

UNIVERSITÉ Paris-Sud, centre d'Orsay
Département de Chimie

Année universitaire 2014-2015

RAPPORT DE STAGE

**Développement d'une stratégie analytique pour
la mesure des alkylphénols et de leurs dérivés éthoxylés
dans le sérum et le lait maternel**

Effectué dans le cadre de l'obtention du diplôme de
MASTER 1 Chimie Analytique

Présenté et soutenu par Joan Oghale OJENIMA

Organisme :	LABoratoire des Résidus et Contaminants dans les Aliments
Nom du directeur :	Bruno LE BIZEC, directeur du LABERCA
Nom du responsable:	Emmanuelle BICHON, responsable de la cellule ATI
Nom du référent:	Yoann DECEUNINCK, membre de la cellule ATI

REMERCIEMENTS

J'adresse ma profonde reconnaissance au Professeur Bruno LE BIZEC pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et à tous les acteurs du LABERCA qui m'ont permis d'effectuer ce stage très instructif.

Je tiens à remercier Yoann DECEUNINCK, référent qui m'a accompagnée tout au long de ce stage. Je le remercie tout particulièrement pour son amabilité, sa patience, sa disponibilité et ses nombreuses explications. A cela s'ajoutent les nombreux créneaux mis à disposition et le temps consacré pour que tout se passe dans de bonnes conditions. Sans oublier l'autonomie accordée qui m'a permis de découvrir et apprendre de mes erreurs. Merci pour tout.

Un grand merci également à ma responsable Emmanuelle BICHON, pour son accueil dans la cellule ATI, et à tous les membres de cette cellule pour leur énergie positive et leur enthousiasme.

Merci à Sophie DURAND pour sa compagnie et ses nombreux conseils. Merci à Karinne POUPONNEAU qui a résolu bons nombres de problèmes techniques avec les explications en prime.

Je remercie les stagiaires, doctorants et post-doctorants pour leur présence, leur gentillesse et leur humour qui ont permis de travailler dans une ambiance agréable.

Enfin, merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation et mon intégration, par leur conseil ou tout simplement par leur sympathie.

MERCI à tous pour votre chaleureux accueil.



SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	2
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES	3
INTRODUCTION	4
I-1. Présentation du laboratoire	4
I-2. Présentation du sujet.....	5
I-3. Présentation du plan d'action	8
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	9
II-1. Mise au point d'une méthode de mesure par GC-MS/MS.....	9
II-1-a. Application de la méthode existante sur standards	9
II-1-b. Ajustement de la méthode d'acquisition aux composés cibles	10
II-1-c. Déivation des composés d'intérêt	10
II-2. Mise au point d'une méthode de mesure par UHPLC-MS/MS	12
II-2-a. Paramètres optimisés d'ionisation et de détection	12
II-2-b. Détection et séparation des octylphénols éthoxylés.....	13
II-2-c. Choix des conditions de détection et de séparation des alkylphénols	15
III-3. Développement de la procédure de préparation de l'échantillon.....	17
III-3-a. Principe général de l'extraction sur phase solide, SPE	17
III-3-b. Test de l'efficacité d'extraction sur standards.....	17
III-3-c. Test de l'efficacité d'extraction sur matrice.....	19
CONCLUSION.....	21
PARTIE EXPÉRIMENTALE	22
BIBLIOGRAPHIE	23
ANNEXES.....	24

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES

4-NP	4-para-nonylphénol ramifié
4-n-NP	4-para-nonylphénol linéaire
4-t-OP	4-para-tertiaire-octylphénol
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
API	Ionisation à pression atmosphérique
APPI	Ionisation en phase gazeuse à pression atmosphérique
APs	Alkylphénols
APnEOs	Alkylphénols mono-polyéthoxylés (n= degré d'éthoxylation)
CE	Commission européenne
DCE	Directive Cadre de l'Eau
ESI	Ionisation par électronébuliseur
EtOAc	Acétate d'éthyle
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IC	Ionisation chimique
IP	Point d'identification
LC/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LLE	Extraction liquide-liquide
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
NPs	Nonylphénols
NPnEOs	Nonylphénols éthoxylates
ME	Effet de matrice
MIP	Polymères à empreinte moléculaire
MRM	Multiple reaction monitoring
MS/MS ou MS ²	Spectrométrie de masse en tandem
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
OPs	Octylphénols
OPnEOs	Octylphénols éthoxylates
PM	Phase mobile
PS	Phase stationnaire
PVP-DVB	Copolymère de N-vinylpyrrolidine et m-divinylbenzène
QqQ	Analyseur triple quadrupôle
SBSE	Extraction sur phase solide supporté par un barreau d'agitation
SPE	Extraction sur phase solide
SPME	Microextraction sur phase solide
SRM	Selected reaction monitoring (Suivi de transitions)
S/N	Signal/Noise (Rapport signal sur bruit)
t _R	Temps de rétention
TIC	Total Ion Chromatogram (Chromatogramme d'ions total)
UHPLC	Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance

INTRODUCTION

I-1. Présentation du laboratoire



Le Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) est une unité de recherche de l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique (ONIRIS), dépendant du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, placé sous la tutelle de la Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche (DGER) et de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, département AlimH). Il est par ailleurs le Laboratoire National de Référence (LNR) de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) en ce qui concerne l'analyse des dioxines, des polychlorobiphenyls « dioxin-like », des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des promoteurs de croissance (dont les hormones stéroïdes) en élevage.

Du point de vue scientifique, le domaine d'activité général du laboratoire est celui de la sécurité de l'aliment, et plus précisément celui de l'étude des résidus et contaminants chimiques présents au sein de la chaîne alimentaire, dans une démarche globale d'appréciation du risque depuis l'agrofourniture jusqu'à l'homme et sa descendance. Du point de vue analytique, les deux principaux domaines de compétence et de reconnaissance du LABERCA sont d'une part le traitement des échantillons biologiques complexes en vue de l'isolement des substances étudiées présentes au sein de ces matrices à l'état de trace, et d'autre part la mesure fine de ces composés par diverses techniques et couplages basés sur la spectrométrie de masse. Le parc instrumental du laboratoire compte parmi les plus remarquables en Europe dans le domaine de la spectrométrie de masse. Celui-ci regroupe ainsi des couplages de type GC-MS (simple quadripôle), GC-MS² et LC-MS² (triple quadripôle), GC-HRMS (secteur électromagnétique), GC-C-IRMS et LC-HRMSⁿ (trappe ionique linéaire-Orbitrap™). L'ensemble des activités du laboratoire est conduit sous un système de management de la qualité associant une accréditation selon le référentiel ISO 17025 et une certification (portée flexible de niveau 3) selon le référentiel ISO 9001:2008 pour la conception, conduite et valorisation de projets de recherche.

Le LABERCA comprend deux unités d'essais : l'unité « promoteur de croissance » (UPC) et l'unité « contaminants » (UCO), appuyées par une cellule d'appui technique et innovation (ATI). C'est au sein de cette dernière que mon stage a été réalisé. La cellule ATI prend en charge des travaux de développement analytique, de validation de méthode ou/et de résolution de points critiques liés à la chimie analytique. Elle doit respecter les exigences générales du système de management de la qualité du laboratoire et les exigences particulières des contrats ou projets auxquels elle participe.

Un schéma simplifié de l'organisation du laboratoire est présenté en Annexe 1.

INTRODUCTION

I-2. Présentation du sujet

De nombreux composés chimiques synthétiques sont utilisés dans le domaine industriel. Cette utilisation massive a pour conséquence directe l'exposition de l'Homme à ces composés. Or, certains d'entre eux se révèlent être toxiques non seulement pour l'environnement où ils sont présents de manière ubiquitaire mais également pour les animaux et les êtres humains, du fait de leur caractère bioaccumulable. On retrouve parmi ces composés les alkylphénols.

