

Partenariat 2009 – *Domaine Substances Polluantes - Action 13 : Développement et optimisation des méthodes physico-chimiques*



Synthèse bibliographique

Méthodes d'analyse du DEHP (di(2-éthylhexyl)phtalate) dans les organismes biologiques

Rapport final

Schiavone S. et Coquery M. (Cemagref Lyon)

Septembre 2010

Avec les partenaires :



Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2009 dans le cadre du partenariat ONEMA – Cemagref 2009, au titre de l'action 13 « Développement et optimisation des méthodes physico-chimiques » du domaine « Substances polluantes ».

Les auteurs

Séverine Schiavone
Ingénieur d'études
severine.schiavone@cemagref.fr
Cemagref Lyon

Marina Coquery
Directrice de recherche, responsable scientifique du laboratoire d'analyses physico-chimiques des milieux aquatiques, UR MALY.
marina.coquery@cemagref.fr
Cemagref Lyon

Les correspondants

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

Cemagref : Marina Coquery, Cemagref Lyon, *marina.coquery@cemagref.fr*.

Référence du document : Schiavone S., Coquery M. (2010). Synthèse bibliographique : méthodes d'analyse du DEHP (di(2-éthylhexyl)phtalate) dans les organismes biologiques. Cemagref, 20 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>

Synthèse bibliographique : méthodes d'analyse du DEHP (di(2-éthylhexyl)phthalate) dans les organismes biologiques
Rapport final
S. Schiavone et M. Coquery

Sommaire

Abréviations	5
1. Contexte et objectifs	6
2. Méthodologie et résultats	8
2.1 Méthodologie	8
2.2 Analyse des publications	12
3. Recommandations et conclusion	14
Bibliographie	17

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Formule du DEHP.....	7
---------------------------------	---

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Synthèse bibliographique - Méthodes d'analyse du DEHP (di(2-éthylhexyl)phthalate) dans les organismes biologiques.....	9
--	---

Synthèse bibliographique : méthodes d'analyse du DEHP (di(2-éthylhexyl)phtalate) dans les organismes biologiques
S. Schiavone et M. Coquery

RESUME

La directive cadre eau (2000/60/CE) et la directive européenne du 16 décembre 2008 stipulent que le contrôle des sédiments et du biote doit être régulièrement effectué pour les substances prioritaires et autres substances polluantes considérées bioaccumulables. Cependant aucune norme existe actuellement pour l'analyse de certaines de ces substances dans le biote, telle que le DEHP (di(2-éthylhexyl)phtalate).

Nous avons donc effectué une synthèse bibliographique sur l'analyse du DEHP dans les organismes biologiques. A partir de ces travaux, une méthodologie analytique est proposée :

- Une extraction par solvant pressurisé ou une extraction aux ultrasons sont recommandées, avec un solvant d'extraction apolaire. L'hexane, largement utilisé, est un solvant toxique. L'heptane ou l'isooctane sont préférables ; le rendement d'extraction devra être dans ce cas vérifié.
- Une purification par chromatographie de partage sur gel est recommandée afin d'éliminer les grosses molécules lipidiques et ainsi diminuer les interférences lors de l'analyse. Dans le cas où celles-ci seraient encore trop importantes, une purification supplémentaire sur une phase de silicate de magnésium ou de silice peut permettre d'éliminer des composés polaires.
- Un dosage par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est recommandé. La norme AFNOR NF EN ISO 18856 pour le dosage des phtalates dans les eaux propose des conditions opératoires pour cette étape. L'utilisation d'un traceur méthode est conseillé.
- Etalon interne : afin de s'affranchir des interférences lors du dosage du DEHP dans une matrice complexe telle que le biote, l'utilisation d'un étalon interne est recommandé.
- Validation : les limites de quantification les plus basses obtenues sont de 1 à 3 µg/kg poids frais dans les organismes biologiques. Des dopages réguliers, afin de suivre les performances de la méthode et de vérifier l'absence de contamination, sont recommandés.
- Contamination : lors de chaque étape de pré-traitement et d'analyse de l'échantillon, une attention particulière devra être portée à la prévention de la contamination. L'échantillon ne doit pas être mis en contact avec des outils ou objets en plastique, la vaisselle et les réactifs devront être décontaminés et l'environnement du laboratoire devra être vérifié. Des blancs méthodes doivent être régulièrement vérifiés.

MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Analyse chimique, DEHP, directive cadre eau, biote, norme, phtalate, substance prioritaire.

Abréviations

BCF	Facteur de bioconcentration
ECD	Détecteur à capture d'électrons
ESI	Ionisation par electrospray
DEHP	Di(2-éthylhexyl)phtalate
DnOP	Di-n-octyl phtalate
FID	Détecteur à ionisation de flamme
GC	Chromatographie gazeuse
GPC	Chromatographie de partage sur gel
LC	Chromatographie liquide
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
MS	Spectrométrie de masse
PFE	Extraction par fluide pressurisé
SPE	Extraction sur phase solide

Synthèse bibliographique : Méthodes d'analyse du DEHP (di(2-éthylhexyl)phthalate) dans les organismes biologiques
S. Schiavone et M. Coquery

1. Contexte et objectifs

La directive cadre eau (DCE ; EC, 2000) et la directive européenne du 16 décembre 2008 (EC, 2008) définissent 33 substances prioritaires et 8 autres substances polluantes à surveiller dans les masses d'eau et fixent les normes de qualité environnementale (NQE) à respecter dans les eaux. Ces directives stipulent également que le contrôle des sédiments et du biote (ou organisme biologique) doit être régulièrement effectué pour les molécules bioaccumulables, telle que le di(2-éthylhexyl)phthalate (DEHP), afin de donner une image réelle de l'état des masses d'eau et de suivre sur le long terme les concentrations des substances prioritaires. Selon le CMA (2010), une molécule est considérée bioaccumulable lorsque son BCF est supérieur à 100. Le BCF est calculé comme étant le rapport entre la valeur de polluant mesurée dans l'organisme biologique et celle mesurée dans l'eau. Le DEHP a un BCF compris entre 840 et 2700 selon l'organisme biologique considéré¹.

Dans une synthèse intitulée « Méthodes de référence existantes pour l'analyse des substances prioritaires dans les sédiments et le biote » (Schiavone et Coquery, 2009a) réalisée dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2008 et du partenariat ONEMA – Cemagref 2008, il a été mis en évidence qu'aucune norme n'existait pour l'analyse des chloroalcanes C10-C13, du nonylphénol et de l'octylphénol dans les sédiments. Concernant l'analyse du DEHP dans les sédiments, 3 méthodes reconnues ont été référencées dans ce document : les méthodes EPA 8061A (1996) et 8270D (2007) de l'Environmental Protection Agency² (EPA) et la méthode MA. 400 – COSVc 1.0, Rév 3 (2009) du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec³. En revanche, aucune méthode officielle n'a été trouvée pour l'analyse de 11 substances dans le biote dont 3 bioaccumulables (EC, 2008) : le DEHP, les chloroalcanes C10-C13 et l'hexachlorobutadiène.

¹ EUR 23384 EN/2. Institute for Health and Consumer Protection - Toxicology and Chemical Substance (TCS) - European Chemicals Bureau. Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Summary Risk Assessment Report. 2008.

² <http://www.epa.gov/osa/fem/methcollectns.htm>

³ <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/index.htm>

Une synthèse bibliographique sur l'analyse du DEHP dans le biote a donc été effectuée dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2009 et du partenariat ONEMA – Cemagref 2009 ; de plus, une synthèse a porté sur l'analyse du nonylphénol et de l'octylphénol dans les sédiments (Schiavone et Coquery, 2009b). L'analyse de l'hexachlorobutadiène dans le biote a déjà fait l'objet d'une synthèse bibliographique incluse dans la synthèse « Méthodes de référence existantes pour l'analyse des substances prioritaires dans les sédiments et le biote » (Schiavone et Coquery, 2009a) et l'analyse des chloroalcanes C10-C13 dans les sédiments est prévue en 2010. Le but de ces synthèses est de parvenir à dégager un protocole pouvant servir de point de départ pour le développement et la validation d'une méthode d'analyse de ces substances.

Le DEHP, de formule brute $C_{24}H_{38}O_4$ et de numéro CAS 117-81-7, est un ester de la famille des phtalates. Il est utilisé le plus souvent comme plastifiant afin d'accroître la flexibilité des plastiques.

