pas pu être fragmentés à cause d'une très faible intensité, les temps de rétention sont cependant concordants).

Globalement, seuls les composés ayant fournis une réponse suffisante en mode négatif (peu influencés par le bruit) ont été considérés (figure 12). Pour le diclofénac, le diuron et à un degré moindre l'irbésartan et l'acide niflumique, peu de différences sont observées entre les différents essais. Pour le sucralose et le benzotriazole, les analyses des essais à pH 3 montrent une baisse du signal. Ce phénomène est également constaté pour le valsartan avec une absence de détection pour ces conditions ainsi qu'avec la méthode BRGM à pH 7.

Il peut être conclu que les meilleurs résultats pour les composés détectés en mode négatif ont donc été obtenus avec des méthodes d'extraction à pH 7 comme en ESI (+).

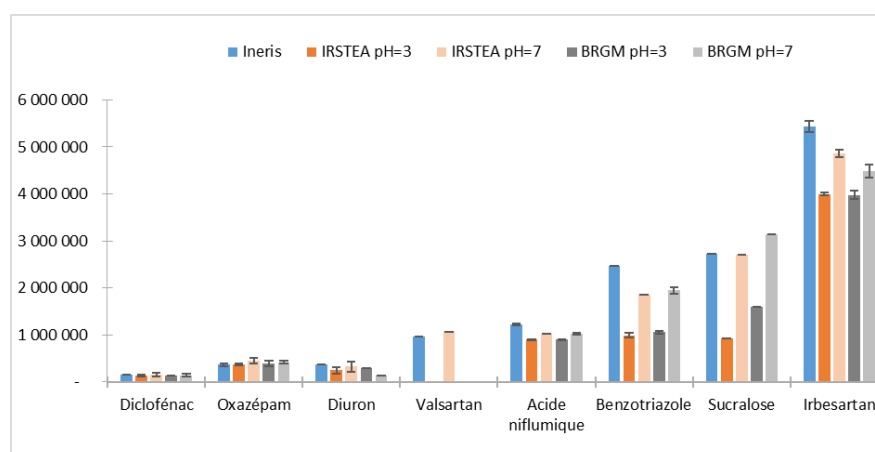


Figure 12 : Comparaison des aires des molécules avec écarts type (n=3)

### 3.3 COMPARAISON DES ANALYSES EN ESI (+) ET ESI (-)

#### Contamination des blancs

Le DEHP et l'Irbésartan ont été retrouvés en ESI (+). Par contre, nous n'observons pas de détection de l'Irbésartan en mode ESI (-). Pour l'ESI (-), le Bisphénol A et le méthylparabène ont été retrouvés. Les méthodes d'extraction à pH 7 montrent le plus de contaminations des blancs.

#### Détection des traceurs deutérés

Seule l'ESI (+) permet de détecter les traceurs utilisés dans cette étude. Il a été noté un problème de sensibilité en ESI (-). Des effets matrice en ESI (+) avec inhibition du signal sur le Diuron D6 sur les extraits d'eau du Gier ont été rencontrés quelle que soit la méthode d'extraction.

#### Détection des molécules communes aux 2 modes d'ionisation recherchées dans les extraits d'eau de rivière (Gier)

Dans les 2 modes d'ionisation, les extractions Ineris, Irstea et BRGM à pH 7 montrent une extraction plus efficace (réponses des composés plus intenses) comparées aux méthodes Irstea et BRGM à pH 3.

Pour l'irbésartan, le benzotriazole, l'acide niflumique : les 2 modes d'ionisation donnent les mêmes résultats dans les échantillons du Gier avec une meilleure extraction avec la méthode Ineris comparativement aux méthodes Irstea et BRGM à pH 7.

Pour le diclofénac et le diuron : les 2 modes d'ionisation donnent les mêmes résultats dans les échantillons du Gier avec les 3 types d'extraction.

Pour l'oxazepam : en ESI (+) la méthode d'extraction BRGM à pH 7 donne les meilleurs résultats alors qu'en ESI (-) on ne constate pas de différence significative entre les 3 méthodes d'extraction.

Pour le valsartan : en ESI (+) la méthode d'extraction BRGM à pH 7 donne les meilleurs résultats alors qu'en ESI (-) il n'est pas détecté dans les extraits de cette méthode d'extraction.

Pour le sucralose : en ESI (+) la méthode d'extraction Ineris donne les meilleurs résultats alors qu'en ESI (-) la méthode d'extraction BRGM à pH 7 donne les meilleurs résultats.

#### 4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, 5 méthodes d'extraction SPE d'une eau de rivière naturellement contaminée (Gier) ajustée à différents pH ont été réalisées par 3 laboratoires différents. L'analyse non ciblée de suspects en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution des extraits obtenus a été réalisée dans les 2 modes d'ionisation possibles soit en ESI (+) et en ESI (-). Cette analyse de suspects a permis de rechercher la présence de 28 molécules aux propriétés physico-chimiques diversifiées (log D à pH 3 compris entre -5,75 et 8,03).