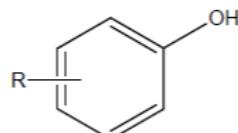


FIGURE 1 : STRUCTURE GÉNÉRALE D'UN ALKYLPHENOL

Le terme "alkylphénols" désigne des composés phénoliques substitués en différentes positions par une ou plusieurs chaînes carbonées. Ils sont obtenus par réaction catalysée entre un phénol et un mélange de nonénols [1]. Parmi les différentes familles constituants les alkylphénols, les nonylphénols ($R = C_9H_{19}$), octylphénols (C_8H_{17}) et leurs dérivés éthoxylés sont les molécules les plus fréquemment étudiées et rapportées dans la littérature, de part leur large utilisation au niveau mondial (Annexe 2) et leur application dans divers secteurs (Annexe 3). Celle-ci est justifiée par les propriétés amphiphiles et le faible coût de production de ces composés. Ils sont alors utilisés comme principaux surfactants non-ioniques et dans la formulation des détergents et désinfectants industriels, domestiques et médicaux entre autres [2]. Cette utilisation est aujourd'hui restreinte du fait de leur toxicité avérée qui a fait l'objet de nombreuses études, de réglementations et plus récemment une proposition de loi visant leur interdiction [2]. Ils sont en effet, classés dans la catégorie des perturbateurs endocriniens. Certaines études les désignent comme étant aussi des neurotoxiques pouvant provoquer une détérioration de l'ADN dans les lymphocytes humains [3,4]. De plus, leurs propriétés physico-chimiques favorisent la persistance dans l'environnement et l'accumulation dans les corps gras [5].

La **persistance** est une propriété des composés organiques ou inorganiques. Elle désigne leur capacité à perdurer dans l'environnement sans être altéré, par des processus physiques, chimiques ou biologiques consécutifs à leur introduction. Elle est appréciée par une grandeur nommée temps de demi-vie, $T_{1/2}$. Il s'agit du temps nécessaire à la décomposition de la moitié des composés introduits. Plus $T_{1/2}$ est élevé, plus le composé est persistant. En d'autres termes, la persistance est synonyme de stabilité dans l'environnement. Ainsi, les molécules non ou lentement biodégradables sont dites persistantes. Un **perturbateur endocrinien** est un composé capable de se fixer sur les récepteurs hormonaux grâce à son analogie structurale (Figure 2) avec les hormones. Ils vont alors entrer en compétition avec ces dernières ce qui peut engendrer de nombreux troubles hormonaux et reproductifs. L'hormone impliquée ici est la 17β -oestradiol, ce qui fait des alkylphénols des composés dits "xénoestrogènes". Les alkylphénols sont donc des xénobiotiques dont l'origine est anthropogénique: ils ne sont pas présents naturellement dans l'environnement mais sont synthétisés et libérés dans les stations d'épuration en absence de traitements appropriés. Dans ces stations, la plus grande partie des APs est issue de la biotransformation des APEOs et de la photolyse qui a lieu dans l'eau (Annexe 4).