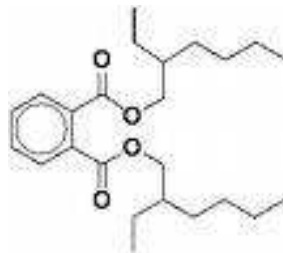


Figure 1 : formule du DEHP

Le DEHP est classé en catégorie 2 pour la reproduction et le développement dans l'annexe I de la directive 1967/548/CEE⁴ (substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité dans l'espèce humaine ou causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine) et est inclus dans l'annexe 1 de la directive 2003/36/CE⁵ (substances classées cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction – CMR). Le DEHP étant particulièrement accumulable dans le biote, comme le montre son BCF compris entre 840 et 2700 selon l'organisme biologique considéré, il est important de pouvoir le quantifier dans cette matrice.

⁴ Directive 1967/548/CEE du Conseil, du 27 juin 1967, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.

⁵ Directive 2003/36/CE du Parlement européen et du Conseil du 26 mai 2003 portant vingt-cinquième modification de la directive 76/769/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses.

2. Méthodologie et résultats

2.1 Méthodologie

Les moteurs de recherche Science Direct⁶ et celui de Scopus disponible au Cemagref ont été utilisés en cherchant les mots clés suivants couplés deux à deux : biota, DEHP, environmental analysis, fish, organisms, phthalate.

Les publications en langue anglaise postérieures à 1990 ont été retenues. Cependant, les travaux de Huang *et al* (2008) n'a pas été inclus dans cette synthèse car cette publication présentait un protocole d'extraction par PFE peu clair.

Les publications sont présentées par ordre chronologique puis, pour chaque année, par auteur. Dans la synthèse, les éléments suivants sont décrits :

- Titre publication
- Auteurs
- Année de publication
- Fraction et prise d'essai
- Préparation échantillon : description des étapes d'extraction, de purification,...
- Dans cette partie les méthodes de conservation, qui ne font pas l'objet de cette synthèse, ne sont pas détaillées.
- Technique analytique
- Informations sur la validation et sur l'assurance qualité (linéarité, étalon interne, répétabilité, rendements, blancs...)
- LQ ou LD en $\mu\text{g}/\text{kg}$ – poids à l'état frais
- Concentrations mesurées en $\mu\text{g}/\text{kg}$ poids frais. Ces concentrations, pour pouvoir être comparées, doivent être normalisées par la teneur en lipides trouvée dans l'échantillon. Celle-ci n'étant que très rarement précisée, elle n'apparaît pas dans le tableau 1.

⁶ www.sciencedirect.com

Tableau 1 : Synthèse bibliographique - Méthodes d'analyse du DEHP (di(2-éthylhexyl)phthalate) dans les organismes biologiques

