

Evaluation d'une méthode de dosage des phtalates par SPME-GC/MS dans la phase dissoute des eaux dans l'optique d'une validation NF T90-210

Amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques

Jérôme Beaumont, Francois Lestremau
Août 2015

Programme scientifique et technique
Année 2014

Document final

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2014 dans le cadre du partenariat ONEMA - AQUAREF 2014, au titre de l'action D - Amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques.

Les auteurs :

Jérôme Beaumont
INERIS
Jerome.beaumont@ineris.fr

Francois Lestremau
INERIS
francois.lestremau@ineris.fr

Vérification du document :

J. Cabillic - julie.cabillic.lne.fr
S. Lardy-Fontan - sophie.lardy-fontan@lne.fr
LNE

S. Bristeau - s.bristeau@brgm.fr
JP. Ghestem - jp.ghestim@brgm.fr
BRGM

Les correspondants

Onema : Pierre-François Staub

Etablissement :

Référence du document : J. Beaumont, F. Lestremau, Evaluation d'une méthode de dosage des phtalates par SPME-GC/MS dans la phase dissoute des eaux dans l'optique d'une validation NF T90-210 - Rapport AQUAREF 2014 - 61p

Droits d'usage :	<i>Diffusion restreinte</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>

1. GLOSSAIRE	7
2. INTRODUCTION.....	9
3. COMPOSES ETUDIES	11
4. DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE	13
4.1 Matériel utilisé et conditions chromatographiques	13
4.2 Choix de la colonne chromatographique	13
4.3 Traitement d'échantillon par SPME	16
4.3.1 Traitement du matériel utilisé	16
4.3.2 Blanc système.....	16
4.3.3 Blanc fibre SPME 65 µm PDMS/DVB	17
4.3.4 Test de différentes matrices.....	18
4.3.5 Fonctions d'étalonnage.....	21
4.3.6 Suivi des étalons internes	24
5. TEST DE DOPAGE DE MATRICES REELLES.....	27
5.1 Conditions expérimentales	27
5.2 Résultats et interprétations.....	27
5.2.1 Rendements.....	27
5.2.2 Effets de matrice sur les résultats	31
6. CONCLUSION	35
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37
8. LISTE DES ANNEXES	39

RESUME

L'étude prospective de recherche de substances émergentes dans les eaux, menée en 2012 a souligné le caractère ubiquiste de nombreux phtalates dans les milieux aquatiques nationaux. Suite à ces résultats, l'arrêté « surveillance » du 7 Août 2015 comprend de nombreux phtalates. Pour la matrice eau, cela inclut ainsi les di-isobutyl phtalate, di-n-butyl phtalate, di-éthyl phtalate, butyl benzyl phtalate, di-méthyl phtalate.

L'analyse des phtalates dans les eaux reste cependant délicate. En effet, la contamination des échantillons durant l'analyse demeure difficile à maîtriser ; ceci ayant pour conséquence une augmentation significative des limites de quantification et le risque d'introduire des faux positifs.

Une piste d'amélioration consiste à simplifier l'étape d'extraction et de traitement de l'échantillon avant analyse. Lors de l'étude prospective de 2012, une méthode utilisant la Micro Extraction sur Phase Solide (SPME) pour le dosage de certains phtalates dans la phase dissoute des eaux avait été utilisée. Cette méthode avait été développée et validée selon des critères propres au laboratoire pour permettre d'atteindre de très bonnes performances (LQ-20/30 ng/L pour les eaux de surface).

La présente étude visait à repartir de cette méthode afin de pouvoir l'appliquer dans un contexte de surveillance réglementaire. Cela implique notamment la validation de cette méthode suivant le référentiel français utilisé en accréditation et pour l'agrément des laboratoires : la norme NF T90-210.

Des modifications de la méthode initiale notamment l'utilisation d'étalonnage interne ont été jugées nécessaires pour se rapprocher des pratiques habituelles des laboratoires prestataires.

Si la méthode a permis de produire de bons résultats pour certains phtalates (DMP, DPpP, DPpP, BBzP, DCHP) pour lesquels, en eau de source, des seuils de 6 ng/L environ avec des rendements d'extraction entre 75% et 120% sont obtenus, l'analyse des DEP, DiBP, DBP et DEHP demeure extrêmement problématique. En effet, l'ubiquité de ces substances notamment dans les atmosphères de laboratoires a entraîné des contaminations sévères des échantillons malgré les précautions de conditionnement prises à l'égard du matériel utilisé qui n'ont pas permis de mener à bien une validation NF T90-210.

Par ailleurs, cette étude a mis en évidence des effets de matrices caractérisés par des réponses différentes en fonction de la nature de l'eau testée démontrant la nécessité d'utiliser des étalons internes spécifiques.

Enfin, ce travail a démontré la difficulté de l'analyse des phtalates ubiquistes, DEP, DiBP, DBP et DEHP. De nombreuses incertitudes demeurent sur la fiabilité des données produites dans le cadre de la surveillance régulière. Dans cette optique et dans un contexte général, pour tous les composés ubiquistes pouvant engendrer des problèmes de blancs, des pratiques plus strictes concernant la gestion des blancs devraient être mises en œuvre. Ainsi, les exigences sur la fréquence des blancs, de prélèvement et au laboratoire, et sur les performances à atteindre sur le contrôle des niveaux de blancs devraient être renforcées. Des réflexions sur des méthodologies alternatives devraient être également menées afin de pouvoir atteindre des niveaux de performances satisfaisants.

Mots clés (thématique et géographique) :

Phtalates, SPME, GC/MS, contamination, effet de matrices

PRÉAMBULE

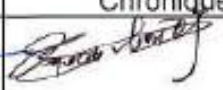
Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

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	Jérôme Beaumont François Lestremau	O. Aguerre-Chariol	N. Alsac
Qualité	Unité « Innovation pour la mesure » Direction des Risques Chroniques	Responsable de l'Unité « Innovation pour la mesure » Direction des Risques Chroniques	Responsable du Pôle « Caractérisation de l'Environnement » Direction des Risques Chroniques
Visa			P-U 

1. GLOSSAIRE

GC	Chromatographie en phase gazeuse
LQ	Limite de quantification
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse
PTV	Injecteur à programmation de température
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Extraction sur Phase Solide
SPME	Micro Extraction sur Phase Solide
TIC	Courant d'ions total
u.a.	Unité arbitraire

2. INTRODUCTION

En raison de son caractère toxique, le di-(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP) a été inclus dans la liste initiale de la Directive Cadre Eau des substances à surveiller en priorité dans les milieux aquatiques (norme de qualité environnementale = 1,3 µg/L). L'étude prospective menée en 2012 a démontré le caractère ubiquiste d'autres phtalates dans les milieux aquatiques nationaux. Derrière les parabènes, ils font partie des polluants les plus retrouvés. Le diisobutyl-, le diéthyl-, le n-butyl phtalate ont été ainsi quantifiés dans plus de 50% des échantillons d'eau.

Suite à ces résultats, l'arrêté « surveillance » du 7 Août 2015 a ainsi inclus de nombreux phtalates [1]. Pour la matrice eau, cela comprend les :

Tableau 1 : Liste des phtalates et limites de quantification exigées dans l'arrêté « surveillance » du 7/8/2015 (les LQ A correspondent à une application au premier cycle de surveillance et les LQ B à une application en 2019)

	Acronyme	Code Sandre	LQ A µg/L	LQ B µg/L
Di-isobutyl phtalate	DiBP	5325	0,4	
Di-n-butyl phtalate	DBP	1462	0,4	0,05
Di-éthyl phtalate	DEP	1527		0,05
Butyl benzyl phtalate	BBzP	1924	0,4	0,05
Di-méthyl phtalate	DMP	1489	0,4	

Dans les sédiments, une surveillance pour les di-n-butyl phtalate, benzylbutyl phtalate, di-isobutyl phtalate, di-isononyl phtalate, di-isodécyl phtalate est également demandée.

L'analyse des phtalates dans les eaux reste cependant délicate. En effet, la contamination des échantillons durant le prélèvement et l'analyse demeure difficile à maîtriser ; ceci ayant pour conséquence une augmentation significative des limites de quantification et le risque d'introduire des faux positifs.

La méthode de dosage des phtalates dans les eaux par extraction sur phase solide (SPE) et analyse par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC/MS), tirée de la norme NF EN ISO 18856 de 2005 [1], ne permet pas de s'affranchir des problèmes de blanc (maximum autorisé pour les blancs : 80 ng/L). Malgré la mise en œuvre systématique de la calcination de la verrerie, du traitement des solvants par de l'alumine basique, de la vérification du système analytique, les niveaux de blancs sont élevés et variables pour certains phtalates.

Une piste d'amélioration consiste à simplifier le nombre d'étapes lors de la préparation d'échantillon. La Micro Extraction sur Phase Solide (SPME) présente l'avantage de diminuer la manipulation de l'échantillon, d'éliminer la présence de solvants sources de pollution, tout en conservant la préconcentration sur phase solide nécessaire pour atteindre des LQ basses.

Lors de l'étude prospective de 2012 [2], le laboratoire universitaire de Bordeaux (EPOC-LPTC) avait mis en œuvre une telle méthode pour le dosage de certains phtalates (butyl benzyl phtalate, di-éthyl phtalate, di-isobutyl phtalate, di-n-butyl phtalate) dans la fraction dissoute des eaux. Cette méthode avait été développée et validée selon des critères propres au laboratoire pour permettre d'atteindre de très bonnes performances (LQ~20/30 ng/L pour les eaux de surface). L'étalonnage est effectué avec des étalons analogues deutérés.

La quantification est ensuite mise en œuvre par étalonnage externe. Les étalons deutérés ne sont cependant pas rajoutés à l'échantillon car des travaux du LPTC ont montré que, pour le DEHP, les étalons deutérés pouvaient amener une contamination en phtalates non marqués lors de l'analyse [3].

Cette méthode est ainsi parfaitement adaptée pour la mesure des phtalates à des niveaux extrêmement bas.

Afin d'harmoniser les critères de détermination de performances entre différents opérateurs, les méthodes utilisées pour la surveillance réglementaire doivent être validées selon la norme NF T 90-210. Cette norme définit notamment les exigences en termes de détermination de la limite de quantification ou d'exactitude. De plus, des incertitudes associées aux mesures obtenues pour cette validation doivent être également déterminées selon les référentiels en cours (ISO 11352). Les méthodes utilisées lors de l'étude prospective ne mettaient pas en œuvre ce type de validation. Ainsi, afin de pouvoir effectuer un transfert de ces méthodes vers les laboratoires prestataires, des évaluations et éventuellement modifications de méthodes doivent être effectuées par AQUAREF.

Cette présente étude visait ainsi à se baser sur la méthode utilisée pour l'étude prospective pour effectuer la mesure des phtalates dans la fraction dissoute des eaux selon une validation de type NF T90-210.

Afin de se rapprocher des pratiques habituelles des laboratoires prestataires, des modifications de la méthode initiale ont été jugées nécessaires. Ainsi, les étalonnages ont été effectués avec des composés « parents ». L'utilisation d'étalons internes lors de l'analyse a également été évaluée comme cela est recommandé par la norme en préparation « multiclasse » XP T 90-214 [6]. Le niveau de contamination à chaque étape du processus analytique a également été évalué.

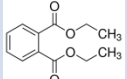
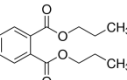
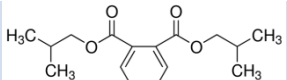
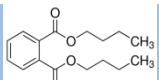
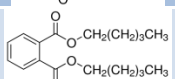
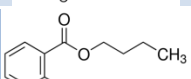
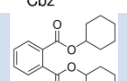
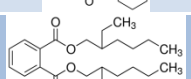
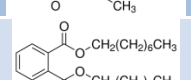
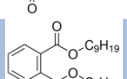
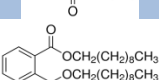
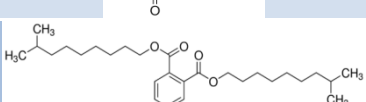
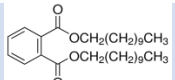
Les composés visés par l'étude étaient principalement ceux définis pour une surveillance réglementaire : DEHP, DEP, DBP, DiBP, BBzP et DMP. D'autres phtalates, inclus dans la norme NF EN ISO 18856, ont également été considérés. A la méthode provenant de l'étude prospective, trois autres congénères que sont le di-pentyl phtalate, le di-isononyl phtalate et le di-isodécyl phtalate, dont la surveillance réglementaire est prévue dans les sédiments, ont été également ajoutés afin d'évaluer la faisabilité de cette technique pour leur analyse. Le travail sur ces substances permet ainsi de renforcer les connaissances sur leur analyse et notamment les difficultés potentielles, notamment chromatographiques.

N.B. Il doit être précisé que lors de la mise en œuvre technique de cette étude, la décision d'effectuer la surveillance régulière sur la fraction dissoute ou brute n'avait pas complètement été décidée (la fraction brute a été sélectionnée depuis à travers l'arrêté surveillance du 07 Aout 2015). Ainsi, la méthode utilisée lors de l'étude prospective a été reprise et le travail de cette étude s'est focalisé uniquement sur la fraction dissoute.

3. COMPOSES ETUDIES

Les composés visés par l'étude sont ainsi décrits dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Liste des composés visés.

NOM	Abréviation	Code sandre	N° CAS	Masse Moléculaire (g/mol)	Log K _{ow} *	Formule
Di-méthyl phtalate	DMP	1489	131-11-3	194,18	1,60	
Di-éthyl phtalate	DEP	1527	84-66-2	222,24	2,42	
Di-n-propyl phtalate	DPrP	2541	131-16-8	250,29	3,27	
Di-iso-butyl phtalate	DiBP	5325	84-69-5	278,34	4,11	
Di-n-butyl phtalate (ou n-butyl phtalate)	DBP	1462	84-74-2	278,34	4,50	
Di-n-pentyl phtalate	DnPeP	2540	131-18-0	306,4	5,62	
Benzyl butyl phtalate	BBzP	1924	85-68-7	312,36	4,73	
Di-cyclohexyl phtalate	DCHP	-	84-61-7	330,42	6,20	
Di-(2-éthylhexyl)phtalate	DEHP	6616	117-81-7	390,56	7,60	
Di-n-octyl phtalate	DOP	3342	117-84-0	390,56	8,10	
Di-isononyl phtalate	DiNP	6215	28553-12-0	418,61	9,37	
Di-décyl phtalate	DDcP	-	84-77-5	446,66	9,05	
Di-isodecyl phtalate	DiDcP	6658	26761-40-0	446,66	10,36	
Di-undécyl phtalate	DUP	-	3648-20-2	474,72	11,49	

* Obtenus d'après le logiciel EPI suite (valeurs expérimentales considérées puis valeurs calculées d'après modèles si valeurs expérimentales non disponibles)

Pour chaque phtalate, un homologue deutéré est utilisé comme étalon interne. Seul le di-undécyl phtalate ne possède pas d'homologue marqué et est dosé par rapport au di-décyl phtalate-d4, dont il est stéréochimiquement très proche.

Tableau 3 : Liste des étalons internes deutérés.

Composé	Abréviation	N° CAS
Di-méthyl phtalate-d4	DMP-d4	93951-89-4
Di-éthyl phtalate-d4	DEP-d4	93952-12-6
Di-n-propyl phtalate-d4	DPrP-d4	358731-29-0
Di-iso-butyl phtalate-d4	DiBP-d4	358730-88-8
Di-n-butyl phtalate-d4	DBP-d4	93952-11-5
Di-n-pentyl phtalate-d4	DnPeP-d4	358730-89-9
Benzyl butyl phtalate-d4	BBzP-d4	93951-88-3
Di-cyclohexyl phtalate-d4	DCHP-d4	358731-25-6
Bis(2-éthylhexyl)phtalate-d4	DEHP-d4	93951-87-2
Di-n-octyl phtalate-d4	DOP-d4	93952-13-7
Di-isononyl phtalate-d4	DiNP-d4	1332965-90-8
Di-isodecyl phtalate-d4	DiDcP-d4	1346604-79-2
Di-décyl phtalate-d4	DDcP-d4	1276197-18-2

4. DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE

4.1 MATERIEL UTILISE ET CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Le matériel retenu pour l'analyse est un couplage chromatographie en phase gazeuse/spectromètre de masse en mode d'ionisation par impact électronique (GC/MS/EI) provenant d'Agilent®. Les conditions d'injection, liner notamment, ont été adaptées pour des analyses par SPME.

Le protocole d'analyse reprend les conditions utilisées par le LPTC lors de l'étude prospective. Il implique ainsi l'extraction avec une fibre SPME 65 µm PDMS/DVB.

Le détail des paramètres d'extraction par SPME, d'injection, chromatographiques et spectrométriques est fourni en Annexe 1.

4.2 CHOIX DE LA COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE

Le DiNP et le DiDcP sont des mélanges complexes de phtalate de dialkyles, majoritairement des alkyles en C9 ramifiés pour le DiNP et des alkyles en C10 ramifiés pour le DiDcP.

De ce fait, le chromatogramme de ces composés par GC/MS se présente sous la forme de massif de pics. Ces 2 groupes de composés de structure moléculairement proches, éluent dans des fenêtres chromatographiques voisines rendant leur séparation difficile (Figure 1).