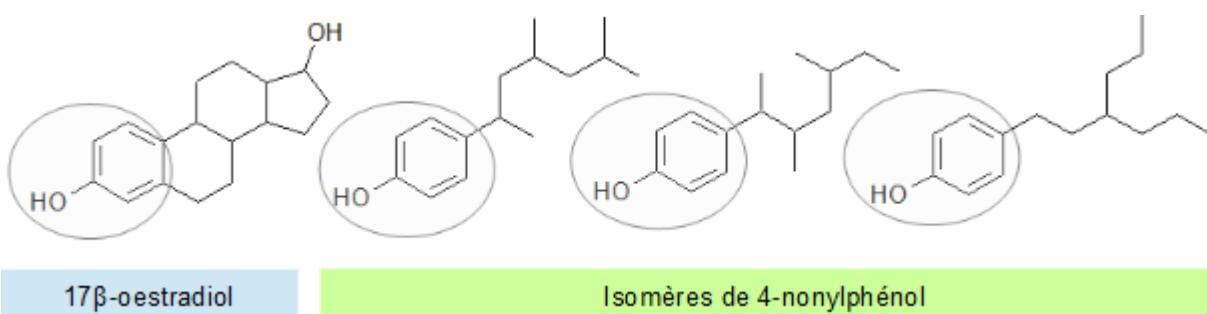


FIGURE 2: MISE EN ÉVIDENCE DE LA SIMILITUDE STRUCTURALE EXISTANT ENTRE L'OESTRADIOL ET LES AP

Depuis la découverte de leurs effets néfastes [6] même à l'état de trace, des méthodes d'analyse permettant leur dosage ont été développées. Ce dosage est un enjeu majeur pour la détermination précise de leur occurrence dans de nombreuses matrices. Néanmoins, les données d'imprégnation publiées dans les matrices biologiques telles que le sang et le lait maternel demeurent encore peu abondantes, bien que nécessaires à l'établissement de données d'exposition humaine. Par ailleurs, leur dosage représente un challenge analytique réel compte tenu de la complexité des matrices cibles et des faibles niveaux de concentration à atteindre. Ainsi, la mise au point d'une méthode analytique performante et robuste nécessite la mise en œuvre d'étapes de traitements de l'échantillon plus ou moins complexes. Les méthodes d'analyse couplant séparation par chromatographie (en phase gazeuse ou liquide) et détection par spectrométrie de masse sont à ce jour les plus couramment utilisées eu égard aux performances obtenues.

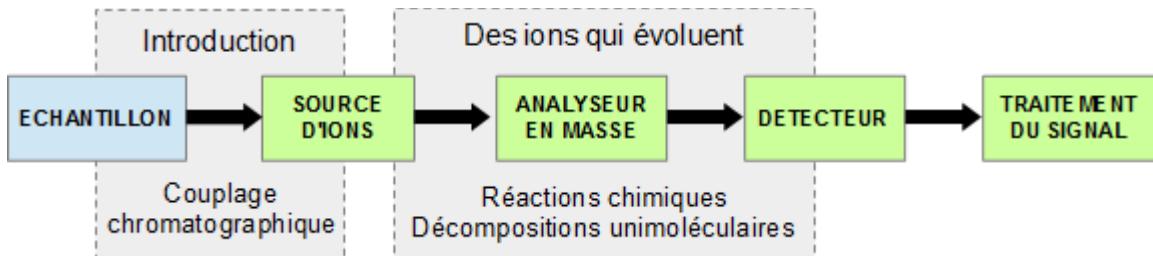


FIGURE 3: VUE SCHÉMATIQUE DU DISPOSITIF GÉNÉRAL D'UN COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE -SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La **chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse** (Figure 4) est la méthode de référence pour la mesure des alkylphénols en raison de sa robustesse. L'ionisation électronique est le mode d'ionisation le plus fréquemment utilisé. Toutefois l'ionisation chimique négative avec le méthane comme gaz réactant s'est montrée être plus sensible avec une limite de détection 5 fois plus faible pour les NPs. Moins utilisé que l'impact électronique, cette ionisation est souvent mise en œuvre lorsque l'ion moléculaire est faible voire absent [7]. En ce qui concerne le type de colonne employée, les colonnes apolaires DB5-MS sont les plus rapportées dans la littérature. L'analyse peut s'effectuer sans dérivation préalable mais elle est alors limitée aux NPs, OPs, et AP₁₋₃EO. Les AP_nEO avec $n > 3$ peuvent être analysés uniquement en incluant l'étape de dérivation [8] afin d'accroître leur volatilité et/ou leur stabilité, en utilisant du BSTFA comme agent de dérivation par exemple [9]. Or, cette étape supplémentaire est un des principaux inconvénients de l'étude par GC-MS compte tenu de son temps de réalisation et des potentiels risques de contamination associés [10]. Par conséquent, beaucoup d'études ont privilégié la chromatographie liquide.