Titre publication	Auteurs	Année	Type d'organisme et prise d'essai (poids frais)	Préparation échantillon	Technique analytique	Informations sur la validation (linéarité, répétabilité, rendements, blancs...)	LD ou LQ (µg/kg - poids à l'état frais)	Concentrations mesurées (en µg/kg poids à l'état frais)
Phthalate acids esters in <i>Potamogeton crispus</i> L. from Haihe river, China.	Chi J.	2009	Plante (feuilles) et racines - 1 g.	<u>Extraction</u> : par agitation mécanique. <i>Solvant d'extraction</i> : dichlorométhane. <u>Purification</u> : pas de purification.	GC/FID GC/MS utilisé afin de confirmer les composés	Vérification de la linéarité entre 0,05 et 10 mg/L (coefficient de corrélation >0,99). Rendements obtenus en dopant 1 g de plante avec 0,05 mg/kg de DEHP : >88,4%. Analyses en triplicats. RSD compris entre 6 et 18%. Vérification d'un blanc solvant, d'un blanc méthode et d'une solution étalon de DEHP lors de chaque séquence.	LD : 2 Obtenue comme étant le premier point dont le pic a un rapport signal sur bruit de 3.	Plantes (feuilles) : entre 163 et 1286 (moyenne 457) en poids frais. Racines : comprises entre 1190 et 5130 (moyenne 3220) en poids sec.
Residual concentrations of micropollutants in benthic mussels in the coastal areas of Bohai Sea, North China	Liu W.X., Chen J.L., Lin X.M., Fan Y.S., Tao S.	2007	Moule – 20 g.	<u>Extraction</u> : par soxhlet. <i>Solvant d'extraction</i> : n-hexane/dichlorométhane 2/1 v/v. <u>Purification</u> : sur colonne. <i>Solvant d'élution</i> : n-hexane/dichlorométhane 80/20. <i>Phase</i> : silice/alumine. Remarque : dans la colonne, de la poudre de cuivre est ajoutée pour inclure une purification supplémentaire l'extrait (désulfuration).	GC/MS	nd	nd	nd
Adapting an ambient monitoring program to the challenge of managing emerging pollutants in the San Francisco estuary	Hoenicke R., Oros D.R., Oram J.J., Taberski K.M.	2007	Bivalves – 10 g.	<u>Extraction</u> : par PFE. <i>Solvant d'extraction</i> : acétone/dichlorométhane 50/50 v/v. <u>Purification</u> : par GPC.	GC/MS	Blancs terrain suivis.	nd	Non reportée car contamination dans les blancs (contamination >30% de la concentration mesurée dans les échantillons).
Studies of uptake, elimination and late effects in Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) dietary exposed to di-2-éthylhexyl phthalate (DEHP) during early life.	Norman A., Börjeson H., David F., Tienpont B., Norrgren L.	2007	Saumon (tissus adipeux) - 3 à 15 g.	<u>Extraction</u> : aux ultrasons. <i>Solvant d'extraction</i> : cyclohexane. <u>Purification</u> : par GPC.	GC/MS	Etalonnage interne. (d ₄ -DEHP) Rendements compris entre 89 et 94%.	LQ : 1 (pour un poisson contenant 5% de lipides). Calculée à partir du blanc méthode.	16 (équivalent à 780 µg/kg de graisse).

Titre publication	Auteurs	Année	Type d'organisme et prise d'essai (poids frais)	Préparation échantillon	Technique analytique	Informations sur la validation (linéarité, répétabilité, rendements, blancs...)	LD ou LQ (µg/kg - poids à l'état frais)	Concentrations mesurées (en µg/kg poids à l'état frais)
Occurrence of phthalate esters in the environment of the Netherlands.	Peijnenburg W.J.G.M., Struijs J.	2006	Poisson - 25 g. Herbe et choux - 25 g.	<u>Extraction</u> : aux ultrasons. <i>Solvant d'extraction</i> : cyclohexane/acétone 50/50. Remarque : une extraction supplémentaire par agitation mécanique est effectuée. <u>Purification</u> : par GPC. <u>Purification</u> : par SPE. <i>Solvant d'extraction</i> : non renseigné. <i>Phase</i> : non renseignée. <u>Purification</u> (étape supplémentaire pour les végétaux) : par SPE. <i>Solvant d'éluion</i> : non renseigné. <i>Phase</i> : Florisil.	GC/ECD	Linéarité testée aussi avec de l'huile d'olive entre 0 et 7500 ng/g de graisse. Le coefficient de corrélation est >0,99. Etalonnage interne (d ₄ -DEHP). Rendements testés avec de l'huile d'olive dopée à 500 ppb : >80%. Les résultats sont corrigés par le blanc (type de blanc non spécifié). Concentration maximum admise dans les blancs instrument : 5 µg/L (<50% de l'aire de pic du point de calibration le plus bas à 10 µg/L).	Poissons : LD 100 µg/kg de graisse (équivalente à 1 µg/kg poids frais). Végétaux : LQ de 50 µg/kg de matière sèche. LD déterminée par les blancs méthodes. LQ calculée comme étant 2 fois la valeur du blanc.	nd
Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (<i>Eisenia fetida</i>) in artificially contaminated soils.	Hu X.Y., Wen B., Zhang S., Shan X.Q.	2005	Ver de terre - 2,5 g environ.	<u>Extraction</u> : par soxhlet. <i>Solvant d'extraction</i> : hexane/dichlorométhane 50/50. <u>Purification</u> : sur colonne. <i>Solvant d'éluion</i> : hexane puis dichlorométhane. <i>Phase</i> : gel de silice.	GC/ECD	Les données de recouvrement ne sont pas données dans la matrice d'intérêt mais dans les sols (rendements compris entre 75 et 112% et RSD sur n=9 compris entre 7 et 26%). Blancs méthodes et dopages dans chaque série d'analyse.	LD de 6,14 Calculée sur la base d'un ratio signal sur bruit de 3.	nd
Identification and quantification of n-octyl esters of alkanolic and hexanedioic acids and phthalates as urban wastewater markers in biota and sediments from estuarine areas.	Chaler R., Cantón L., Vaquero M., Grimalt J.O.	2004	Ver marin, muscle d'huître, de crabe et de poisson - 18 g.	<u>Extraction</u> : par agitation mécanique. <i>Solvant d'extraction</i> : n-hexane. <u>Purification</u> : sur colonne <i>Solvant d'éluion</i> : n-hexane/dichlorométhane 80/20. <i>Phase</i> : alumine/silice.	GC/FID GC/MS utilisé afin de confirmer les composés	Blancs méthodes inférieurs à la LD. Blancs méthodes dans chaque séquence. Blancs terrains pour chaque campagne.	LD : ver 20 ; crabe 20 ; poisson 40 et huître 10 Méthode de détermination non spécifiée.	nd