Sur ces 28 molécules recherchées en ESI (+), 4 molécules (la cotinine, le méthylparabène, le métolachlore-ESA et le paracétamol) n'ont pas été détectées quelle que soit la méthode d'extraction. Globalement, les 3 méthodes d'extraction à pH 7 permettent de mieux détecter les molécules (intensité des signaux détectés plus importante). Par contre 2 molécules (le 2-hydroxyatrazine et la benzoylecgonine) ne sont pas extraites par la méthode multi-couches (Ineris).

De plus, de nombreux effets matrices ont été constatés avec ce mode d'ionisation.

Concernant l'analyse en ESI (-), 4 molécules (le bisphénol S, l'estrone, le méthylparabène et le métolachlore ESA) n'ont pas été détectées quelle que soit la méthode d'extraction. De la même manière qu'en ionisation positive, les 3 méthodes à pH 7 permettent d'obtenir des intensités des signaux détectés plus importantes.

Par contre, les traceurs deutérés ajoutés aux échantillons n'ont pas été détectés dans ce mode d'ionisation, en particulier par manque de sensibilité lié à un trop faible niveau de dopage. Nous préconisons d'utiliser un maximum de traceurs deutérés (traceurs d'extraction et d'injection) préférentiellement détectables dans les 2 modes d'ionisation et à des niveaux de concentration suffisants. Ces traceurs permettront en effet de bien qualifier les effets de matrice et les taux de récupération pour in fine mieux documenter les résultats obtenus sur les molécules détectées.

Compte tenu de la variabilité des résultats obtenus pour les différentes méthodes d'extraction testées, il n'est pas possible de conclure ni de recommander une méthode d'extraction unique à utiliser pour l'analyse non ciblée. Avec ce type de préparation d'échantillon non spécifique (quel que soit le type d'extraction testé lors de cette étude), il a été généralement constaté de nombreux effets matrices lors de la détection qui peuvent significativement réduire ou augmenter l'intensité du signal par composé et ainsi avoir un impact sur la détection et identification des molécules.

Par ailleurs, les 5 méthodes d'extraction SPE, bien que génériques pour les substances neutres moyennement polaires à hydrophobes détectées classiquement en chromatographie liquide, ne permettent pas d'extraire les substances très polaires et/ou ionisables (à l'exception de la metformine avec la méthode multicouche INERIS) ainsi que les substances très hydrophobes généralement analysées par chromatographie gazeuse.

Nous pouvons toutefois préconiser de réaliser les extractions des eaux à pH 7. L'extraction à ce pH semble apporter une information plus exhaustive avec des signaux plus intenses. Pour l'analyse non ciblée, les laboratoires doivent donc utiliser une méthode de préparation d'échantillon la moins spécifique possible tout en indiquant impérativement et de manière très précise les différents paramètres de la méthode de préparation d'échantillon utilisée.

Concernant l'analyse non ciblée de suspects, l'approche utilisée dans cette étude repose sur l'analyse d'un échantillon réel d'eau de rivière. Avec cette stratégie, nous ne disposons donc pas d'information exhaustive sur la présence effective des substances que nous avons recherchées (pas d'analyse ciblée avec confirmation par injection de standards analytiques). En conséquence il ne nous est pas formellement possible de mettre en évidence de faux positifs ou négatifs. Toutefois les analyses dans les 2 modes d'ionisation ESI (+) et ESI (-) apportent des informations complémentaires malgré le manque relatif de sensibilité constaté en ESI (-) par rapport à l'ESI (+). L'utilisation de ces 2 modes d'ionisation permet d'apporter une confirmation supplémentaire de la présence de molécules s'ionisant en positif et en négatif. De plus, certaines molécules ne sont détectables qu'en ionisation négative. Il est donc important de réaliser l'analyse non ciblée d'un échantillon dans ces 2 modes d'ionisations en LC-HRMS.

Il est important de noter que cette étude ne s'appuie que sur quelques composés ciblés d'intérêt. Néanmoins, compte tenu de la gamme des substances recherchées en termes de propriétés physico-chimiques, les conclusions émises peuvent être considérées applicables à une large gamme de substances organiques présentes dans les milieux aquatiques.

Cette étude a ainsi permis d'illustrer certaines des limites de l'analyse non ciblée dont les résultats dépendent de plusieurs étapes du processus analytique (extraction/concentration des molécules à partir de la matrice eau, séparation sur colonne chromatographique et détection par spectrométrie de masse après ionisation).

En perspective de cette étude, un traitement statistique de l'ensemble des données acquises est envisagé pour élargir l'analyse sur une plus grande gamme de molécules (analyse sans *a priori* des empreintes moléculaires).