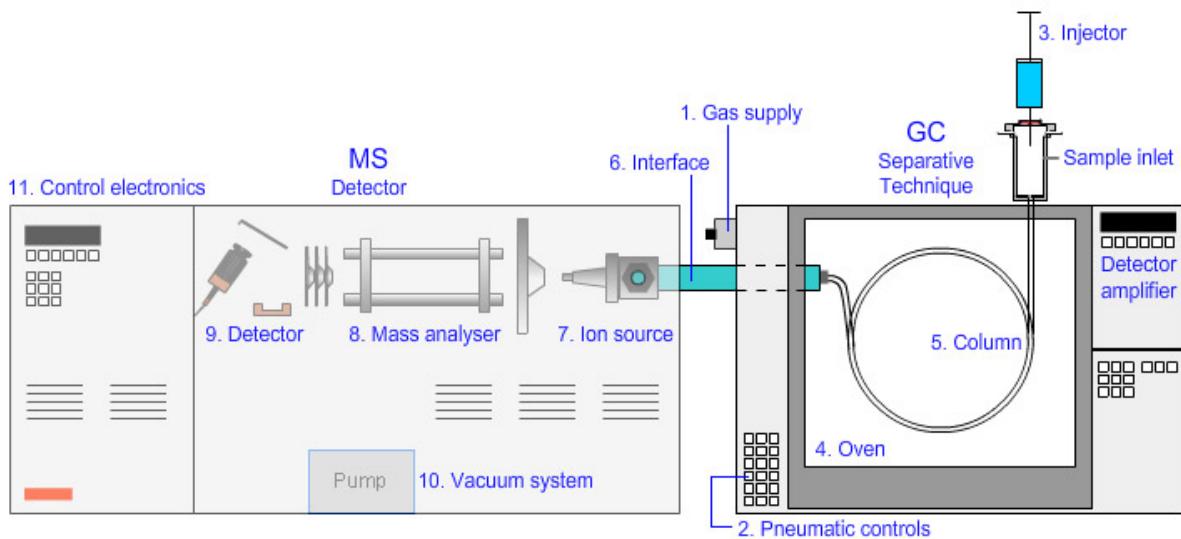


FIGURE 4 : SCHÉMA GÉNÉRAL DU DISPOSITIF DE COUPLAGE GC-MS (<http://www.chromacademy.com/>)

La **chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem** est appréciée pour sa sensibilité et sa meilleure sélectivité. La chromatographie liquide ultra haute performance, UHPLC, est quant à elle, de plus en plus employée [11, 12]. Elle se différencie de la HPLC classique par l'utilisation de colonnes plus courtes et de diamètres plus petits, ce qui a pour conséquence la diminution du temps d'analyse, et la possibilité de générer des pressions plus élevées (dépassant les 400 bars). La « qualité » de l'analyse dépend de plusieurs

paramètres dont les principaux sont : la géométrie de la source et le mode d'ionisation, la composition de la phase mobile, le choix de la phase stationnaire et le type d'analyseur.

- Mode d'ionisation:

L'ionisation à pression atmosphérique (API) comprend trois sources : ESI, APCI et APPI. L'ionisation par électrobulles (ESI) est la plus utilisée. Toutefois, elle peut engendrer des difficultés lors de la quantification à cause des « effets de matrice ». En effet, lorsque des composés interférents présents dans la matrice co-éluent au niveau chromatographique avec les analytes, la réponse peut être affectée en spectrométrie de masse. Deux phénomènes peuvent être observés : une atténuation ou un renforcement de la réponse. Le signal n'est alors plus reproductible. Cet effet de matrice (ME) est généralement moins important avec une ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Entre autres hypothèses, ceci a été expliqué par la compétition pour la charge et le fait que l'ionisation se passe en phase gazeuse [13, 14]. Les APs sont ionisés en mode négatif et les APEOs le sont en mode positif. En mode négatif l'ESI est environ 30 à 50 fois plus sensible que l'APCI du fait d'un meilleur rapport signal/bruit [7], tandis qu'en mode positif la sensibilité observée est équivalente [8]. L'ajout de sels d'ammonium (NH_4OH , NH_4Ac , $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$, tampon formiate d'ammonium) ou d'acide formique permet d'augmenter la conductivité.