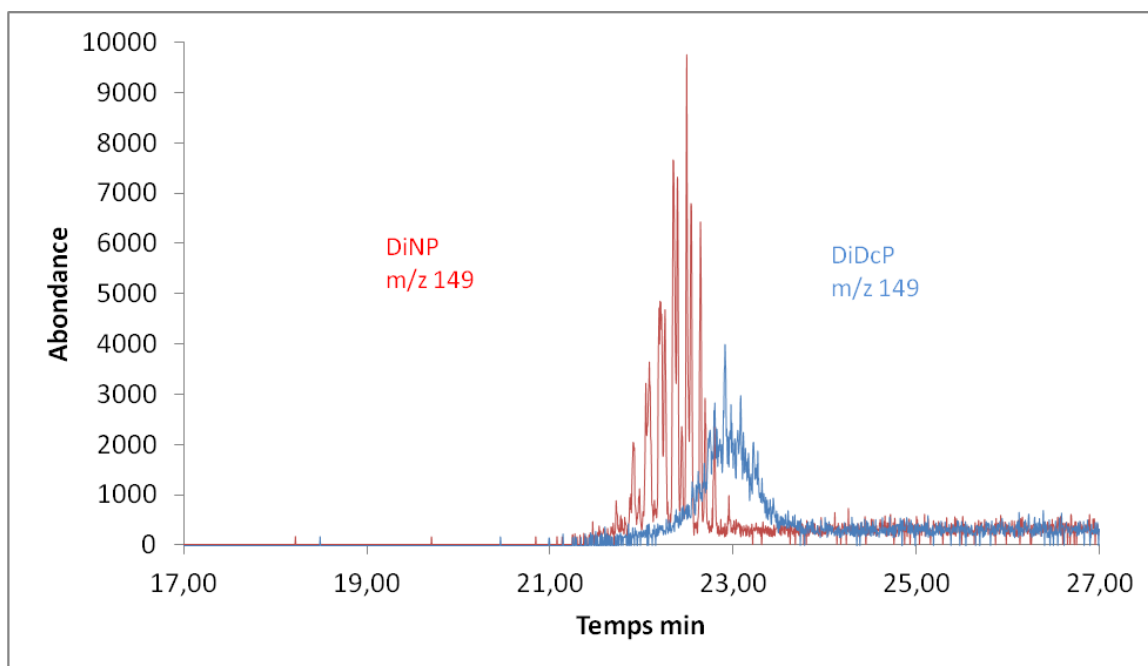


Figure 1 : Chromatogrammes superposés du DiNP et du DiDcP – Acquisition Fullscan, extraction ion 149

Afin d'optimiser la séparation de ces coupes, plusieurs types de colonne de polarités différentes ont été testées en injection liquide. Elles sont listées ci-dessous.

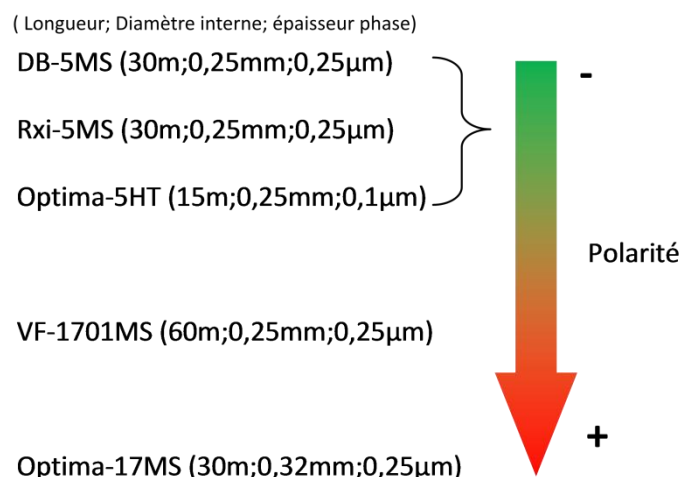


Figure 2 : Colonnes chromatographiques testées classées selon ordre de polarité

Aucune amélioration n'a été apportée à la séparation des 2 coupes en modifiant la polarité de colonne.

Finalement, le choix de la colonne DB-5MS UI s'est imposé. Cette colonne ultra inerte présente l'avantage d'avoir un faible dégreffage de la phase (bleeding) à haute température impliquant qu'un bruit de fond moins important au niveau du temps de rétention des 2 coupes.

La masse m/z 149 est le plus sensible pour ces 2 composés. Afin de s'affranchir du problème de séparation, le choix a été fait de travailler non pas sur la masse m/z 149 mais sur les masses m/z 293 (DiNP), m/z 307 (DiDcP) plus spécifiques de chaque composé. Le désavantage réside dans la sensibilité 10 fois inférieure par rapport à l'ion m/z 149.

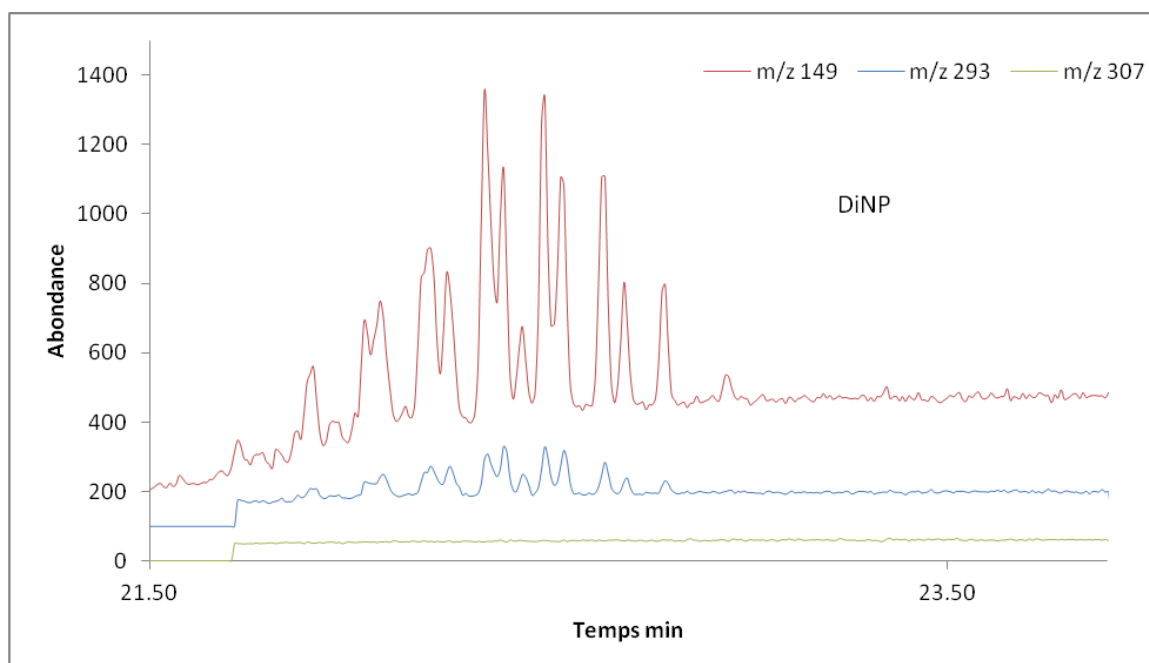


Figure 3 : DiNP à 1 µg/mL. Superposition des chromatogrammes avec sélections des ions m/z 149 (masse commune des 2 composés, en rouge), 293 (en bleu, spécifique au DiNP), 307(en vert, spécifique au DiDcP)

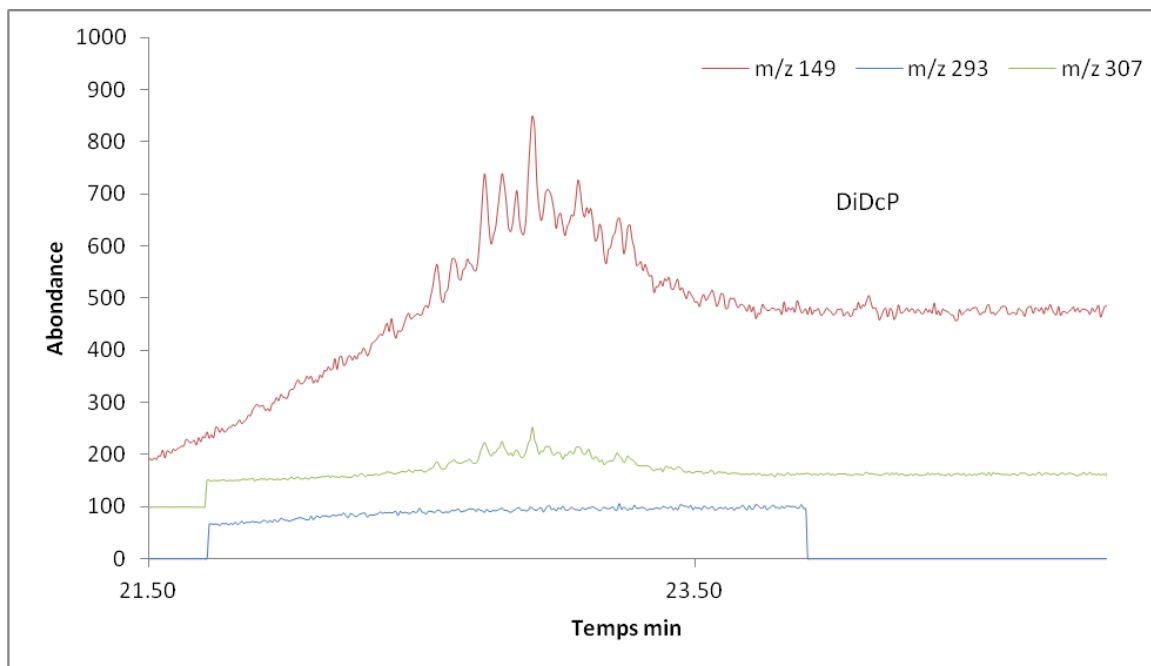


Figure 4 : DiDcP à 1µg/mL. Superposition des chromatogrammes avec sélections des ions m/z 149 (masse commune des 2 composés, en rouge), 293 en bleu, spécifique au DiNP), 307(en vert, spécifique au DiDcP)

La Figure 5 représente une superposition des traces des ions m/z 293 et 307 pour les 2 coupes. L'absence de pic pour la masse m/z 307 au niveau du DiNP (Figure 3) ainsi que celle pour la masse m/z 293 au niveau du DiDcP (Figure 4) est observée, ce qui permet de distinguer les 2 massifs.

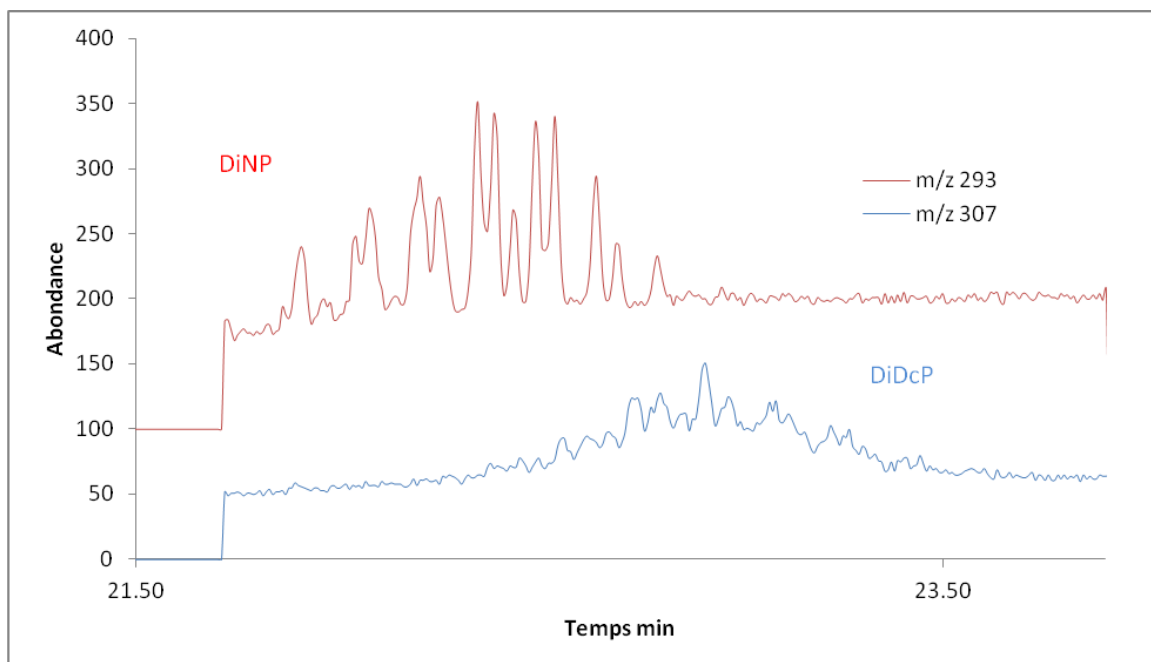


Figure 5 : Analyse du DiNP et du DiDcP dans un mélange à 1 µg/mL

4.3 TRAITEMENT D'ÉCHANTILLON PAR SPME

4.3.1 TRAITEMENT DU MATÉRIEL UTILISÉ

Les travaux antérieurs effectués à l'INERIS dans la mesure des phtalates ont permis de dégager certaines pratiques qui permettraient de réduire le taux de contamination lors de l'analyse [5]. Afin de s'assurer que le matériel utilisé lors des manipulations n'est pas source de pollution, plusieurs précautions ont été systématiquement mises en place.

Tout d'abord, toute la verrerie a été calcinée pendant 8h à 500°C et ensuite emballée avant utilisation dans du papier aluminium également calciné. Cela comprend les :

- Flacons d'un litre contenant les matrices,
- Flacons contenant les préparations des solutions étalons,
- Flacons de 20 mL servant à l'extraction par SPME,
- Pipettes jetables de 10 mL pour le transfert des matrices dans les flacons SPME,
- Dispositif de filtration sous vide.

Les solvants utilisés (méthanol et acétone) ont tous été traités avec de l'alumine basique comme cela est recommandé dans la publication de Fankhauser-Noti et Grob [4]. L'ajout d'alumine basique aux solvants permet de piéger les phtalates qui sont éventuellement contenus dans les solvants [4].

Tous les bouchons étaient passés aux ultrasons dans un bain de méthanol traité et conservés dans du papier d'aluminium.

Les micro-seringues utilisées pour réaliser les dopages étaient rincées plusieurs fois avec les solvants traités.

Les filtres en microfibre de verre sans liant (GF/C) utilisés pour filtrer les matrices étaient rincés à l'eau milliQ et calcinés à 200°C (ces filtres ne pouvaient pas être traités à 500°C car ils auraient été endommagés à de tels niveaux de température).

4.3.2 BLANC SYSTEME

L'état du système analytique a été dans un premier temps vérifié. En effet, les phtalates présents dans l'atmosphère du laboratoire (DEHP, DiBP, DBP, DEP notamment) peuvent se déposer sur les différentes parties du système analytique et constituer une source de contamination significative lors de l'analyse [5].

Ainsi, afin de purger le système analytique des phtalates résiduels se déposant lorsque celui-ci n'est pas utilisé, il a été conditionné avant de démarrer l'étude. Cela a consisté à couper 20 cm de la colonne chromatographique côté injecteur, à installer un liner neuf, à effectuer un « bake out » de l'injecteur à 350°C en mode split 50 :1 pendant 30 min.

Afin de réaliser des blancs « système » de façon automatique, la méthode a été modifiée.

En utilisant le passeur d'échantillon SPME, il n'est pas possible de simuler une injection sans la présence d'une fibre sur le portoir. Ainsi pour palier à ce problème, une fibre sans phase a été installée sur le portoir.

Un blanc système est désigné par une brève injection (temps de résidence dans l'injecteur <1 s) d'une fibre sans phase ayant été exposée un très court instant (<1 s) dans un flacon vide sur le portoir et non dans l'incubateur.

Le chromatogramme de la figure 6 montre la comparaison de l'état du système après avoir conditionné l'appareil et effectué 5 blancs du système chromatographique consécutifs. La trace bleue représente l'extraction des ions m/z 163+149 de la 1^{ère} injection (ions représentant la majorité des phtalates) et la trace rouge celle de la 5^{ème}.

La présence des 4 phtalates (DEP, DiBP, DBP, DEHP) souvent retrouvés lors des pollutions du système est ainsi constatée.

Après 5 injections, la pollution du système est stable. Le pic du DEHP n'est plus détecté, le niveau du DiBP (1000 u.a. (unité arbitraire)) et du DBP (500 u.a.) a fortement diminué (de plus de 95%). Seul reste le DEP à un niveau supérieur (21000 u.a.). Cependant, globalement, les surfaces retrouvées pour ces phtalates sont relativement basses et acceptables.

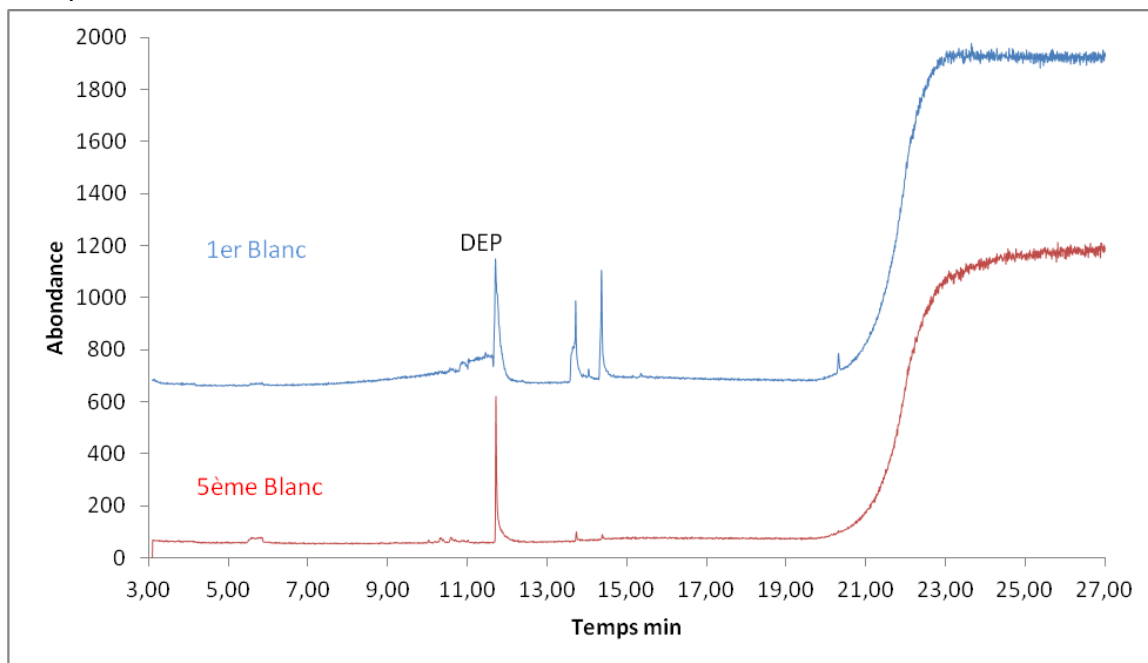


Figure 6 : 1^{er} blanc système vs 5^{ème} blanc système (sélection des ions m/z 149+163)

4.3.3 BLANC FIBRE SPME 65 μ M PDMS/DVB

La fibre SPME 65 μ m PDMS/DVB a été utilisée pour ces analyses suivant le choix du LPTC pour ses travaux. Avant toute utilisation, un conditionnement initial de la fibre est nécessaire. Le fournisseur prévoit un conditionnement thermique de 30 min à 250°C.