Titre publication	Auteurs	Année	Type d'organisme et prise d'essai (poids frais)	Préparation échantillon	Technique analytique	Informations sur la validation (linéarité, répétabilité, rendements, blancs...)	LD ou LQ (µg/kg - poids à l'état frais)	Concentrations mesurées (en µg/kg poids à l'état frais)
Annual monitoring results 2002	Regional Monitoring Program	2004	Moule, huître, mollusque - 10 g.	Extraction : par PFE. Solvant d'extraction : acétone/dichlorométhane 50/50 v/v. Purification : par GPC.	LC/MS	Non disponibles au moment de la publication.	Non disponibles au moment de la publication.	En poids sec : Huîtres : 84 - 558 Mollusque : 257 - 350
Determination of phthalate ester congeners and mixtures by LC/ESI-MS in sediments and biota of an urbanized marina inlet.	Lin Z.P., Ikonomou M.G., Jing H., Mackintosh C., Gobas F.A.P.C.	2003	Poissons (muscle) - 5 g.	Extraction : aux ultrasons. Solvant d'extraction : dichlorométhane/hexane 50/50 v/v. Remarque : une extraction supplémentaire par agitation mécanique est effectuée. Purification : sur colonne. Solvant d'élution : dichlorométhane/hexane 50/50 v/v. Phase : alumine. Purification (étape supplémentaire lors de l'analyse par GC/MS) : sur colonne. Solvant d'élution : dichlorométhane puis acétone/dichlorométhane 5/95. Phase : Florisil.	LC/ESI-MS GC/MS	LC/ESI-MS : linéarité testée de 0,0028 à 42,8 µg/mL. Etalonnage interne (DnOP-d ₄) Dopages compris entre 0,1 et 5 µg/g. Les données de recouvrement ne sont pas présentées dans la matrice d'intérêt mais dans les sédiments (compris entre 71 et 106% avec un RSD<15%). Blancs méthiodes dans chaque séquence.	LD GC/MS : 3,3 LD LC/MS : 4,2 LD définie comme 3 fois le coefficient de variation des blancs méthodes (n=12).	nd

nd : non indiqué

2.2 Analyse des publications

Un total de 9 publications récentes a été obtenu. Elles sont décrites dans le tableau

1. L'analyse de ces résultats est présentée ci-après :

- Préparation échantillon : Le pré-traitement n'est pas détaillé dans cette synthèse où l'effort est mis sur la préparation et le dosage du DEHP. On peut cependant relever que, le plus souvent, l'échantillon est séché, congelé, le cas échéant disséqué et homogénéisé.
- Prise d'essai : elle varie de 1 à 25 g et se situe en général autour de 10 g poids frais.
- L'étape d'extraction sur les 9 publications étudiées, l'extraction aux ultrasons est réalisée dans 3 cas et celles au Soxhlet, par simple agitation mécanique et par PFE, dans 2 cas respectivement.

Le solvant d'extraction utilisé est le plus souvent un mélange de solvants apolaires : un mélange hexane/dichlorométhane est utilisé 3 fois sur les 9 publications étudiées et un mélange dichlorométhane/acétone 2 fois. Ensuite chaque publication utilise un solvant ou un mélange de solvants différent : un mélange cyclohexane/acétone, de l'hexane, du dichlorométhane ou du cyclohexane.