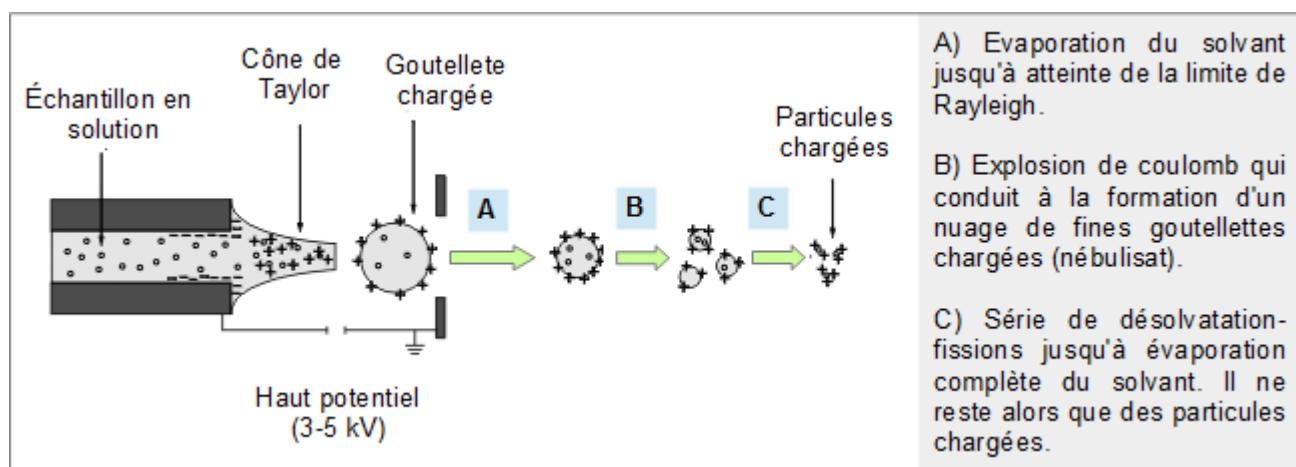


FIGURE 5: ÉVÈNEMENTS CONDUISANT A LA FORMATION D'IONS LORS DE L'ELECTROBULLES

- Type d'analyseur:

Les spectromètres de masse en tandem utilisent des analyseurs de type triple quadripolaires (QqQ). Cela est nécessaire lorsqu'il s'agit de matrices complexes, afin d'améliorer la sélectivité et permettre une détermination non ambiguë des composés. Ce type d'analyseur est très efficace pour une analyse ciblée en mode SRM [11]. Des critères d'identification des analytes cibles ont été établis dans les matrices alimentaires et environnementales par la Commission européenne dans la décision 2002/657/EC [15]. Ils sont basés sur des points d'identification (IP) qui permettent d'éviter les risques de résultats de type « faux positif ».

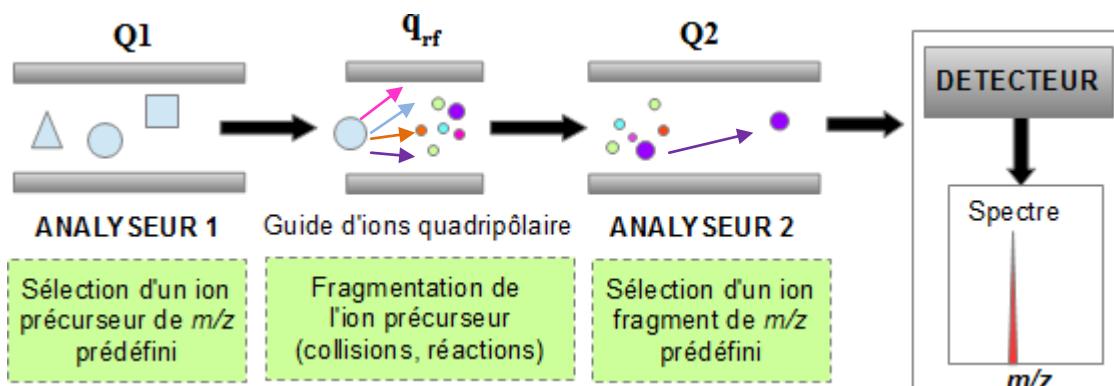


FIGURE 6: VUE SCHÉMATIQUE DU PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN ANALYSEUR TRIPLE QUADRIPOLES

INTRODUCTION

I-3. Présentation du plan d'action

Seize molécules ont été sélectionnées parmi une liste de soixante-douze composés dont les solutions standards sont commercialement disponibles. Celles-ci ont été choisies de sorte à couvrir un large spectre d'alkylphénols, comprenant les molécules les plus utilisées au niveau industriel (nonyl- et octylphénols, phénylphénol, 4-nitrophénol) et un nombre significatif de potentielles molécules alternatives. Ainsi, les molécules d'intérêt diffèrent par la longueur, la linéarité ou la ramifications de la chaîne alkyle ou encore le degré d'éthoxylation dans le cas des dérivés éthoxylés. Figure ci-après les molécules apparaissant fréquemment dans la littérature. La liste complète est en Annexe 5.