Afin d'optimiser cette étape, la fibre neuve a été placée 30 min en immersion statique dans du méthanol. Ensuite elle a été conditionnée à 270°C (température maximale supportée par le greffage) pendant 1h dans le port d'injection alternatif en mode split à 50:1 (afin de conditionner les fibres et ne pas mobiliser le système analytique durant cette étape, un deuxième injecteur (alternatif), de modèle split/splitless a été ici utilisé).

A l'issue de ce conditionnement manuel, dix blancs de fibre successifs ont été réalisés. Les paramètres du passeur d'échantillon ont été modifiés de sorte que la fibre subissait un « bake out » de 30 min dans l'injecteur alternatif à 270°C en mode split à 2:1, avant d'être exposée dans un flacon vide sur le portoir pendant un court instant (<1 s) afin de simuler une injection « à blanc ». Ensuite la fibre a été désorbée dans le PTV (injecteur à programmation de température) du système chromatographique pendant 6 min à 270°C en mode « pulsed splitless » selon le protocole analytique choisi.

La Figure 7 montre la superposition de l'extraction des ions m/z 163 et 149 du 1^{er} blanc de fibre (rouge), du 10^{ème} blanc de fibre (bleu) et du blanc système (vert). Au bout de 10 désorptions, le blanc de fibre est stabilisé mais les 4 phtalates sont encore présents dans des proportions plus importantes que dans le blanc système. Cette analyse révèle également la présence persistante de nombreuses autres substances après cette phase de conditionnement.

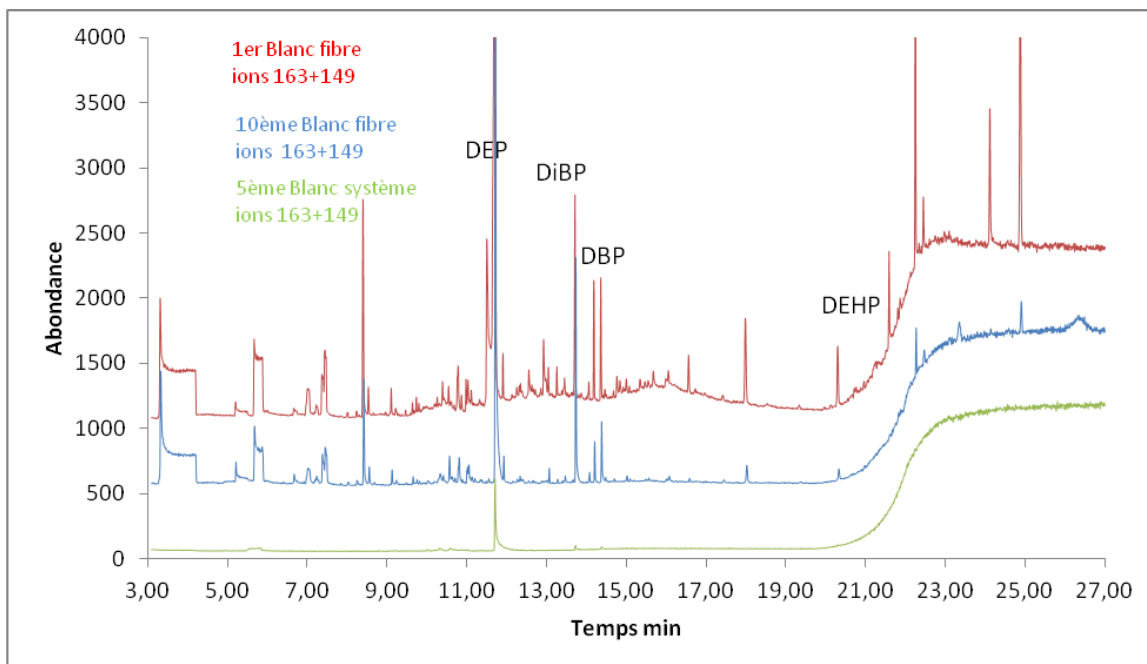


Figure 7 : 1^{er} blanc fibre vs 10^{ème} blanc fibre vs 5^{ème} blanc système (détection des ions m/z 149+163)

Les niveaux de DEP, DiBP, DBP, et de DEHP s'élèvent respectivement à 130 000, 24 000, 6 200 et 1 800 u.a au 10^{ème} blanc.

La fibre semble ainsi être une source de pollution plus importante en comparaison des niveaux de pollution retrouvés dans le blanc de système. Des résidus de phtalates avaient également été constatés sur la fibre SPME par le LPTC (figure 2 de [3] avec un niveau légèrement supérieur en DEHP dans ces travaux).

4.3.4 TEST DE DIFFERENTES MATRICES

Après avoir vérifié le niveau de contamination amené par les fibres SPME, des tests ont été effectués afin d'estimer la contamination obtenue lors de l'application du protocole analytique incluant l'extraction d'une eau non dopée.

EAU D'EVIAN®

L'eau d'Evian® contenue dans une bouteille est souvent employée comme échantillon représentatif d'une eau naturelle. Elle présente l'avantage d'être une matrice relativement simple et dans le cadre de l'analyse des phtalates, est considérée comme exempte de ces composés (des travaux du LPTC n'ont pas déterminé de contamination de l'eau d'Evian® [3]). Ainsi, pour cette étude dans un souci de simplification compte tenu des grandes difficultés liées à la contamination, elle a été utilisée pour effectuer des tests préliminaires afin d'évaluer le protocole analytique mis en œuvre par notre laboratoire. Le blanc de matrice a d'abord été réalisé en plongeant en immersion le greffage de la fibre dans 15 mL d'eau Evian filtrée sans ajout d'étalons internes, dans l'incubateur sous agitation à 65°C, pendant 30 min (reprenant les conditions d'extraction optimisés par le LPTC).

L'analyse de l'eau d'Evian® filtrée montre un niveau de pollution relativement important en phtalates. Afin de vérifier l'impact de la filtration, l'eau non filtrée a été analysée. La comparaison des 2 analyses est exposée en figure 8.

Peu de différence entre les 2 résultats analytiques a été observé ce qui démontre que la filtration a peu d'impact sur l'apport de contamination en phtalates.

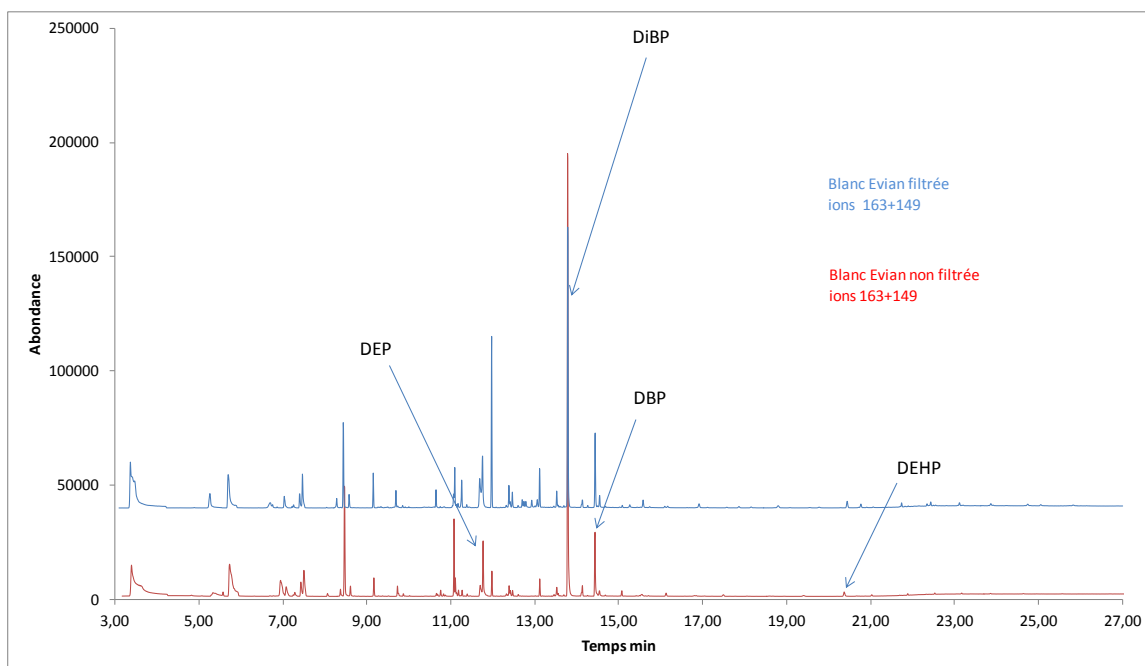


Figure 8 : Blanc de l'eau d'Evian® filtrée vs blanc de l'eau d'Evian® non filtrée

NB : la détection des ions 163+149 (le signal de l'eau filtrée (en bleu) démarre à un niveau 0 d'abondance. Elle a été décalée pour permettre une meilleure visibilité lors de la comparaison des spectres.

Le chromatogramme de l'eau d'Evian® non filtrée est comparé avec celui obtenu pour le blanc de fibre (Figure 9). De nombreux phtalates sont observés lors de cette analyse. En se focalisant sur l'ion 149 représentatif des phtalates, la présence des 4 composés déjà retrouvés dans le blanc de fibre est observée auxquels s'ajoute le DOP.

Les niveaux de DEP, DiBP, DBP, DEHP et de DOP sont bien supérieurs à ceux observés dans le blanc de fibre (de 4 à 60 fois plus) et s'élèvent respectivement à 600 000, 1 500 000, 134 000, 43 000, et 15 000 u.a.

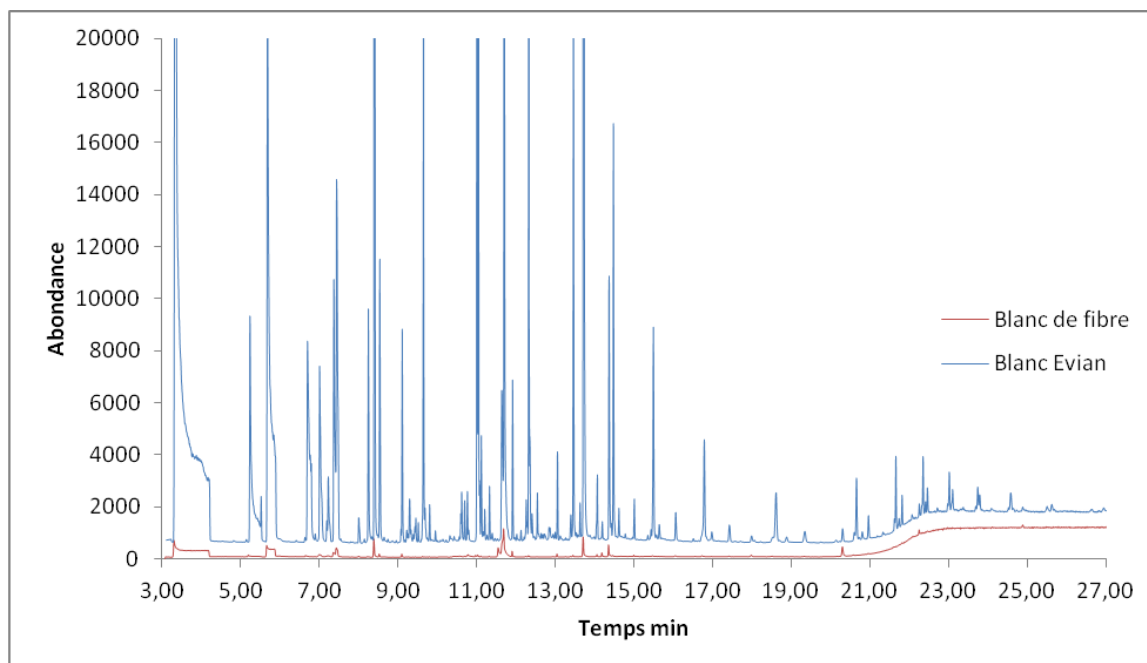


Figure 9 : Blanc fibre vs analyse avec de l'eau d'Evian® (détection des ions m/z 163+149)

Les injections répétées en eau d'Evian® ont également mis en évidence une baisse d'adsorption de la fibre. La fibre s'est recouverte d'un dépôt blanc l'empêchant progressivement d'adsorber les composés (Figure 10). La nature de ce dépôt n'a pas été exactement déterminée mais il est plausible que ce soit les sels minéraux contenus dans l'eau d'Evian® qui auraient cristallisé à la surface de la fibre au fur et à mesure des cycles d'extraction et de désorption.

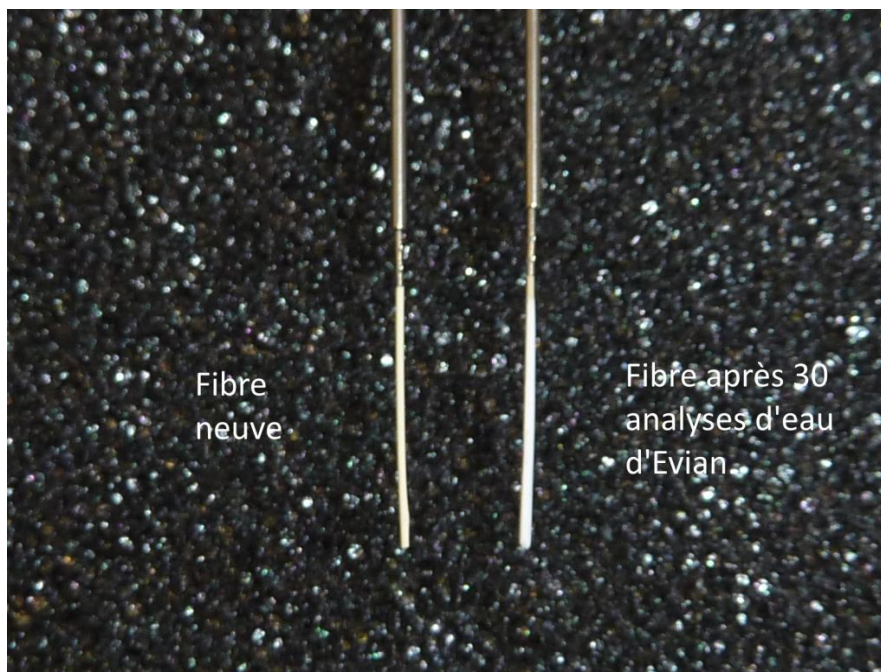


Figure 10 : Dépôt de sels minéraux sur la fibre SPME

Pour pallier à ce phénomène, une étape supplémentaire a été ajoutée. Après l'exposition de la fibre, cette dernière est rincée 1 min dans l'eau MilliQ avant la désorption thermique dans l'injecteur.

EAU MILLIQ

Les tests avec l'eau d'Evian ayant montré une pollution en phtalates, l'eau MilliQ disponible au laboratoire a été testée.

Afin de limiter les pollutions, l'eau est prélevée dans des flacons en verre calcinés après avoir laissé couler l'eau du distributeur pendant 2 min. Puis, l'eau est filtrée sur un filtre en microfibre de verre sans liant calciné.

L'analyse de cette eau montre le même profil que l'eau d'Evian® filtrée avec la présence de DEP, DiBP, DBP, DEHP et de DOP. Cependant les niveaux sont moins élevés notamment pour le DiBP pour lequel une surface de 250 000 u.a. est observée contre 1 500 000 u.a. dans l'eau d'Evian.

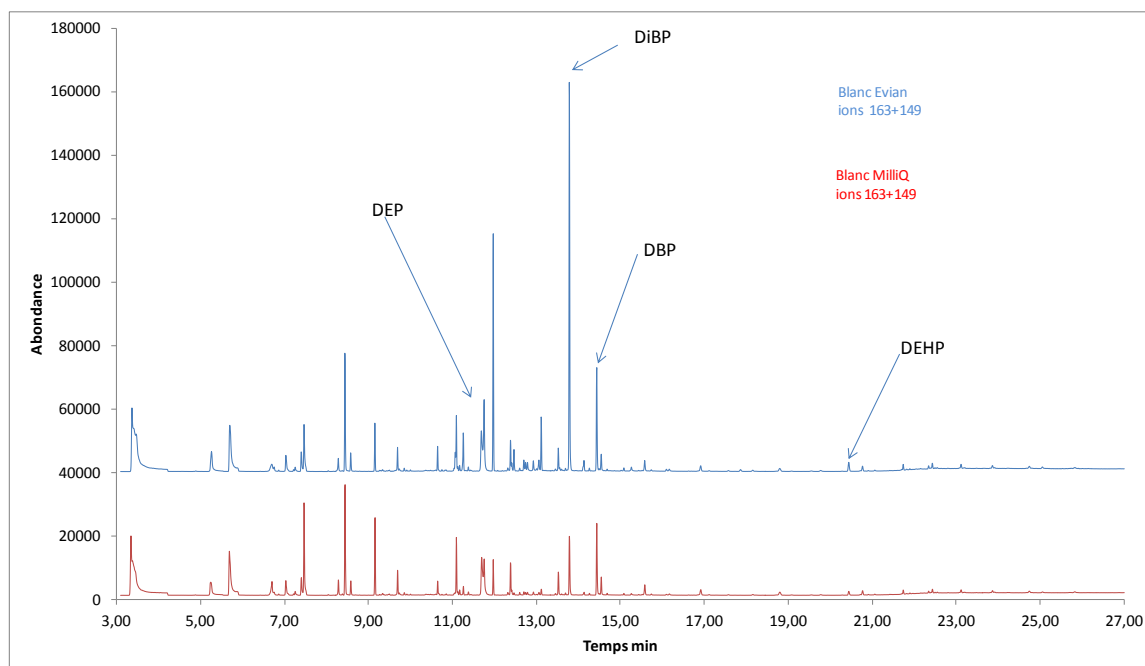


Figure 11 : Blanc de l'eau MilliQ vs blanc de l'eau d'Evian® (détection des ions m/z 163+149)

La pollution ayant été réduite en passant d'une eau d'Evian® à une eau MilliQ, il a été suspecté une pollution de l'eau. Ainsi, plusieurs tentatives de « nettoyage » de la matrice eau MilliQ ont été testées afin de diminuer la pollution de la matrice.