- L'étape de purification : dans le cas des végétaux, une publication analyse les plantes sans effectuer aucune purification et l'autre, qui analyse de l'herbe et du chou, effectue une SPE supplémentaire (par rapport à la purification du poisson, également analysé) pour éliminer les stéroïdes sur une phase Florisil. Dans les 7 autres publications concernant les poissons, mollusques, crustacés et vers, la purification est effectuée dans 3 cas par GPC, dans 2 cas sur colonne silice/alumine, dans 1 cas sur colonne silice, dans 1 cas sur colonne alumine et dans 1 cas par GPC suivie d'une SPE (phase non renseignée). La publication utilisant une purification sur colonne alumine, ajoute une purification supplémentaire sur colonne Florisil dans le cas où les analyses sont faites par GC. De plus, une des publications mentionne l'ajout de cuivre pour l'élimination du soufre.

Le solvant d'élution est le plus souvent un mélange de solvants apolaires : mélange hexane/dichlorométhane dans 3 cas sur 4. Le dichlorométhane est utilisé dans la 4^{ème} publication. Les publications utilisant une purification par GPC n'ont pas été ici prises en compte, le solvant utilisé n'étant pas dans cette technique un paramètre critique.

- Les techniques analytiques diffèrent également. L'analyse par GC/MS est utilisée dans 3 cas sur 9, celle par GC/FID dans 2 cas sur 9 avec des résultats confirmés par GC/MS dans les 2 cas. Une analyse par GC/ECD est effectuée dans 2 cas et une analyse par LC/MS dans 1 cas. Dans la dernière publication, l'analyse par LC/MS ainsi que celle par GC/MS sont testées.

- Les LQ : pour comparer entre elles les valeurs citées dans les différentes publications, lorsque seules les LD étaient mentionnées, celles-ci ont été multipliées par 3 pour obtenir la LQ.

Pour les végétaux, les LQ obtenues sont de 6 µg/kg (poids frais) et 50 µg/kg (poids sec), les végétaux étant analysés dans 2 publications. Pour les poissons, mollusques, crustacés et vers les LQ sont comprises entre 1 et 120 µg/kg (poids frais). On peut noter que 3 publications ne citent pas de LQ.

Les comparaisons de LQ sont difficiles, celles-ci dépendant entre autres de la prise d'essai ou de la façon de la calculer (LQ instrumentale ou LQ globale), pas toujours précisée.

- Autres paramètres de validation :
 - Etalonnage interne : 3 publications sur 9 l'utilisent, 2 avec le DEHP-d₄ et 1 avec le DnOP-d₄, cette dernière molécule servant à analyser d'autres phtalates également.
 - Rendements : 1 publication détaille son protocole de dopage et obtient un rendement >88,4% (matrice : plante). 3 autres publications sont aussi détaillées mais les dopages ne sont pas fait dans une matrice d'intérêt pour cette synthèse : huile d'olive, sol et sédiment. 1 autre publication ne détaille pas ses résultats et 4 ne présentent pas de résultats chiffrés de rendements.
 - Précision : pratiquement aucune information n'est donnée. Une publication détaillent son protocole de dopage dans les plantes et obtient un RSD compris entre 6 et 18%. Deux publications sur les trois détaillent leur protocole de dopage dans des matrices autre que du biote, et obtiennent des RSD compris entre 7 à 26% pour l'une et <15% pour l'autre.
 - Blancs : 5 publications vérifient les blancs. Des blancs solvants (blancs analytiques servant à vérifier l'absence de contamination lors de l'étape de dosage), des blancs méthodes (blancs procédures vérifiant l'absence de contamination de tout le processus d'analyse de l'échantillon, de l'extraction au dosage) et, beaucoup moins souvent, des blancs terrains sont analysés.

Dans un cas, la valeur du blanc est retranchée et dans un autre elle est trop élevée pour permettre de rendre des résultats. Dans les autres cas, la valeur maximale admise dans le blanc n'est pas mentionnée.

3. Recommandations et conclusion

A partir de cette synthèse bibliographique sur l'analyse du DEHP dans les organismes biologiques, des recommandations sur une méthode d'analyse qui pourrait constituer une base à un développement analytique plus complet sont détaillées ci-après :

- **Extraction :** l'extraction par PFE est recommandée à cause de sa plus grande efficacité par rapport aux autres méthodes (ultrasons, soxhlet ou simple agitation mécanique). Cette technique permet aussi de limiter la consommation de solvant et de diminuer le temps d'extraction. L'extraction aux ultrasons, par sa simplicité de mise en œuvre, peut aussi être utilisée, si son efficacité est vérifiée et prouvée.

Le solvant d'extraction doit être apolaire et des mélanges de solvants apolaires peuvent être testés. Les publications listées dans le tableau 1 utilisant souvent des solvants considérés comme dangereux, d'autres mélanges devraient être testés : en particulier l'hexane qui pourrait être remplacé par l'heptane ou l'isooctane, après vérification de leur efficacité.

- **Purification :** dans le cas de matrices telles que les poissons, crustacés ou mollusques, une purification par GPC est recommandée afin d'éliminer les grosses molécules lipidiques.

Si l'analyse de l'extrait montre des interférences encore trop élevées après la GPC, une purification supplémentaire sur colonne, sur une phase de silicate de magnésium, devra être effectuée afin d'éliminer des interférents polaires pouvant encore être présents dans la matrice.

De plus, si des interférences liées au soufre sont observées lors de la quantification, une désulfuration devra être effectuée par ajout de cuivre.

- **Dosage :** selon cette synthèse, le dosage par GC/MS, GC/FID GC/ECD et LC/MS semble possible. Les analyses par GC/FID et GC/ECD impliquent nécessairement une étape de confirmation soit par l'utilisation de deux colonnes différentes soit par GC/MS.

La technique de chromatographie la plus utilisée en couplage avec la masse dans cette synthèse, et que nous recommandons, est la GC/MS. Cette technique est en effet celle utilisée dans la norme AFNOR NF EN ISO 18856 (2005) d'analyse des phtalates dans les eaux ; et une extension de cette méthode au dosage dans les organismes biologiques serait plus aisée à mettre en oeuvre par les laboratoires pratiquant déjà la méthode d'analyse du DEHP dans les eaux.

- Validation : très peu de données de validation sont présentées qui permettraient de comparer les performances des différentes méthodes décrites. Les meilleures performances en termes de LQ sont de l'ordre de 1 à 3 µg/kg (poids frais) obtenues par GC/MS (LQ instrumentale).

Des dopages réguliers, avant extraction, dans la matrice d'intérêt devront être réalisés afin de vérifier l'absence d'interférences.

- Contamination : une des difficultés de l'analyse du DEHP est d'obtenir des blancs « méthodes » propres, c'est-à-dire suffisamment faibles par rapport aux concentrations à mesurer. Une publication (sur les 9 étudiées) ne peut rendre de résultats quantifiés dans les échantillons à cause de blancs trop élevés (> 30% aux concentrations mesurées dans les échantillons, valeurs non précisées).

Les phtalates étant utilisés en tant qu'agents plastifiants, ils sont omniprésents dans les matériels de laboratoire et aussi dans l'atmosphère. Il faut aussi veiller à contenir la contamination lors de chaque étape de l'analyse et éviter de mettre en contact l'échantillon avec des éléments plastiques : cartouches desséchantes pour les gaz vecteurs, septa d'injection, raccords de seringue, gants en plastique utilisés par les opérateurs, etc.

Peijnenburg et. al. (2006) effectue une purification sur cartouches commerciale SPE sans observer de contamination. Dans le but d'éviter de mettre en contact l'échantillon avec des surfaces plastiques, nous recommandons de ne pas utiliser de cartouches commerciales plastiques pour la purification, mais plutôt une étape sur colonne en verre.

Il est primordial de décontaminer la vaisselle (en verre) utilisée ainsi que de proscrire l'utilisation de tout outil en plastique lors de la préparation de l'échantillon. Un protocole détaillé de décontamination de la verrerie est donné dans la norme AFNOR NF EN ISO 18856 (2005). En bref, la vaisselle est nettoyée au lave-vaisselle, chauffée au four à moufle à 400 °C et rinçage à l'isooctane.

Les réactifs utilisés devront également être chauffés à 400°C au four à moufles.

Le DEHP étant à surveiller dans le biote, il est important de développer et valider une méthode d'analyse du DEHP dans cette matrice ; puis de la normaliser. Les recommandations de cette synthèse peuvent servir de point de départ à un protocole analytique. Il serait nécessaire également de travailler sur la possibilité de fabriquer 1 MRC pour le DEHP dans le biote.