Le 1^{er} test a consisté en un ajout dispersif de charbon actif dans l'eau MilliQ avec mise en contact sous agitation magnétique pendant 1 nuit. L'eau filtrée sur filtre en fibre de verre a ensuite été analysée.

Le 2^{ème} test a consisté à filtrer de l'eau sur 3 cartouches SPE contenant différents types de phases. Les 3 cartouches testées étaient respectivement composées de C18, d'un mélange Envicarb II/PSA, de Carboxprep.

Cependant, ces tests n'ont pas fourni de données probantes car aucune diminution du niveau des blancs n'a été constatée. Ainsi, on peut s'interroger, après les différents tests pour « purifier » l'eau des phtalates, de savoir si la contamination provient réellement de l'eau. Dans l'étude sur les eaux de boisson par le LPTC, le DEHP n'avait pas été retrouvé dans de l'eau d'Evian®. Malgré les nombreuses précautions qui ont été mises en œuvre, il semble qu'une contamination résiduelle provenant de notre laboratoire pourrait être l'une des causes des niveaux de phtalates observés dans l'eau d'Evian® et l'eau MilliQ et non des eaux elles-mêmes.

4.3.5 FONCTIONS D'ETALONNAGE

Afin de mesurer l'impact de la contamination sur la mesure, des droites d'étalonnage ont été effectuées dans l'eau MilliQ. Des concentrations de 6 à 600 ng/L pour la majorité des composés et de 60 à 6000 ng/L pour les composés les plus lourds ont été évaluées. Les étalons internes ont également été ajoutés à une concentration de 333 ng/mL chacun.

Pour mieux comprendre la variabilité en fonction du temps et se basant sur la procédure adoptée lors des validations de méthode par NF T90-210, 6 courbes d'étalonnage ont été établies dans ces conditions sur 6 jours différents. Une fibre neuve, conditionnée 10 fois, a été utilisée pour chaque courbe d'étalonnage (chaque jour).

Les droites d'étalonnage ont été tracées avec correction des étalons internes. Ainsi, les aires obtenues pour les composés d'intérêt ont été divisées par les aires obtenues pour les étalons internes. Ce ratio est établi en fonction du ratio des concentrations utilisées pour les composés d'intérêt par celui des concentrations ajoutées pour les étalons internes. L'étalonnage interne est une pratique utilisée et recommandée afin de prendre en compte les variations pouvant intervenir lors de l'extraction et/ou de l'analyse [6].

L'étude des fonctions d'étalonnage des différents composés laisse apparaître trois populations distinctes.

Une première population, regroupe les composés pour lesquels les fonctions d'étalonnage sont linéaires et sans variations anormales au cours des 6 séries analytiques (Figure 12). On y retrouve le DMP, le DPrP, le DPeP, le BBzP et le DCHP. Ces composés ont une masse moléculaire inférieure à 330.

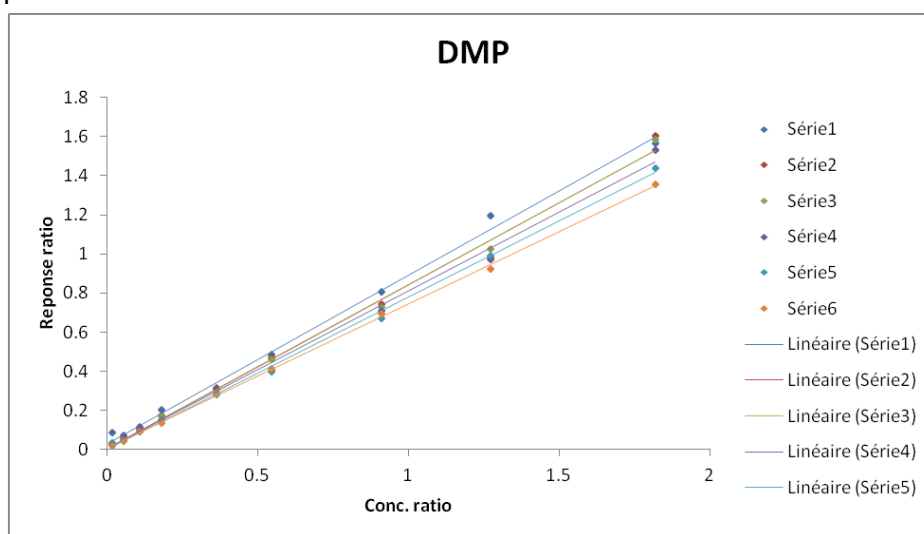


Figure 12 : Superposition des fonctions d'étalonnage des tests entre J1 et J6 - DMP.

Une deuxième population regroupe les composés les plus lourds (masse moléculaire supérieure à 390 Da) pour lesquels des variations importantes sont observées. Le DOP, le DiNP, le DiDcP, le DDcP et le DUP sont concernés. Les fonctions d'étalonnage n'ont pas une tendance linéaire sur l'ensemble du domaine. Un plateau est observé pour les hautes concentrations (à partir de 1000 ng/L). Ce phénomène pourrait être dû à une saturation des sites d'adsorption de la fibre. Par ailleurs, les points qui composent les fonctions sont beaucoup trop dispersés.

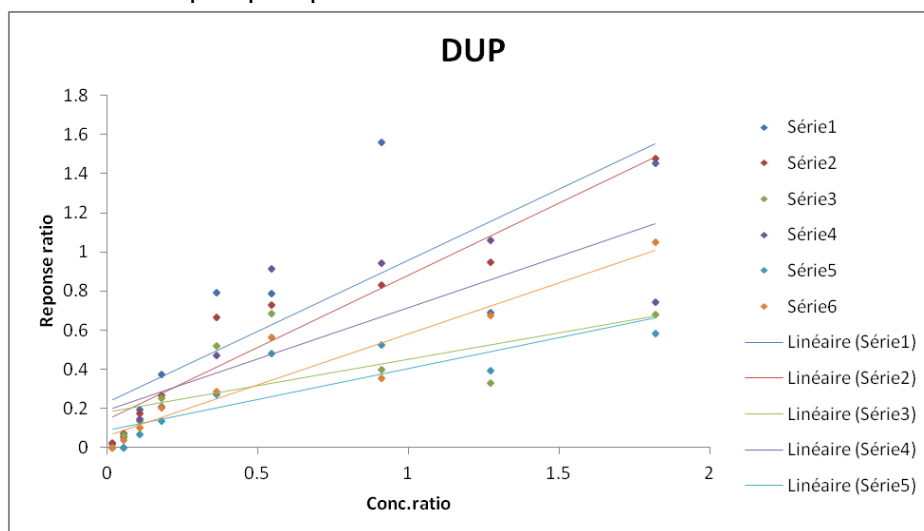


Figure 13 : Superposition des fonctions d'étalonnage des tests entre J1 et J6 - DUP.

Enfin on observe une population regroupant tous les composés pour lesquels des niveaux de contamination élevés sont retrouvés: le DEP, le DiBP, le DBP, le DEHP.

Le DEP et le DBP présentent un niveau de pollution de contamination constant au cours des séries ce qui permet d'obtenir des fonctions linéaires (Figure 14).

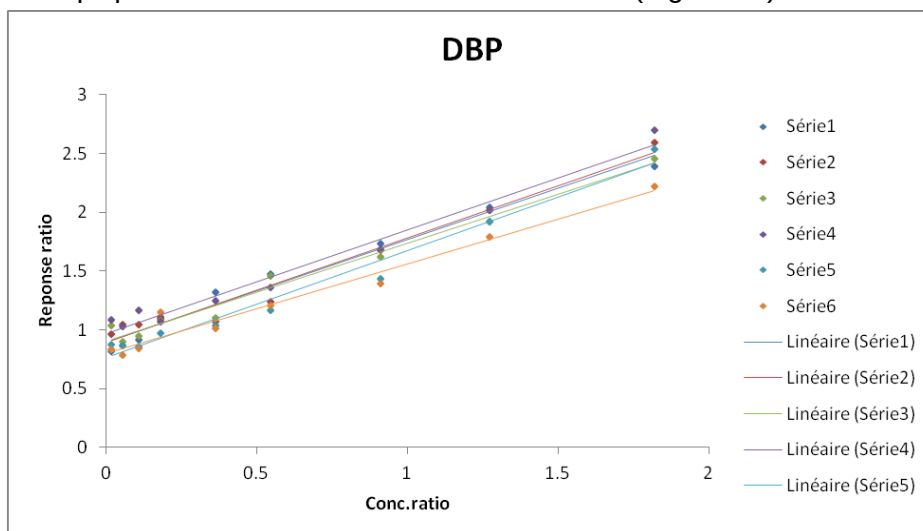


Figure 14 : Superposition des fonctions d'étalonnage des tests entre J1 et J6 - DBP.

Le niveau de pollution du DiBP et du DEHP au cours des séries est très variable et empêche d'obtenir des fonctions linéaires pour ces 2 composés (Figure 15) car les niveaux de concentration de la gamme sont trop faibles par rapport à la contamination.

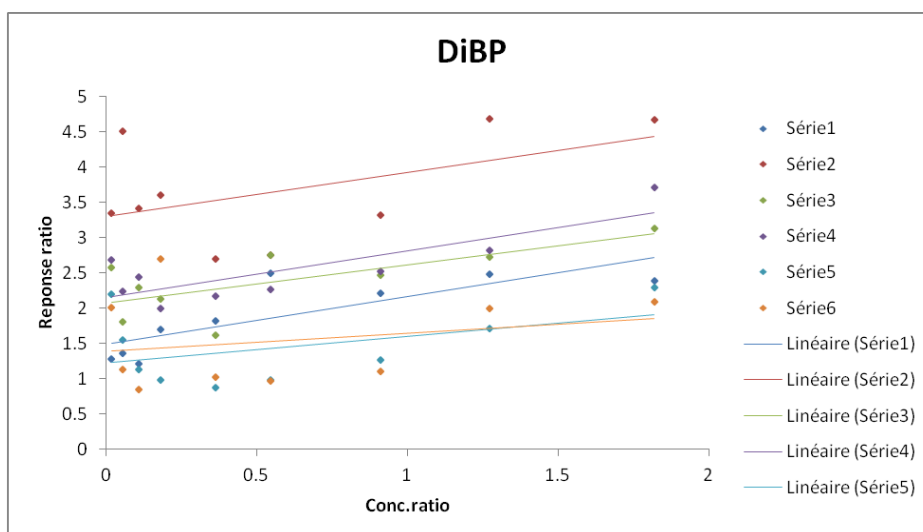


Figure 15 : Superposition des fonctions d'étalonnage des tests entre J1 et J6 – DiBP

En conclusion, concernant les substances réglementaires, des fonctions d'étalonnage correctes ont été obtenues pour le DMP et le BBzP sans problème de contamination. Pour les DEP et DBP, des taux de contamination constants (évalués à 400 ng/L pour le DBP et 200 ng/L pour le DEP) ont permis d'obtenir des droites d'étalonnages. Pour le DEHP et le DiBP, des contaminations importantes et non-constantes dans la gamme des droites d'étalonnage (6-600 ng/L) n'ont pas permis d'obtenir des droites d'étalonnage correctes. Les contaminations peuvent être estimées représenter entre 400 et 1000 ng/L pour ces composés.

L'ensemble des fonctions d'étalonnage obtenues pour chaque composé sur l'ensemble des séries est regroupée en Annexe 2.

4.3.6 SUIVI DES ETALONS INTERNES

Le LPTC a publié des travaux sur l'analyse d'eaux minérales dont une partie était consacrée aux phtalates. Cette publication indique une source potentielle de contamination pour le DEHP provenant de l'étalon interne DEHP-d4, qui avait provoqué un accroissement de la pollution [2].

Une source potentielle de problèmes observés durant l'étalonnage pourrait ainsi provenir des étalons internes. Pour vérifier cette hypothèse, la présence de phtalates non marqués dans une solution de phtalates deutérés a été recherchée.

Injection liquide d'une solution de phtalates deutérés

Les ions m/z 169 et m/z 149 caractéristiques des phtalates non marqués ont été extraits du signal d'un chromatogramme d'une injection liquide d'une solution d'un mélange des 14 étalons internes utilisés à 0,5 $\mu\text{g/mL}$ dans l'acétate d'éthyle.

La figure ci-dessous montre la trace de cette extraction de signal. La présence de phtalates non marqués est constatée.

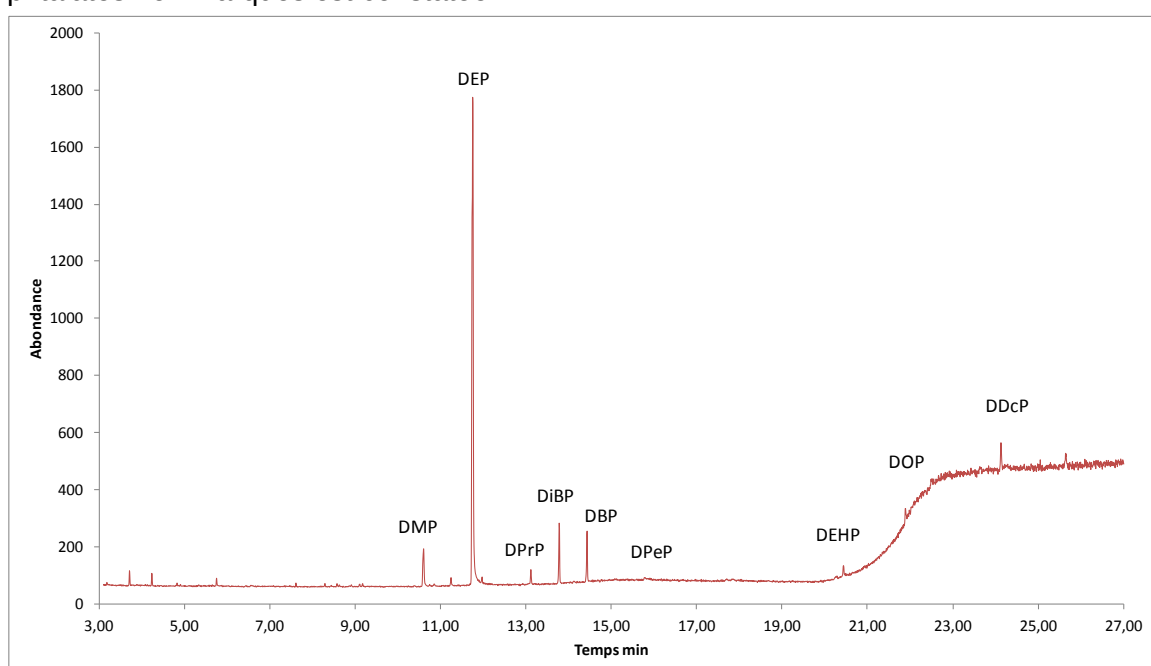


Figure 16 : Extraction des ions m/z 163+149-injection liquide d'un mélange des étalons internes à 0,5 $\mu\text{g/mL}$

Afin de déterminer la proportion de contamination provenant du système et du solvant, deux injections ont été effectuées avec du solvant seul pour constituer des points de référence (des « blancs »). La moyenne du signal des ions m/z 163 et 149 de ces 2 « blancs » a été déterminée et déduite du signal obtenu précédemment. L'abondance (aire) de chaque composé non marqué par rapport à son deutéré a ainsi pu être évaluée en divisant les aires obtenues pour les composés non marqués par celles des étalons internes (Tableau 4).

Tableau 4 : Abondance (aire) des phtalates non marqués dans une solution de 14 phtalates deutérés à 0,5 µg/mL dans l'acétate d'éthyle

	Blanc 1	Blanc 2	Moy. surface blancs	Solution de 14 phtalates-d4	Surface déduite de la surface des blancs	Ratio Surface non marqué /Surface Deutééré
DMP-d4	0	0	0	258780	258780	
DMP	0	0	0	2834	2834	1.1%
DEP-d4	0	0	0	164676	164676	
DEP	25728	28189	26959	37849	10891	6.6%
DPrP-d4	0	0	0	283336	283336	
DPrP	226	105	166	748	583	0.2%
DiBP-d4	0	0	0	277947	277947	
DiBP	1298	1874	1586	3254	1668	0.6%
DBP-d4	0	0	0	290545	290545	
DBP	278	370	324	2456	2132	0.7%
DPeP-d4	0	0	0	266268	266268	
DPeP	0	0	0	186	186	0.1%
DHP-d4	0	0	0	223534	223534	
BBzP-d4	0	0	0	124864	124864	
BBzP	0	0	0	0	0	
DCHP-d4	29	0	15	136168	136154	
DCHP	0	0	0	0	0	
DEHP-d4	0	0	0	99992	99992	
DEHP	315	504	410	588	179	0.2%
DOP-d4	0	0	0	156624	156624	
DOP	0	0	0	787	787	
DiNP-d4	0	0	0	109303	109303	
DiNP	0	0	0	0	0	
DiDcP-d4	0	0	0	105962	105962	
DiDcP	0	0	0	0	0	
DDcP-d4	0	0	0	126479	126479	
DDcP	0	0	0	1790	1790	1.4%
DUP	0	0	0	0	0	

Les résultats obtenus indiquent que par comparaison avec le DEP-d4, un pic de DEP correspondant à 6,6% de la surface du deutéré est observé. Des abondances autour de 1% sont retrouvées pour le DMP, DiBP, DBP et DDcP ce qui correspond à la pureté annoncée par les fournisseurs pour ces étalons.

Injection par SPME

Afin de comparer par rapport aux données obtenues par injection liquide, la contamination engendrée par les étalons internes a également été vérifiée pour les analyses par SPME lors de l'étalonnage.

Ainsi, pendant 7 jours, un blanc d'eau MilliQ, non dopé et dopé par 333 ng/L de chacun des étalons internes, a été injecté. Les aires obtenues pour chaque phtalate dans le blanc d'eau milliQ ont été déduites des aires obtenues pour ces composés dans le blanc dopé par les étalons internes (pour le DEHP et le DiBP, des variations importantes ayant été constatées pour les blancs, une plus grande incertitude réside dans l'interprétation de ces résultats). Le rapport de l'aire obtenue pour les phtalates non marqués par rapport à celle constatée pour les phtalates deutérés a été calculée (Tableau 5).

Tableau 5 : Comparaison des surfaces obtenues pour les phtalates non marqués par rapport à celles obtenues pour les étalons internes pour des injections d'eaux MilliQ dopées et non dopées à 333 ng/L de chacun des phtalates extraits par SPME

	Ratio Surface non marqué/Surface Deutééré							Moyenne	Ecart-type
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7		
DMP/ DMP-d4	0%	-2%	0%	3%	1%	1%	0%	1%	2%
DEP/ DEP-d4	27%		67%	42%	45%	71%	41%	49%	17%
DPrP/ DPrP-d4	5%	0%	0%	1%	1%	1%	0%	1%	2%
DiBP/ DiBP-d4	43%	112%	169%	181%	397%	193%	301%	200%	117%
DBP/ DBP-d4	31%	7%	50%	57%	73%	58%	72%	50%	23%
DPeP/ DPeP-d4	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
BBzP/ BBzP-d4	1%	1%	2%	2%	2%	-3%	1%	1%	2%
DCHP/ DCHP-d4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
DEHP/ DEHP-d4	42%	36%	52%	15%	34%		2%	30%	19%
DOP/ DOP-d4	2%	2%	1%		0%	-2%	1%	1%	2%
DiNP/ DiNP-d4	-1%	14%	3%	29%	9%	10%	0%	9%	10%
DiDcP/ DiDcP-d4	0%	20%	2%	33%	9%	8%	0%	10%	12%
DDcP/ DDcP-d4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Les résultats obtenus en SPME montrent des ratios beaucoup plus importants que les injections en liquide, compris entre 30% et 200% du pic du deutéré pour le DEP, le DBP, le DiBP et le DEHP dû essentiellement à la contamination par l'utilisation du processus analytique. Pour les autres composés, l'écart est négligeable.

Le niveau de contamination n'étant pas uniforme entre tous les phtalates, et affecte seulement les phtalates habituellement retrouvés lors d'épisodes de pollution, les niveaux retrouvés, anormalement élevés, ne semblent pas provenir d'une dégradation des composés deutérés. Comme pour le test des eaux, il provient d'une contamination propre au laboratoire durant la préparation des échantillons.

5. TEST DE DOPAGE DE MATRICES REELLES

5.1 CONDITIONS EXPERIMENTALES

Afin de reproduire le cadre d'une validation NF T90-210, une eau de source (la Neuville-en-Hez) a été testée pour les expériences en matrice réelle.

Les tests de la méthode ont consisté à analyser une gamme d'étalonnage dans l'eau MilliQ et des dopages en eau de source à différents niveaux de concentrations et ceci sur 6 jours.

Ainsi pour réaliser l'ensemble des manipulations, 2 L d'eau MilliQ et 2 L d'eau de source ont été filtrées sur des filtres en microfibre de verre sans liant calcinés, en utilisant un dispositif de filtration sous vide en verre calciné. Les filtrats ont été recueillis dans des flacons en verre de 1 L calcinés, fermés hermétiquement et conservés au réfrigérateur à 4°C.

Pour réaliser les dopages, une solution mère a été préparée dans du méthanol traité à l'alumine basique. Cette solution contenant tous les phtalates à 45 µg/ml (sauf DiNP et DiDcP à 450 µg/mL) a été utilisée chaque jour pour préparer des solutions filles servant au dopage (et conservée au réfrigérateur à 4°C).

Un mélange contenant tous les étalons internes deutérés a été réalisé à 5 µg/mL dans l'acétone.

Chaque jour, une nouvelle gamme d'étalonnage était préparée dans 15 mL d'eau MilliQ pour obtenir une concentration de 333 ng/L en étalon interne et 10 points de concentrations entre 0 et 600 ng/L (voir section 4.3.5).

Pour les échantillons, 2 dopages à chaque niveau de concentration de la gamme d'étalonnage (20 au total) ont été réalisés dans 15 mL d'eau de source filtrée.

Pour chaque séquence analytique, une nouvelle fibre a été utilisée. Celle-ci était conditionnée thermiquement à 270°C à 15 reprises. Ensuite un blanc de système était réalisé suivi d'un blanc de fibre et d'un blanc d'eau MilliQ. Enfin les étalons étaient injectés, puis les dopages en matrice.

5.2 RESULTATS ET INTERPRETATIONS

5.2.1 RENDEMENTS

L'étude des rendements des phtalates ajoutés dans l'eau de source appuie les observations précédentes. 3 groupes peuvent être clairement distingués : ceux pour lesquels les résultats sont acceptables (cette classe regroupe les phtalates les plus légers et sans problème de contamination), les phtalates les plus lourds et enfin ceux pour lesquels de la contamination est couramment observée.

L'étude des composés de la première classe (DMP, le DPrP, le DPeP, le BBzP et le DCHP) montre qu'à l'image des bons résultats obtenus sur les fonctions d'étalonnage, la méthode est quantitative. La valeur calculée par la fonction d'étalonnage correspond bien à la valeur de dopage. Le graphique ci-dessous représente les rendements moyens par niveau de concentration et par série pour le DMP.

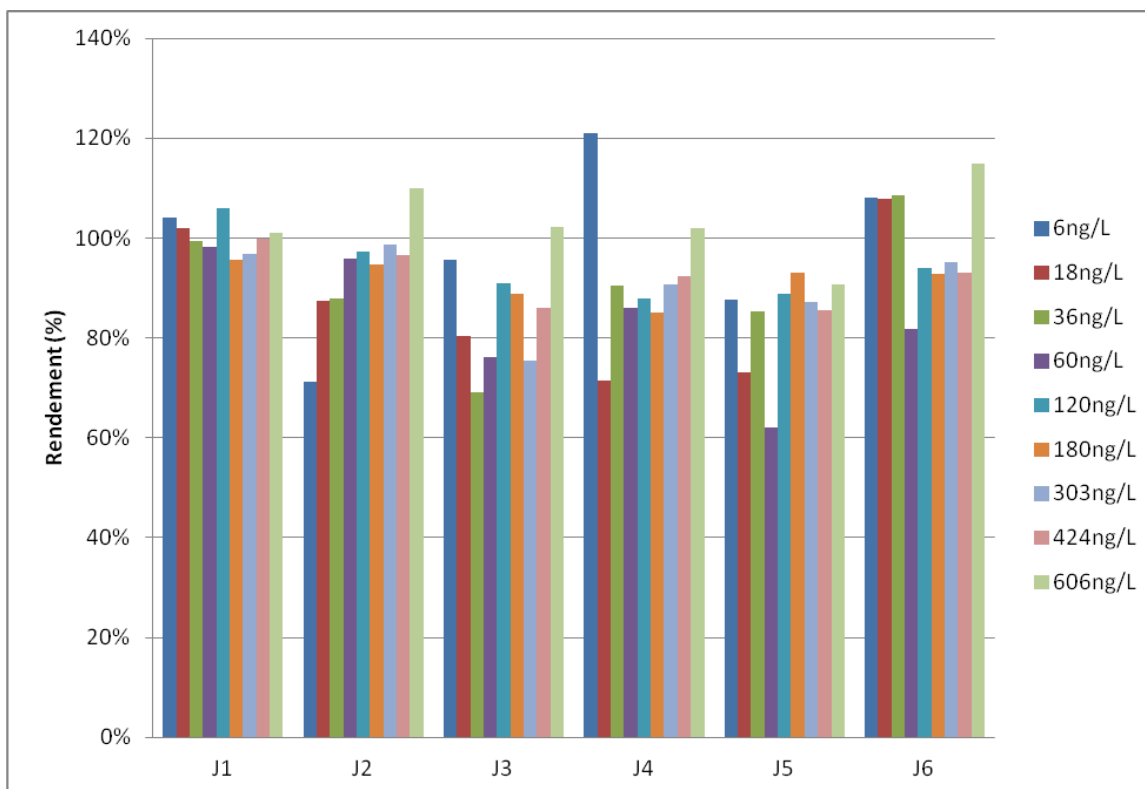


Figure 17 : Rendement moyen par niveau de concentration et par série – DMP

Les rendements varient entre 70% et 120% pour les composés de cette catégorie. L'ensemble des résultats est regroupé en Annexe 4.

Pour les composés les plus lourds (DDcP et le DUP), les rendements sont très faibles voire nuls sur les dernières séries (Figure 18) Les étalons internes sont également très faiblement retrouvés dans ce cas.

La faible récupération et la baisse de la récupération au cours de l'ensemble des séries indiqueraient un effet de matrice sur la fibre, un encrassement du système et/ou une adsorption possible sur les flacons.

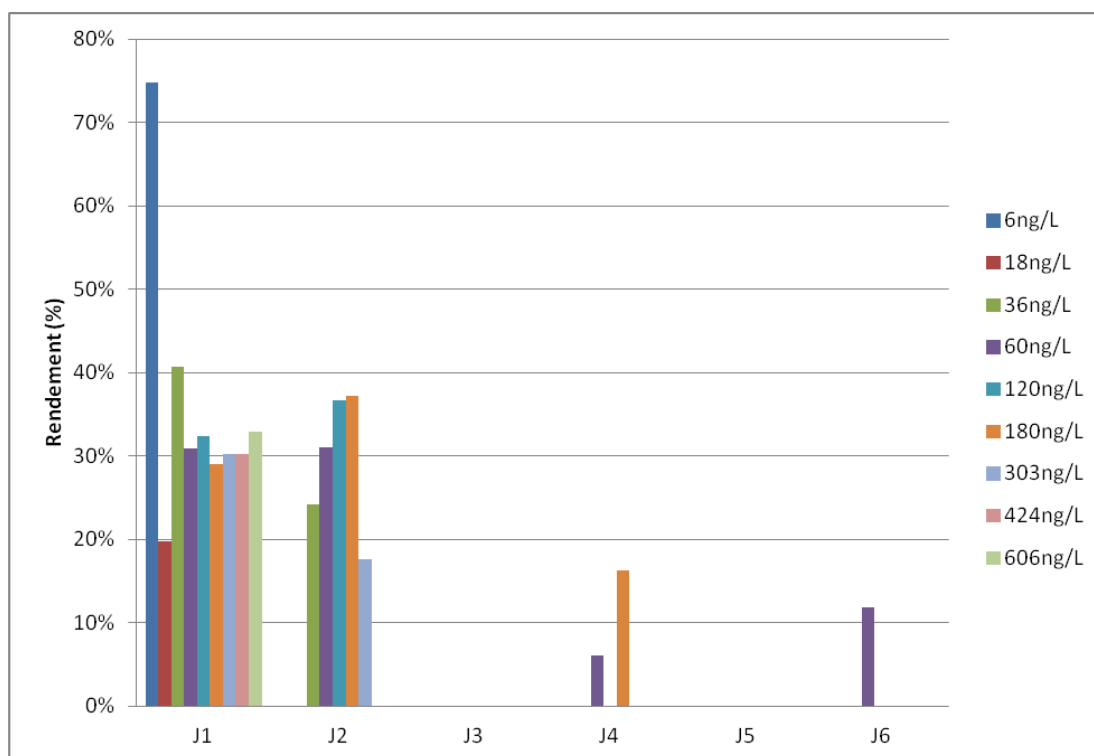


Figure 18 : Rendement moyen par niveau de concentration et par série – DUP

Pour le DOP, le DiNP et le DiDcP, les résultats sont très variables allant de 20% à >500% en fonction des séries. Ces résultats très dispersés sont à l'image des fonctions d'étalonnage notamment pour le DiNP (Figure 19). Pour le DOP et le DiDcP une tendance de récupération respectivement autour de 80% et 40% est toutefois observée. Il est particulièrement noté une détérioration des résultats en fonction des jours, possiblement attribuée à une influence de l'état du système (encrassement ?) sur les résultats.

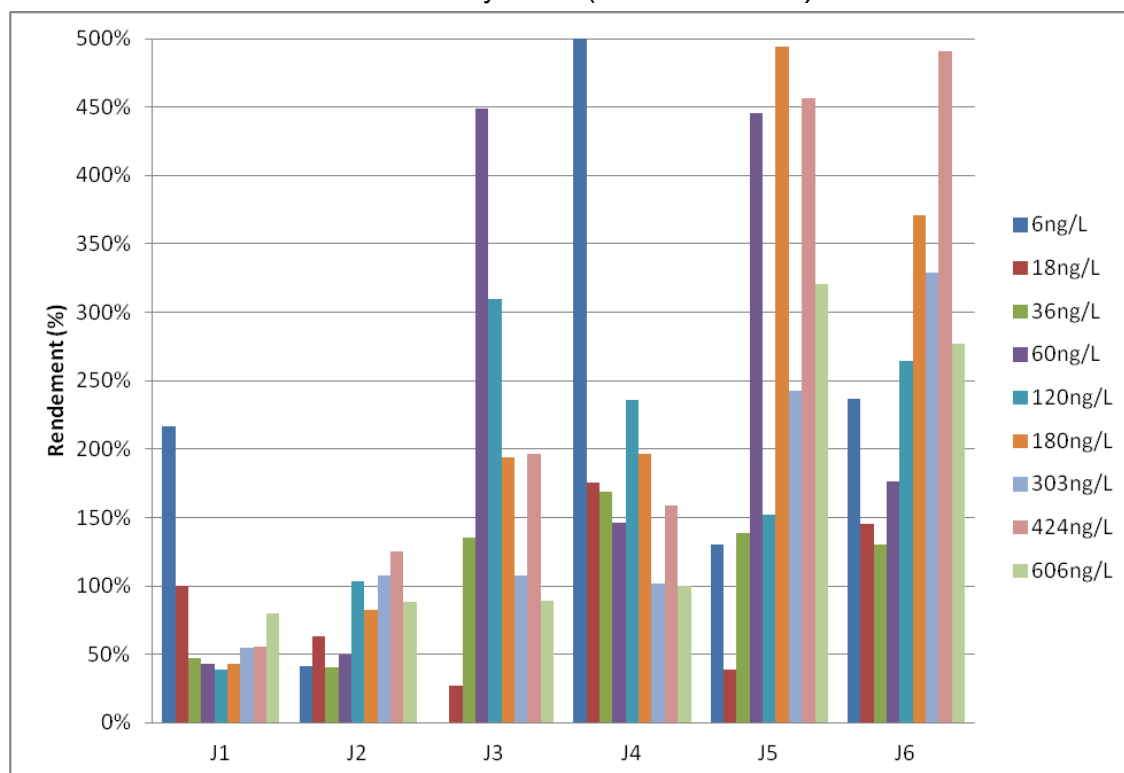


Figure 19 : Rendement moyen par niveau de concentration et par série - DiNP

Les composés pour lesquels une pollution est présente, possèdent des profils différents. Les résultats des rendements du DiBP et du DEHP, pour lesquels les étalonnages sont instables, sont influencés par les fonctions d'étalonnage mais aussi par la non maîtrise de la contamination du laboratoire en phtalates également observée dans la variabilité des contaminations dans les blancs.

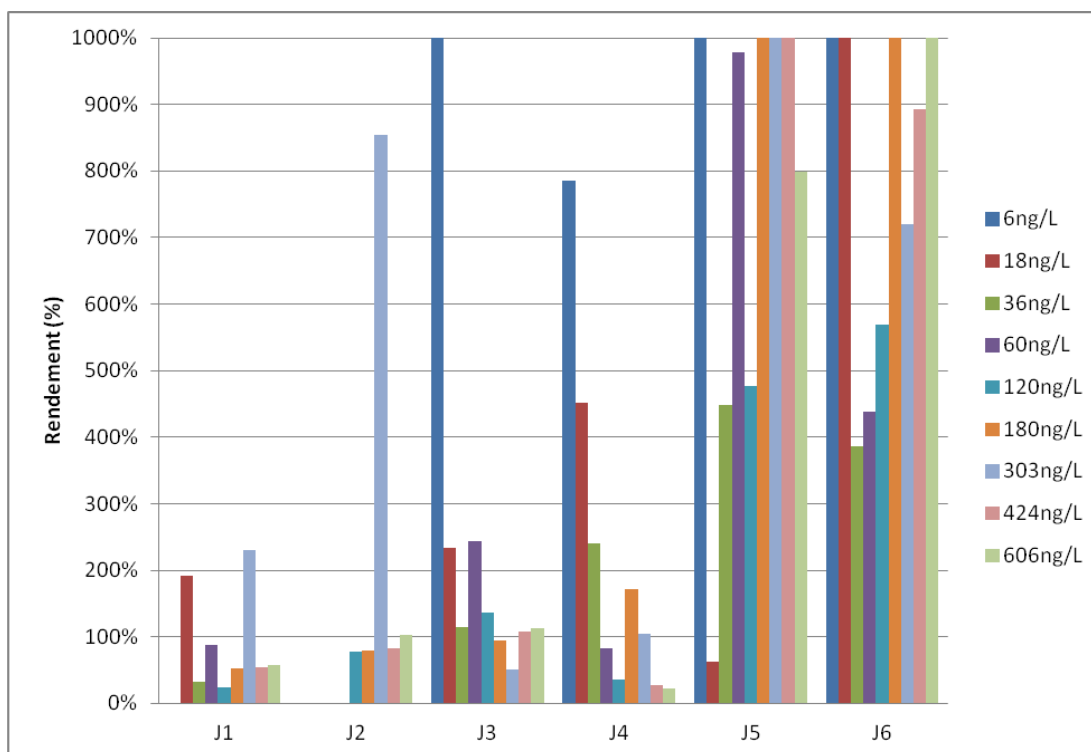


Figure 20 : Rendement moyen par niveau de concentration et par série – DEHP

En revanche pour le DEP, la pollution semble constante à la fois entre étalonnage, dopage et entre séries. Des rendements élevés supérieurs à 120% mais avec une tendance globalement stable sont constatés (Figure 21).