Bibliographie

AFNOR NF EN ISO 18856. Qualité de l'eau – Dosage de certains phtalates par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. 2005, 43 p.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Détermination des composés organiques semi-volatils complémentaires : dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. MA. 400 – COSVc 1.0, Rév 3. *Ministère du développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec*. 2009, 17 p.

Chaler R., Cantón L, Vaquero M., Grimalt J.O. Identification and quantification of n-octyl esters of alkanolic and hexanedioic acids and phthalates as urban wastewater markers in biota and sediments from estuarine areas. *J. Chromatog. A*, 2004, 1046, 203-210.

Chi J. Phthalate acids esters in *Potamogeton crispus L.* from Haihe river, China. *Chemosphere*, 2009, 77, 48-52.

CMA. Drafting group sediment and biota chemical monitoring. Ineris, ISS, JRC IES et IRSA. Guidance on chemical monitoring of sediment and biota under the water framework directive, version 7, juin 2010, 72 p.

E.C., directive 2008/105/CE du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 85/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE. /JO L 348 du 24.12.2008, 2008, /84-97.

EPA - Method 8061A. Phthalate esters by gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD). 1996, 18 p.

EPA - Method 8270D. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), 2007, 72 p.

Hoenicke R., Oros D.R., Oram J.J., Taberski K.M. Adapting an ambient monitoring program to the challenge of managing emerging pollutants in the San Francisco Bay. *Environ. Res.* 2007, 105, 132-144.

Hu X.Y, Wen B., Zhang S., Shan X.Q. Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2005, 62, 26-34.

Huang P.C., Tien C.J., Sun Y.M., Hsieh C.Y., Lee C.C. Occurrence of phthalates in sediment and biota : Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. *Chemosphere*. 2008, 73, 539-544.

Lin Z.P., Ikononou M.G., Jing H., Mackintosh C., Gobas F.A.P.C. Determination of phthalate ester congeners and mixtures by LC/ESI-MS in sediments and biota of an urbanized marina inlet. *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 37, 2100-2108.

Liu W.X., Chen J.L., Lin X.M., Fan Y.S., Tao S. Residual concentrations of micropollutants in benthic mussels in the coastal areas of Bohai Sea, North China. *Env. Poll.*, 2006, 146, 470-477.

MEDAD. Circulaire du 7 mai 2007 définissant les « normes de qualité environnementale provisoires (NQE_p) » des 41 substances impliquées dans l'évaluation de l'état chimique des masses d'eau ainsi que des substances pertinentes du programme national de réduction des substances dangereuses dans l'eau. MEDAD 2007/15, 2007, 13 p.

Norman A., Börjeson H., David F., Tienpont B., Norrgren L. Studies of uptake, elimination and late effects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) dietary exposed to di-2-éthylhexyl phthalate (DEHP) during early life. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2007, 52, 235-242.

Peijnenburg W.J.G.M., Struijs J. Occurrence of phthalate esters in the environment of the Netherlands. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2006, 63, 204-215.

San Francisco Estuary Institute. 2002 Annual monitoring results. The San Francisco Estuary Regional Monitoring Program for Trace Substances (RMP). *San Francisco Estuary Institute, Oakland, CA*. 2004

Schiavone S., Coquery M. Méthodes de référence existantes pour l'analyse des substances prioritaires dans les sédiments et le biote. *Cemagref*, 2009a, 51 p.

Schiavone S., Coquery M. Synthèse bibliographique : méthodes d'analyse de l'octylphénol et du nonylphénol dans les sédiments et les organismes biologiques. *Cemagref*, 2009b, 32 p.



Partenariat 2009
Domaine Substances Polluantes
Action 13 : Développement et optimisation
des méthodes physico-chimiques





Partenariat 2009
Domaine Substances Polluantes
Action 13 : Développement et optimisation
des méthodes physico-chimiques



Onema
Hall C – Le Nadar
5 square Félix Nadar
94300 Vincennes
01 45 14 36 00
www.onema.fr

Cemagref Lyon
3 bis quai Chauveau
CP 220,
69336 Lyon cedex 09
04 72 20 87 87
www.cemagref.fr