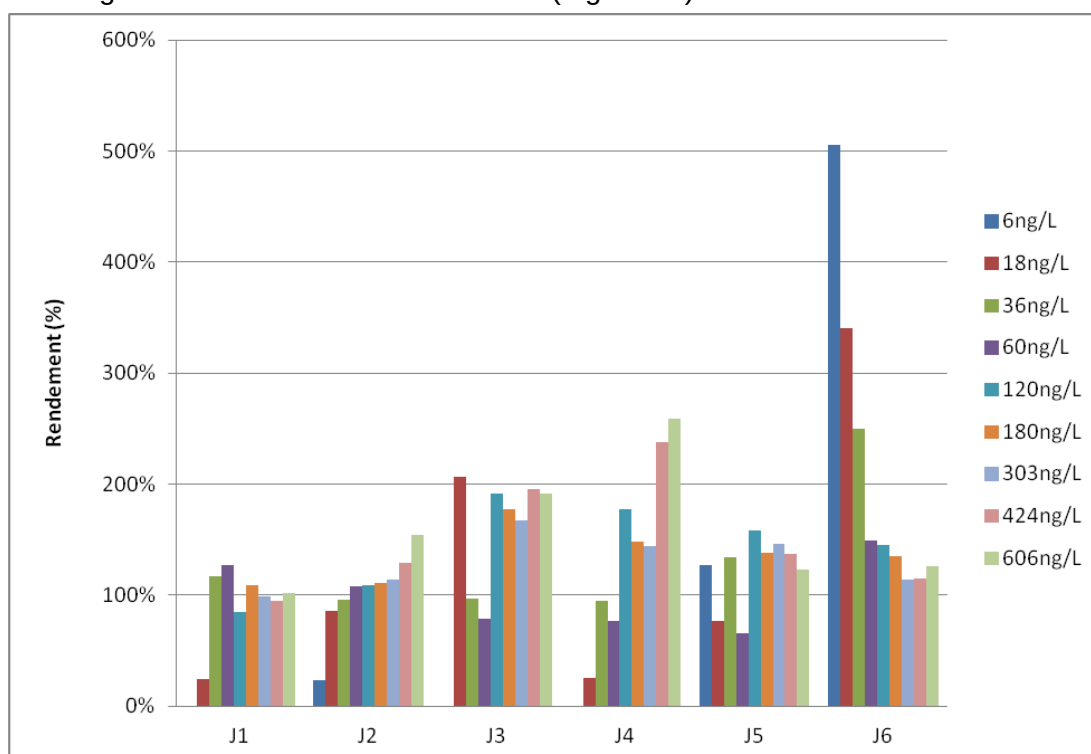


Figure 21 : Rendement moyen par niveau de concentration et par série - DEP

Pour le DBP, le profil des rendements est le même pour toutes les séries avec une contamination empêchant toute interprétation probante.

5.2.2 EFFETS DE MATRICE SUR LES RESULTATS

Les effets de matrices sont particulièrement mis en évidence en suivant la réponse des étalons internes au cours d'une série.

Les figures ci-après représentent le suivi temporel de la réponse de deux étalons internes, le DMP-d4 et le DEHP-d4, au cours de la série d'analyse du deuxième jour des tests. Le suivi de l'ensemble des étalons internes est présenté en annexe 4.

Le tracé bleu correspond au suivi lors de l'étalonnage dans l'eau MilliQ, le tracé rouge correspond à l'analyse des dopages dans l'eau de source et le point vert correspondant au passage d'un étalon de contrôle en fin de série.

Dans le cas du DMP-d4, la réponse est stable au cours de l'étalonnage. Lors du passage aux dopages en eau de source, une baisse progressive de la réponse est observée, jusqu'à un facteur 4 en fin de série.

Ceci met en évidence une dégradation des performances de la fibre et/ou du système analytique au cours du temps. Cette dégradation peut être attribuée à l'effet de la matrice puisqu'un gain d'un facteur 3 est observé sur le contrôle étalon en fin de série en passant de la matrice eau de source à la matrice eau MilliQ. Cependant l'action de la répétition des cycles d'adsorption et de désorption pourrait également entraîner des pertes.

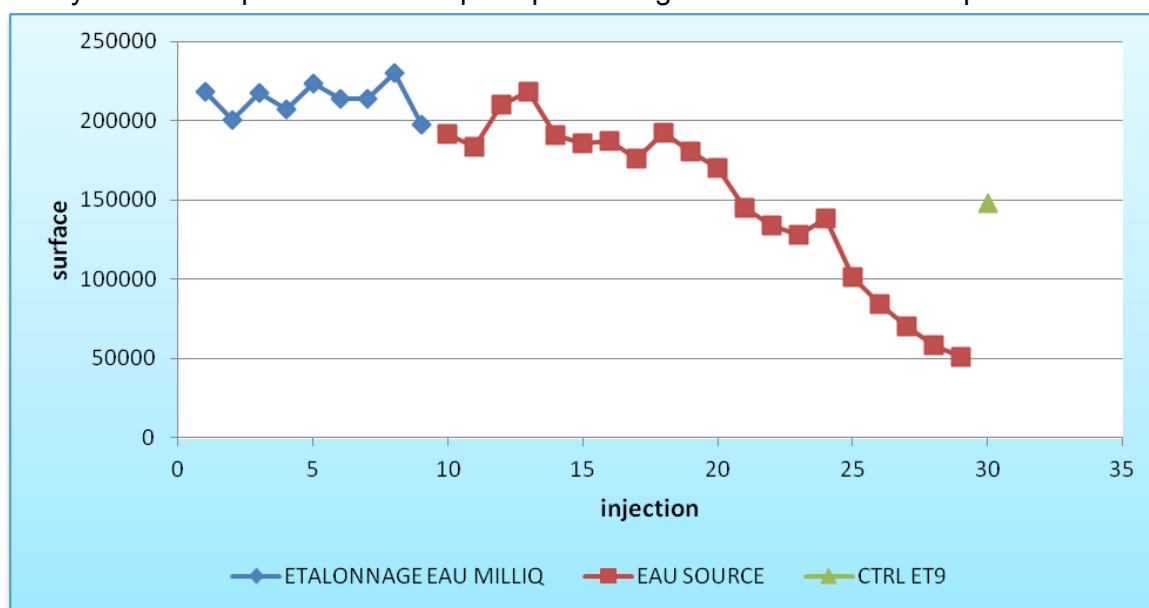


Figure 22 : Suivi de la réponse du DMP-d4 au cours de la série J2

Dans le cas de DEHP-d4, la réponse lors de l'étalonnage n'est pas stable. Ce phénomène est difficilement explicable d'autant qu'il n'est pas observé pour les autres étalons internes. Cependant un constat identique sur la baisse de réponse lors du passage à l'analyse des dopages peut être dressé. Cette diminution est même plus importante que dans le cas du DMP-d4 puisque la perte de réponse entre le début et la fin de l'analyse des dopages est d'un facteur 50. Par rapport au dernier point de la gamme d'étalonnage passé, un gain d'un facteur 10 est obtenu lors du passage du contrôle étalon. Globalement, la sensibilité a cependant fortement diminuée (perte d'un facteur 30) en comparaison de celle obtenue lors du passage de la gamme d'étalonnage.

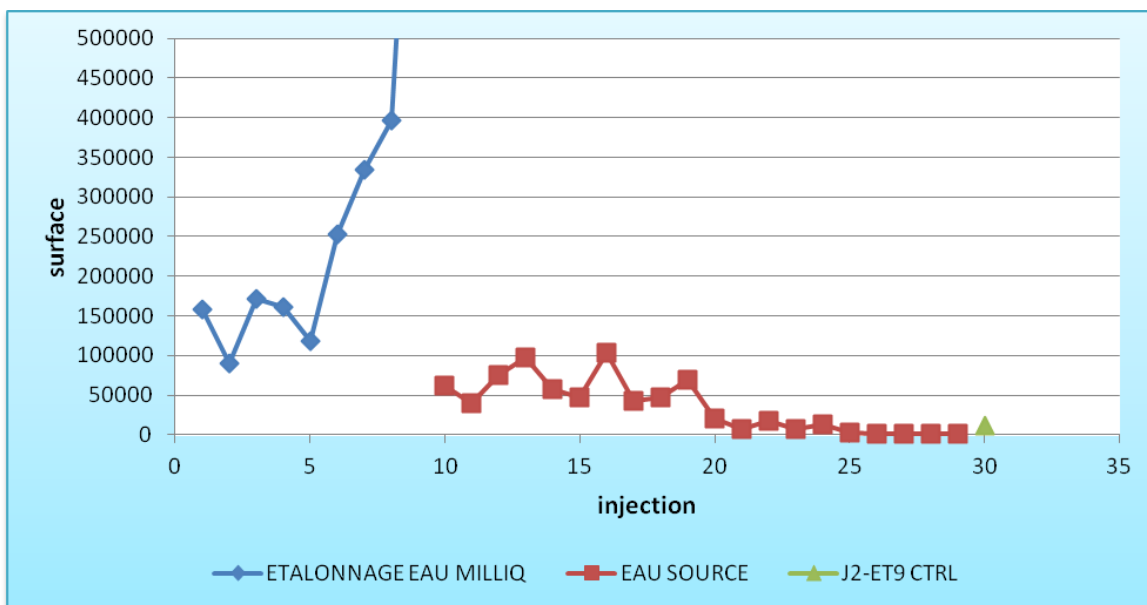


Figure 23 : Suivi de la réponse du DEHP-d4 au cours de la série J2

Cette baisse de la réponse est d'autant plus importante que le composé est lourd. En effet, à une même concentration, la réponse des composés les plus lourds est plus faible que celle des plus légers. Ainsi une baisse d'un facteur 30 à 50 au cours du temps entraîne une perte de sensibilité impactant directement les seuils de quantification.

Ce même profil est observé pour toutes les séries des tests.

L'encrassement du système a également été observé au cours des jours ce qui a conduit à une détérioration des performances (Figure 24). La comparaison des chromatogrammes obtenus pour les blancs de fibre montre l'apparition progressive de pics démontrant l'influence de la matrice et les possibles effets mémoires engendrés par celle-ci sur le système avec des injections répétées par SPME.

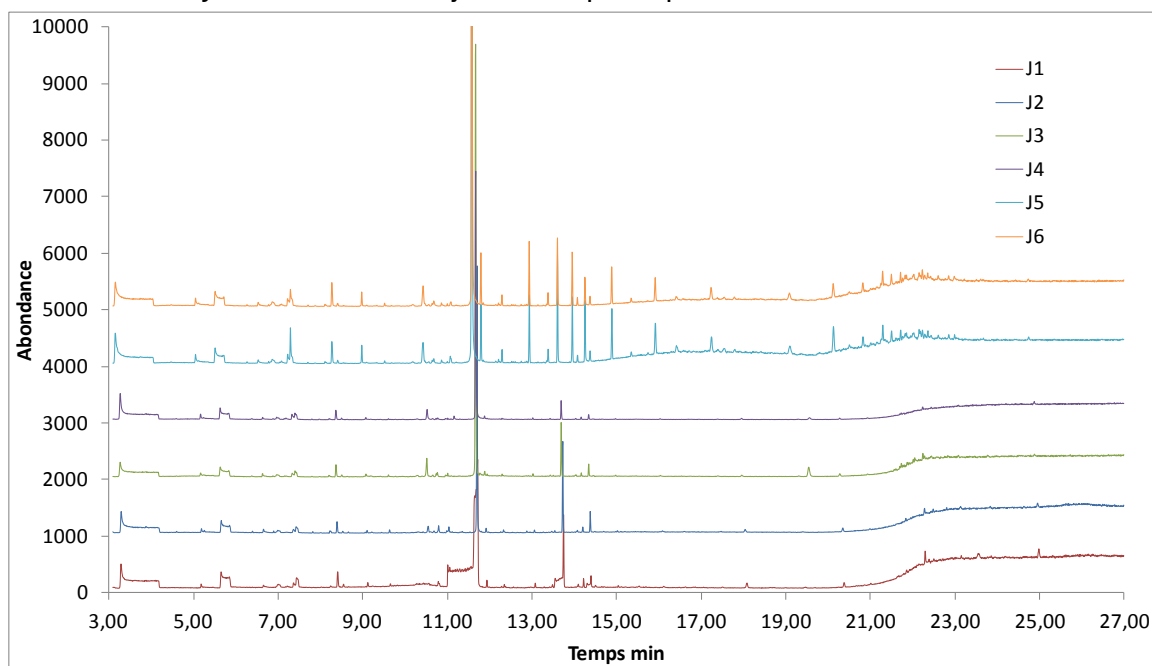


Figure 24 : Superposition des blancs de fibre J1 à J6

5.2.2.1 TESTS SUR D'AUTRES MATRICES

L'évaluation des performances de la méthode et surtout des interférences sur les extractions par SPME a été testée sur d'autres matrices. Au vu des résultats inconsistants obtenus sur une eau de source, seul un dopage par étalon interne a été effectué.

Ainsi, en plus de l'eau MilliQ et de l'eau de source, une eau de rivière (Oise) et une eau d'étang (la Neuville-en-Hez) ont été analysées en triplicat. Toutes ces eaux ont été filtrées avant analyses et ensuite dopées avec les étalons internes à 333 ng/L chacun.

Les analyses de chaque matrice montrent la présence des phtalates habituellement retrouvés dans les blancs d'eau. En comparaison avec l'eau MilliQ, les niveaux sont supérieurs sauf pour le DBP (Figure 25). Cela pourrait indiquer la présence de phtalates dans ces eaux.

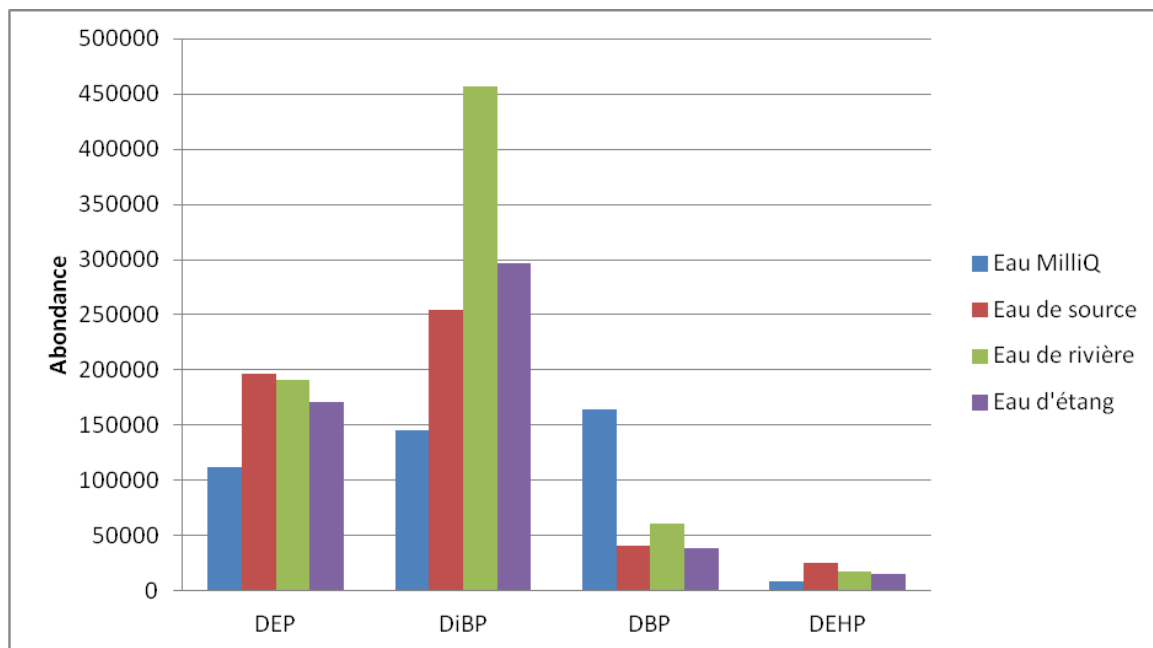


Figure 25 : Comparaison du niveau de phtalates dans 4 matrices analysées.

Le taux de recouvrement des étalons internes dans différentes matrices est représenté en Figure 26. Les résultats ont été normalisés par rapport à la réponse obtenue pour l'eau MilliQ.

Pour l'eau de source et l'eau MilliQ, des résultats sensiblement équivalents sont retrouvés. Par contre, pour les eaux de rivière et d'étang, une perte du recouvrement des étalons internes est constatée en corrélation avec la masse moléculaire des phtalates étudiés. Ainsi, alors que des résultats semblables sont observés pour le DMP pour toutes les matrices, pour le DDcP, composé le plus lourd testé, ce recouvrement ne représente plus que 10% dans les eaux de rivière et d'étang.

Une corrélation avec le poids moléculaire et l'effet de matrice est également constatée avec la dispersion des résultats. Ainsi, pour les 5 phtalates deutérés les plus lourds (DEHP-d4, DOP-d4, DiNP-d4, DiDCP-d4 et DDcP-d4), la dispersion oscille entre 30% et 45% pour l'eau MilliQ. Dans les différentes matrices testées, la dispersion est supérieure, pouvant atteindre 70% à 80% pour ces mêmes molécules dans l'eau de source (rouge) et dans l'eau d'étang (jaune).

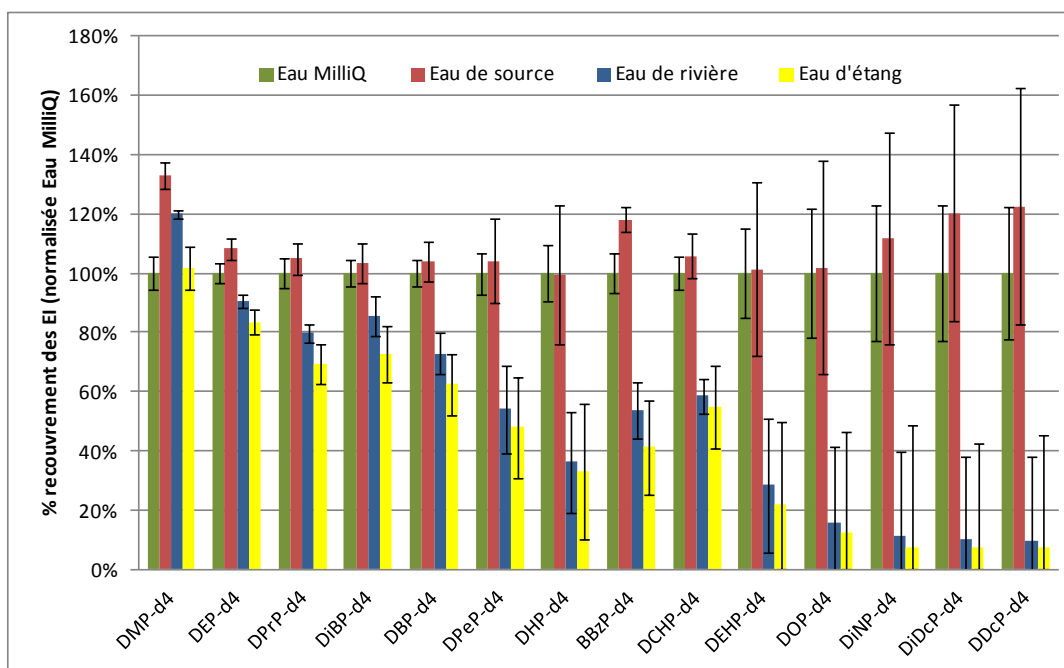


Figure 26 : Taux de recouvrement des étalons internes dans différentes matrices normalisée à la réponse obtenue pour l'eau MilliQ

Ces résultats démontrent que la fibre SPME utilisée, PDMS/DVB, n'est pas adaptée à l'analyse des phtalates les plus lourds visés dans cette étude (pour rappel, ces composés n'avaient pas été suivis lors de l'étude prospective et ces tests visaient à déterminer l'applicabilité de la méthode également à ces composés).

La matrice, en particulier des milieux complexes d'eau d'étang ou de rivière comme dans cette étude, défavorise l'extraction des composés cibles, peut être par des effets de compétition provoqués par celle-ci.

6. CONCLUSION

L'objectif de cette étude était de transférer la méthode utilisée lors de l'étude prospective pour le dosage des phtalates visés par la surveillance réglementaire (arrêté « surveillance » du 07 Août 2015 et DCE : DEHP, DiBP, DEP, DMP, DBP et DBzP). Elle consistait ainsi à effectuer une validation de cette méthode suivant le référentiel français utilisé en accréditation et pour l'agrément des laboratoires : la norme NF T90-210. Au moment du déroulement de cette étude, la matrice de surveillance n'étant pas encore complètement définie, les travaux ont été effectués en se basant directement sur la méthode utilisée lors de l'étude prospective et donc sur la phase dissoute.

Des modifications de la méthode originale ont été jugées nécessaires pour se rapprocher des pratiques habituelles des laboratoires prestataires. Ainsi, un étalonnage interne a été évalué et utilisé pour tous les tests effectués. L'objectif de validation de la méthode par NF T90-210 pour les composés visés n'a pas pu être atteint pour des problèmes de contamination lors du processus analytique de certains composés d'intérêt. Ainsi, il faut noter que la méthode est adaptée pour les composés dits légers (et non soumis à une contamination) que sont le DMP, le DPrP, le DPeP, le BBzP et le DCHP. Elle permet d'atteindre, en eau de source, des limites de quantification estimées de 6 ng/L avec des rendements d'extraction entre 75% et 120%.

En revanche, pour les autres composés de l'étude, des résultats non probants ont été obtenus à cause de ces effets de contamination.

Les composés ayant une masse moléculaire supérieure à 390 Da ne sont pas bien extraits par la fibre PDMS/DVB. C'est le cas du DiNP, du DiDcP, du DDcP et DUP. Ceci induit une grande variabilité dans les résultats et une méthode non quantitative. Ces composés avaient été ajoutés pour tester la compatibilité potentielle avec la méthode évaluée, ce qui n'a manifestement pas été concluant.

Les DiNP et du DiDcP sont 2 composés qui sont inclus dans l'arrêté surveillance pour une surveillance dans les sédiments mais qui n'ont pas été recherchés dans l'étude prospective. Les tests chromatographiques ont mis en évidence la difficulté de leur analyse car ils se présentent sous forme de massifs qui co-éluent. Une méthode spécifique devra être développée pour leur analyse, peut être préférentiellement en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, ce qui permettrait de les éluer en pic unique.

L'analyse du DEP, DiBP, DBP et DEHP demeure extrêmement problématique. En effet, l'ubiquité de ces substances notamment dans les atmosphères de laboratoires a entraîné des contaminations sévères des échantillons malgré les précautions de conditionnement prises au niveau du matériel utilisé ce qui n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants.

Par ailleurs, cette étude a mis en évidence des effets de matrices caractérisés par des réponses différentes en fonction de la nature de l'eau testée démontrant la nécessité d'utiliser des étalons internes. L'emploi d'un autre type de fibre comme une fibre PDMS pourrait aussi être envisagé.

Si l'étude prospective a été effectuée sur la fraction dissoute des eaux, il a été décidé, depuis cette présente étude, que l'arrêté surveillance sera mis en application avec des analyses sur eaux brutes pour suivre les pratiques exigées par la DCE. Or, la technique SPME n'a, a priori, pas accès aux composés piégés sur les particules et est donc une méthode exclusive à la fraction dissoute des eaux. Des essais pratiqués sur la SBSE, au principe d'extraction identique à la SPME, pour le programme AQUAREF 2015-2016, vont essayer d'évaluer l'utilisation de cette technique avec de l'eau brute. Si des résultats probants sont constatés, le principe pourrait être appliqué à la SPME. Des réflexions sur des méthodologies alternatives devraient ainsi être menées afin de pouvoir atteindre des niveaux de performances satisfaisants.

Cependant, dans l'immédiat et afin de disposer d'une méthode compatible avec l'analyse de l'eau brute, une autre méthode, à base d'extraction liquide/liquide ou d'extraction par disque peut être envisagée pour répondre aux besoins de l'arrêté surveillance. Ces méthodes seront cependant soumises aux mêmes problèmes de contamination que constatés lors de cette étude (et même accentués, car plus d'étapes de préparation d'échantillon seront requises).

Enfin, ce travail a démontré la difficulté de l'analyse des phtalates ubiquistes, DEP, DiBP, DBP et DEHP. De nombreuses incertitudes demeurent sur la fiabilité des données produites dans le cadre de la surveillance régulière. La norme NF EN ISO 18856 a été élaborée par un laboratoire Allemand qui utilisait l'équivalent d'une salle blanche spécialement conditionnée pour ce type d'analyse. Certains laboratoires dont nous faisons partie n'ont pas les capacités à disposer de ce type de matériel au regard des volumes ou des fréquences d'analyse effectués sur les phtalates.

Pour la surveillance routinière, afin d'obtenir des données fiables (notamment pour éviter l'usage de soustractions de larges niveaux de blancs par exemple), l'utilisation de moyens adaptés semble cependant indispensable afin de minimiser les niveaux de contaminations obtenus. Dans cette optique et dans un contexte général pour tous les composés ubiquistes pouvant engendrer des problèmes de blancs, des pratiques plus strictes concernant la gestion des blancs devraient être mises en œuvre. Ainsi, les exigences sur la fréquence des blancs, de prélèvement et au laboratoire, et sur les performances à atteindre sur le contrôle des niveaux de blancs devraient être renforcées, mais être également systématiquement fournies dans la demande client.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] 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
- [2] NF EN ISO 18856, Qualité de l'eau - Dosage de certains phtalates par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse, 2005
- [3] 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, DRC-13-136939-12927A, 2014.
- [4] Dévier M.-H., Le Menach K., Viglino L., Di Gioia L., Lachassagne P., Budzinski H., Ultra-traces analysis of hormones, pharmaceutical substances, alkylphenols and phtalates in two French natural mineral waters, Science of the total environment, 443 (2013) 621-632
- [5] XP T 90-124 - Qualité de l'eau - Critères pour l'évaluation d'une méthode d'analyse multi-classes pour la détermination des composés organiques dans des matrices environnementales –(en cours d'élaboration)
- [6] Rapport d'étude INERIS, Etude des sources de contamination et impact sur le dosage du Di(éthylhexyl) phtalate, DRC - CHEN - 66011 - HA/CLE - 06.0084, 2005
- [7] Fankhauser-Noti A., Grob K., Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and tricks, Analytica Chimica Acta, 582 (2007) 353-360

8. LISTE DES ANNEXES

Repère	Désignation
Annexe 1	Paramètres d'injection, chromatographiques et spectrométriques
Annexe 2	Superposition des fonctions d'étalonnage des tests entre J1 et J6
Annexe 3	Rendement moyen par niveau de concentration et par série
Annexe 4	Suivi de la réponse des étalons internes au cours de la série J2

ANNEXE 1

Paramètres d'injection, chromatographiques et
spectrométriques

Matériel Utilisé

Le matériel retenu pour l'analyse est un couplage chromatographie en phase gazeuse/spectromètre de masse en mode de ionisation par impact électronique (CG/SM/EI) AGILENT® constitué :

- d'un chromatographe en phase gazeuse de type CG6869N
- d'un spectromètre de masse simple quadropôle de type 5973N
- d'un passeur d'échantillon Gerstel® de type MPS2 avec l'option SPME
- d'un injecteur PTV Gerstel® de type CIS4 équipé d'un insert en verre 0,7mm

SPME

- d'un injecteur SSL ou d'une station de bake-out pour le conditionnement des fibres SPME

- d'une colonne capillaire, permettant la séparation des composés, de type AGILENT® DB5-MS UI (30 m ; 0.25 mm ; 0.25 µm).

- de fibres SPME 65µm PDMS/DVB Stableflex 23Ga de chez SUPELCO®.

Paramètres chromatographiques

Paramètres PTV CIS4 : mode « Pulsed Splitless » sur un insert en verre SPME 0,7mm sur une tête d'injection sans septum.

Tableau 6 : Paramètres injecteur CIS4

Temp	270°C
Débit de fuite	20 mL/min
Temps Splitless	1 min
Surpression	25 psi
Temps de surpression	1 min
Gaz vecteur	Helium
Débit	1,3 mL/min

Paramètres SSL : mode « SPLIT » sur un insert en verre SPME 0,7mm

Tableau 7 : Paramètres injecteur SSL (bakeout de la fibre)

Temp	270°C
Ratio de fuite	2 :1
Débit de fuite	2,6 mL/min
Gaz vecteur	Helium
Débit	1,3 mL/min

Paramètres CG : temps total 27 min

Tableau 8 : Paramètres du four CG

Température (°C)	Rampe (°C/min)	Palier (min)
50		2
240	15	5
310	30	5

Paramètres GERSTEL MPS : Mode SPME dans l'incubateur

Tableau 9 : Paramètres du passeur d'échantillon MPS2

Préparation d'échantillon	
Incubateur	Agitateur
Temp. Incubateur	65°C
Temps Incubation	5min
Agitation on	30s
Agitation off	5s
Vitesse d'agitation	250tr/min
Paramètres d'échantillon	
Type de tray	VT32-20
Pénétration du vial	38mm
Temps d'extraction	30min
Pénétration dans l'injecteur	58mm
Temps de désorption	360s (6min)
Bakeout fibre	
Lieu	SSL
Temps pre-Bakeout (avant adsorption)	20min
Pénétration bakeout	54min
Dérivation (Rinçage fibre avant désorption)	
Mode dériv.	Post Extraction
Temps dériv.	1min
Lieu	Vial en position 6 de l'incubateur contenant 15mL d'eau MilliQ
Pénétration Dériv.	38mm

Conditions
reprises du
LPTC

Paramètres ligne de transfert : Temp = 300°C

Paramètres de spectrométrie de masse

Paramètres MS :

Tableau 10 : Paramètres MS

<i>Quad temp</i>	150°C
<i>Source temp</i>	250°C
<i>Type ionisation</i>	Impact électronique
<i>Type acquisition</i>	Single Ion Monitoring (SIM)
<i>Délai Solvant</i>	3 min
<i>Courant d'émission</i>	35 µA
<i>Energie Electron</i>	70 eV
<i>EMV mode</i>	Gain Factor
<i>Gain factor</i>	2

Paramètres SIM :

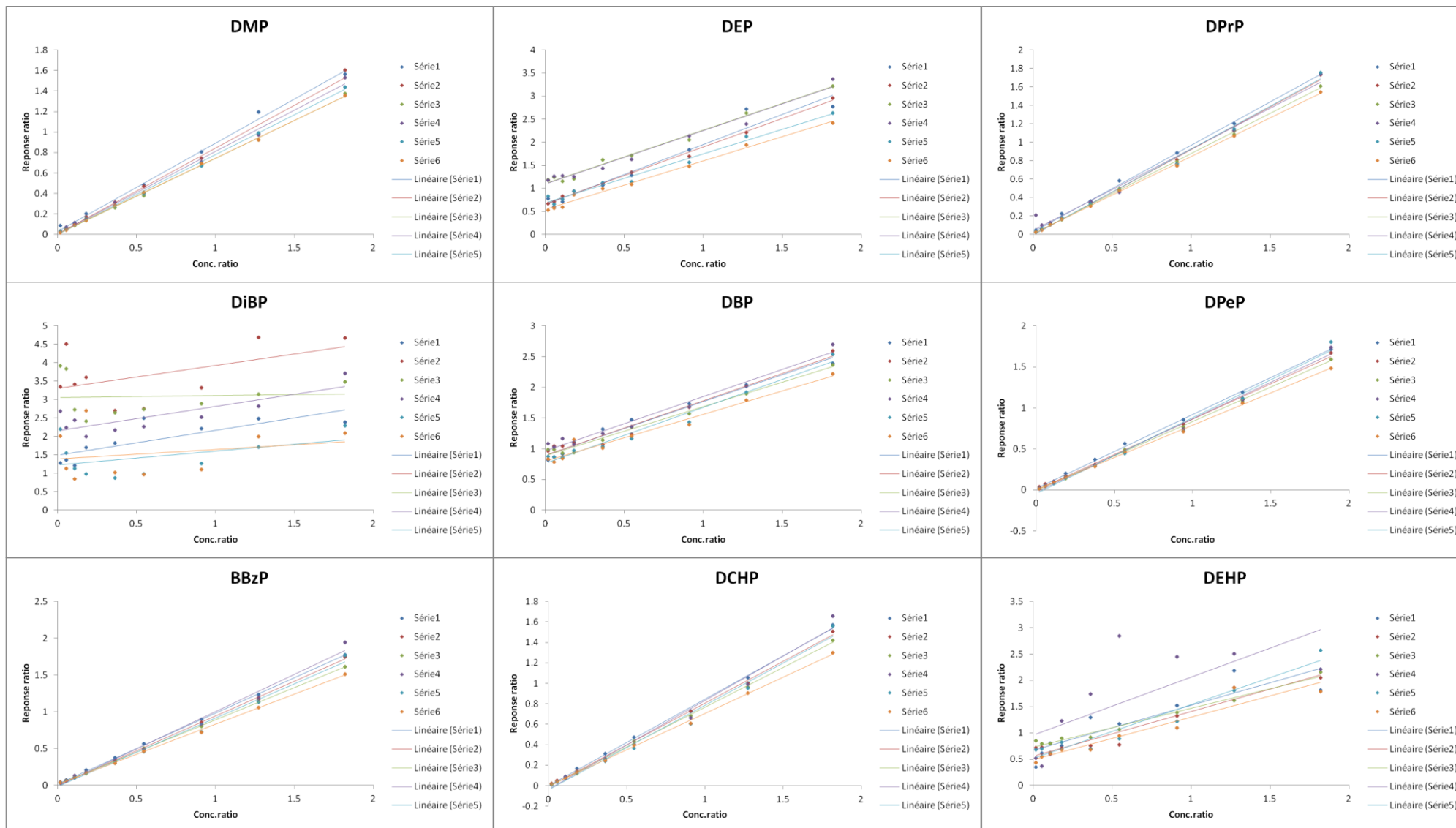
Tableau 11 : Segments SIM

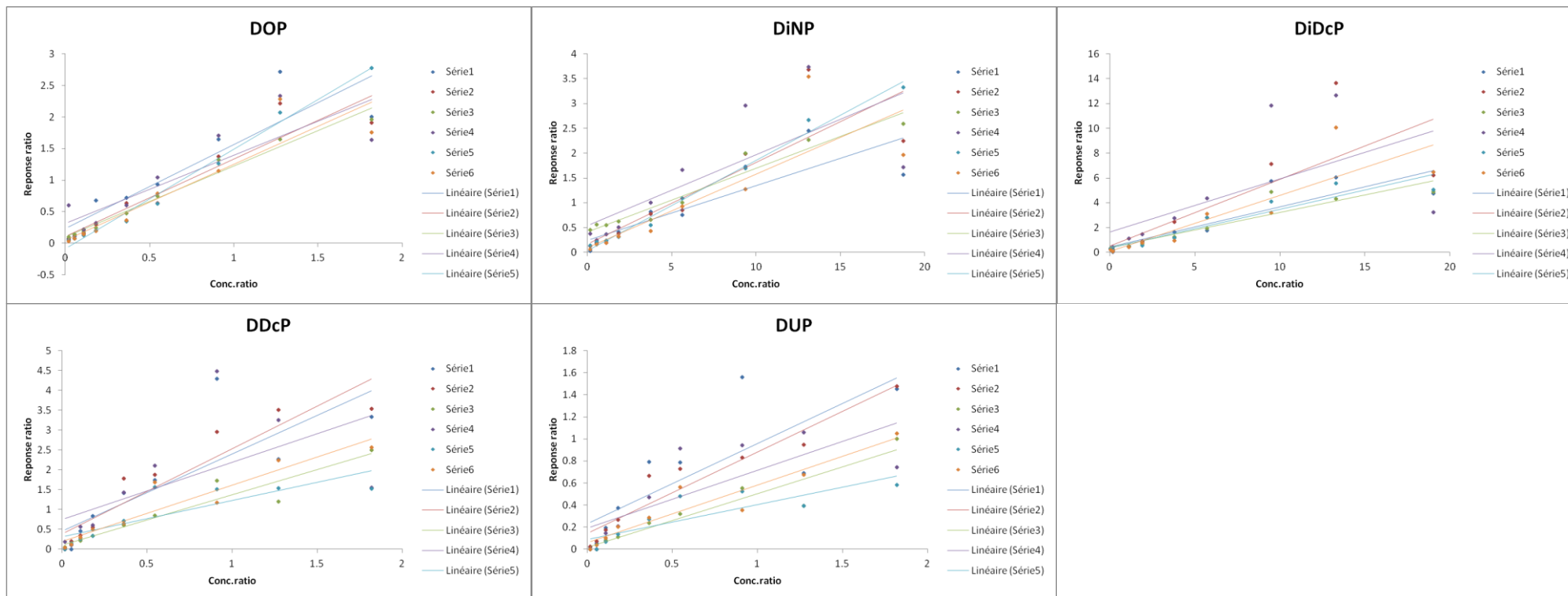
<i>Groupe</i>	<i>Départ du segment min</i>	<i>Composé</i>	<i>Dwell time ms</i>	<i>Ion (m/z) Quantification</i>	<i>Ion (m/z) Qualification1</i>	<i>Ion (m/z) Qualification2</i>
1	3	DMP	100	163	194	135
		DMP-d4	100	167		
2	11	DEP	100	149	177	222
		DEP-d4	100	153		
3	12.50	DPrP	100	149	209	191
		DPrP-d4	100	153		
4	13.50	DiBP	100	149	223	167
		DiBP-d4	100	153		
5	14.00	DBP	100	149	223	205
		DBP-d4	100	153		
6	15.5	DPeP	100	149	237	219
		DPeP-d4	100	153		
7	17.0	BBzP	100	149	206	178
		BBzP-d4	100	153		
		DnHP-d4	100	153		

Groupe	Départ du segment min	Composé	Dwell time ms	Ion (m/z) Quantification	Ion (m/z) Qualification1	Ion (m/z) Qualification2
8	20.0	DCHP	100	149	167 (31.7)	249 (5.5)
		DCHP-d4	100	153		
9	20.34	DEHP	100	149	167	279
		DEHP-d4	100	153		
10	21.7	DOP	80	149	279	
		DiNP	80	293	149	
		DiDcP	80	307	149	
		DOP-d4	80	153		
		DiNP-d4				
		DiDcP-d4				
11	23.90	DDcP	100	149	307	289
		DDcP-d4	100	153		
12	25.0	DUP	100	149	321	303

ANNEXE 2

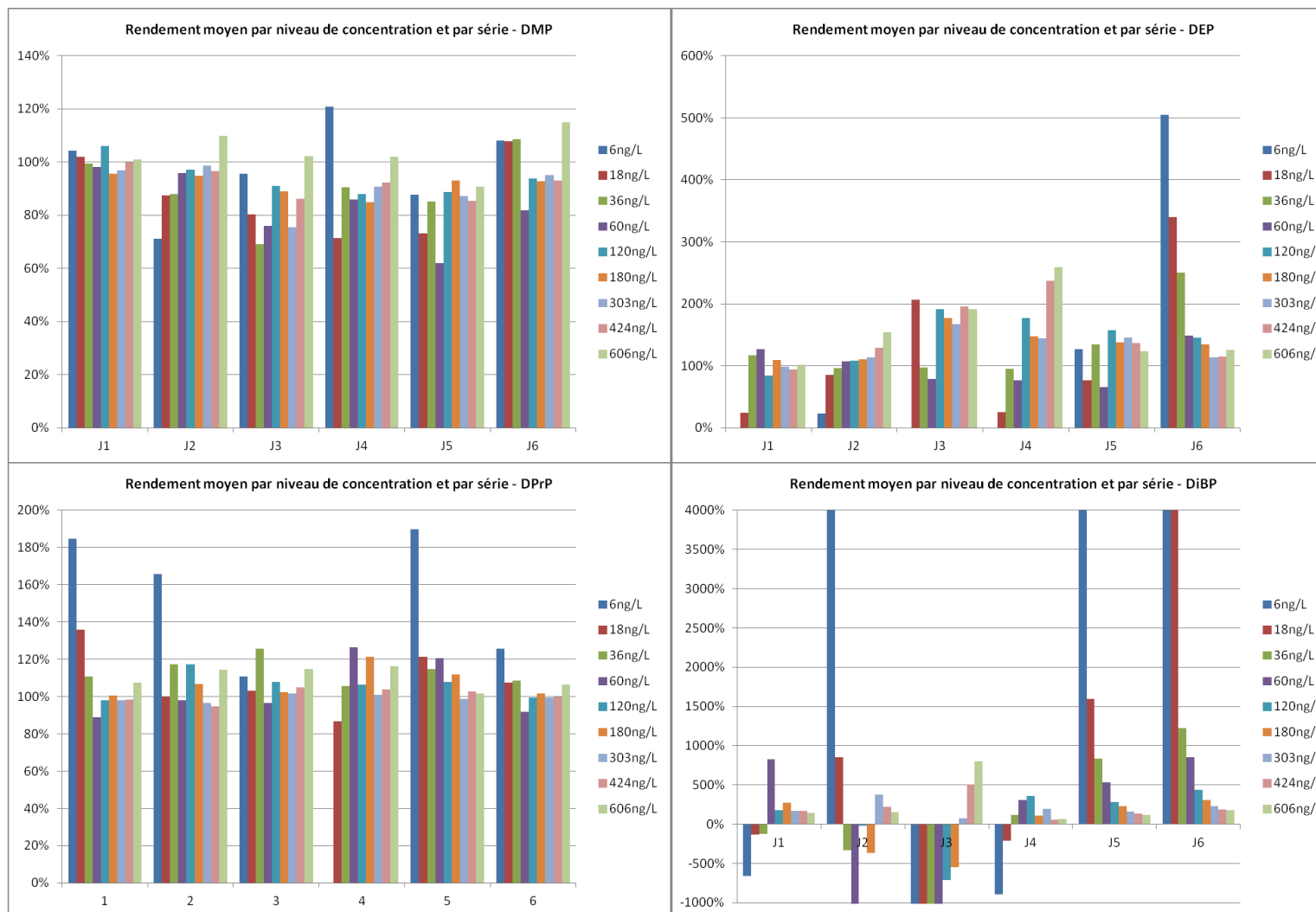
Superposition des fonctions d'étalonnage des tests
entre J1 et J6

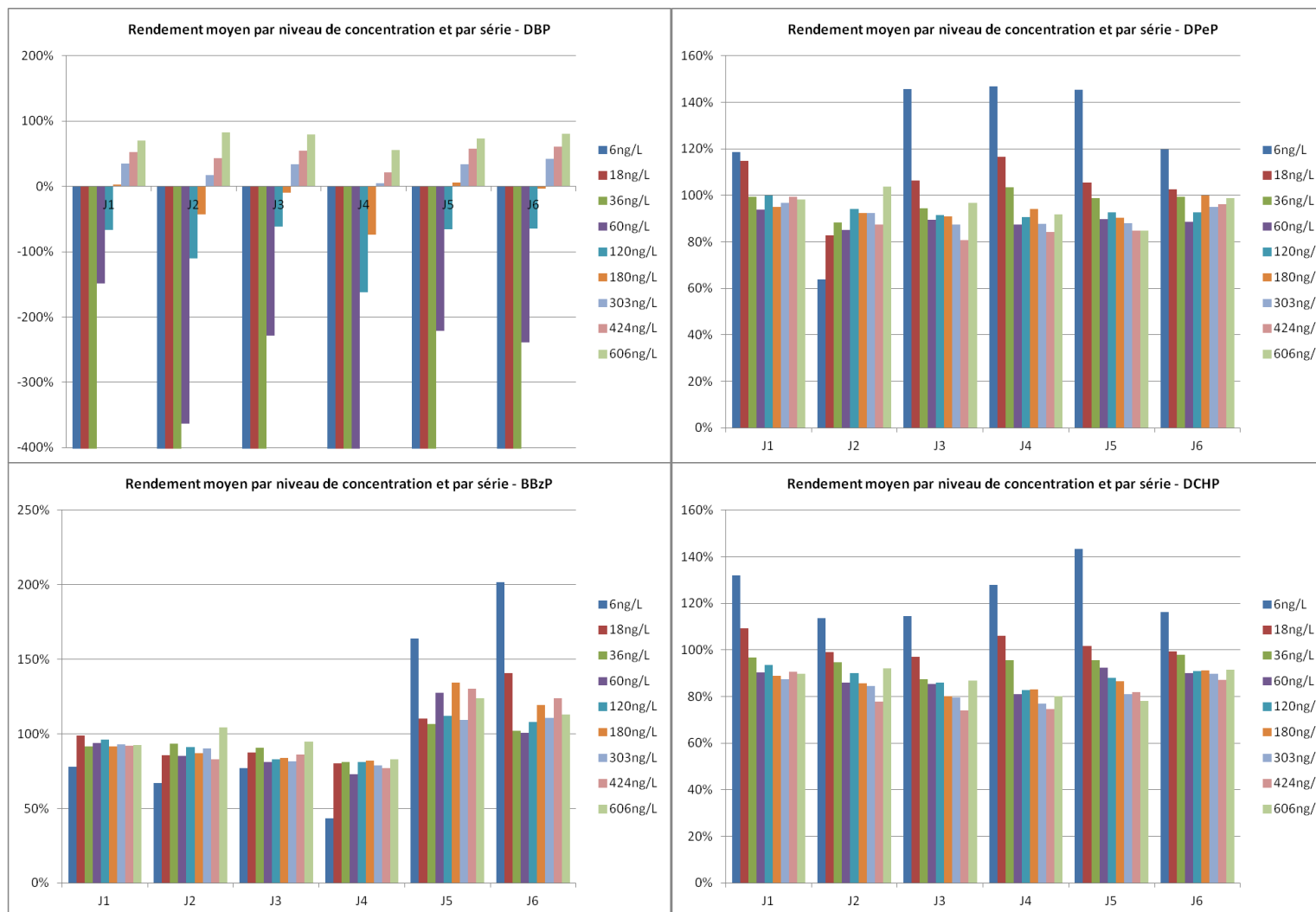


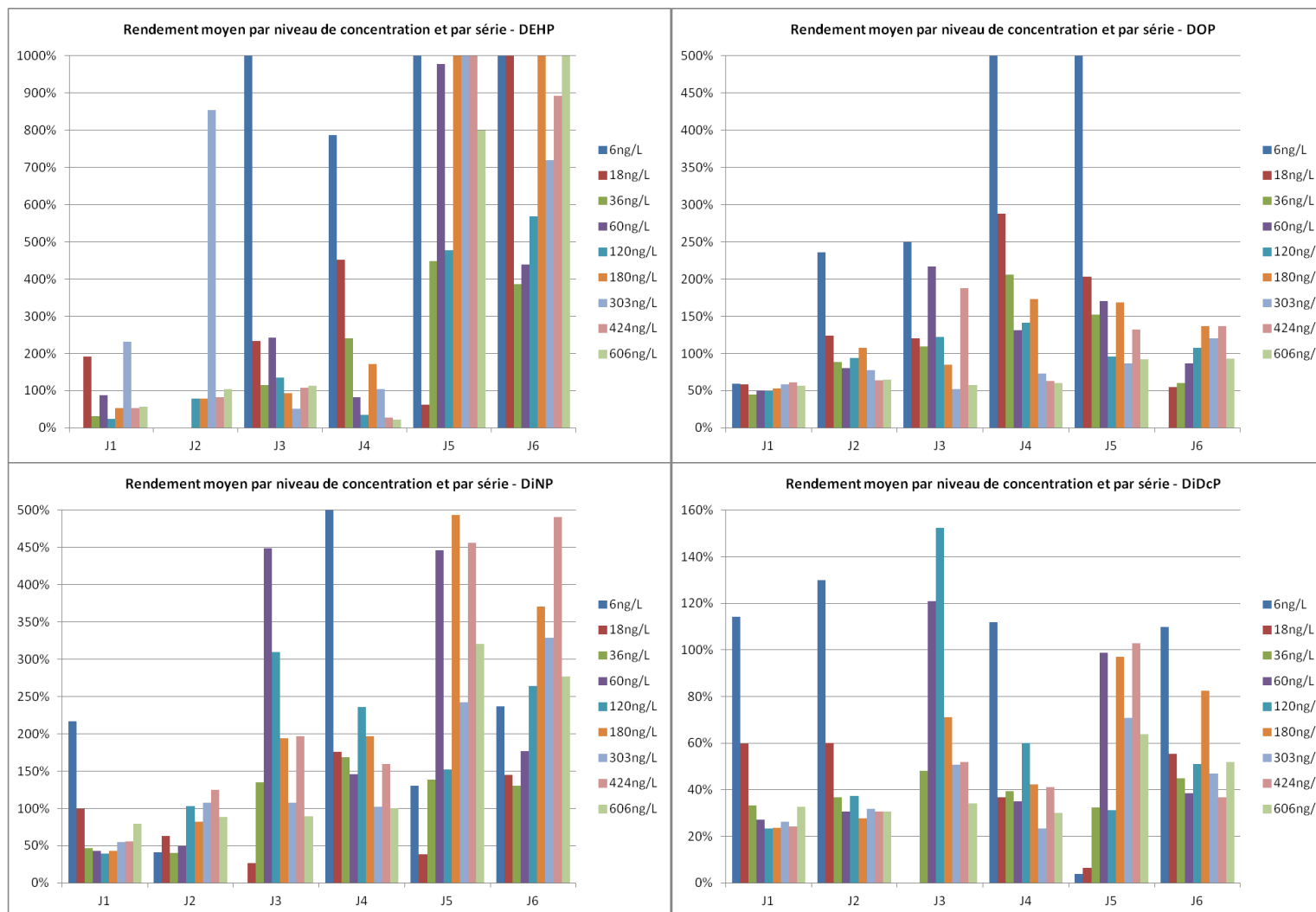


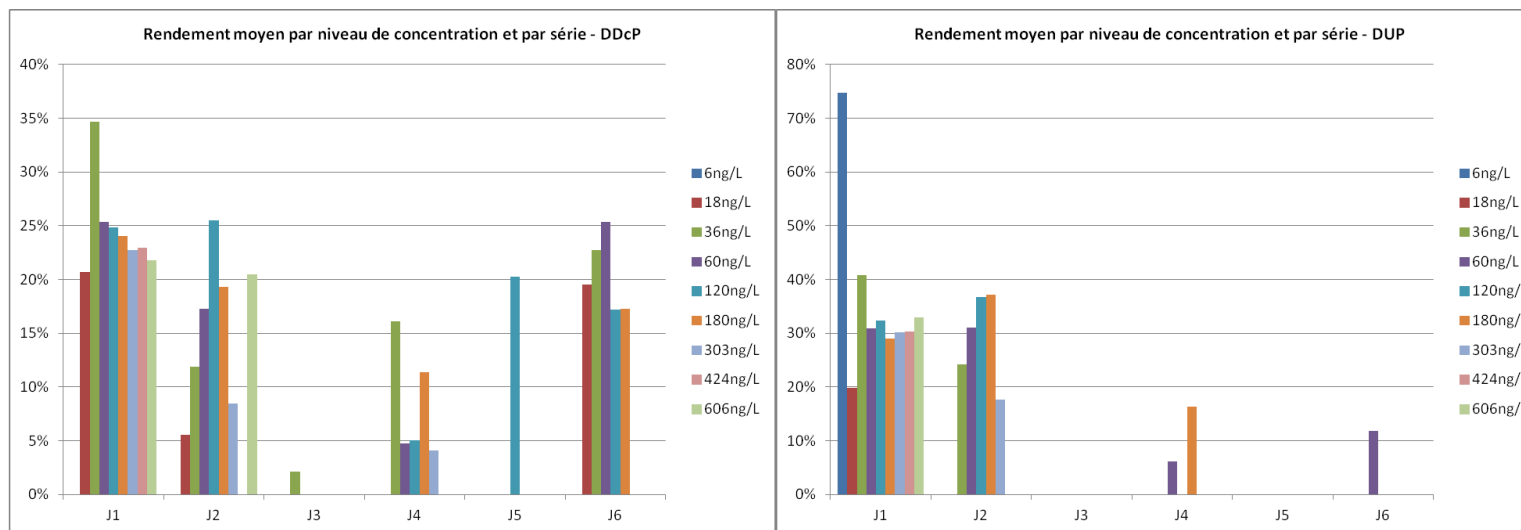
ANNEXE 3

Rendement moyen par niveau de concentration et par série









ANNEXE 4

Suivi de la réponse des étalons internes au cours
de la série J2