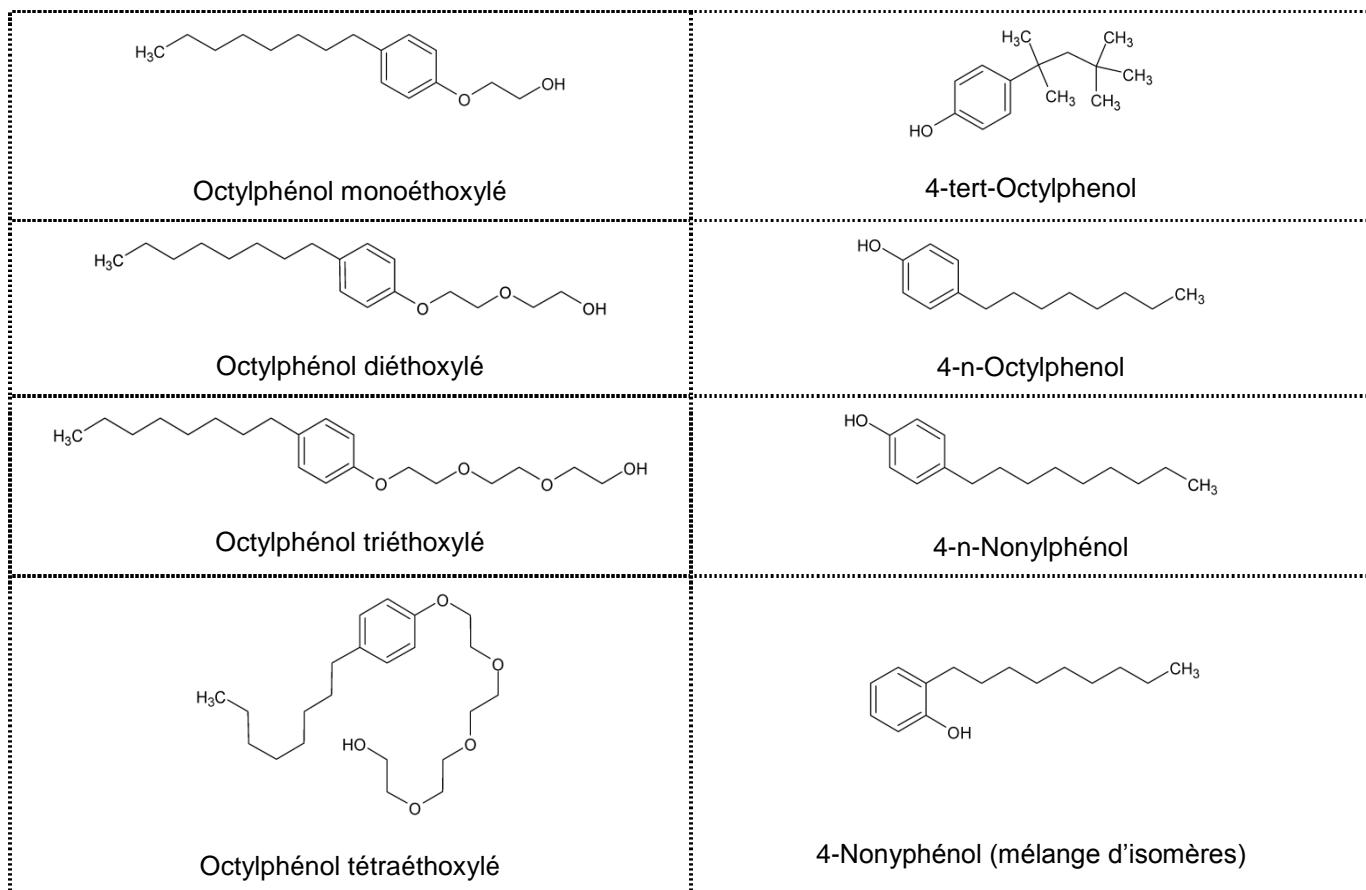


FIGURE 7: STRUCTURE DES COMPOSÉS D'INTÉRÊT LES PLUS CITES DANS LA LITTÉRATURE

L'objectif de ce stage est de proposer une méthode de mesure robuste permettant de quantifier les alkylphénols et leurs dérivés éthoxylés, tout en assurant la maîtrise de la contamination analytique rencontrée pour ce type de contaminants ubiquitaires. Cet objectif a été fragmenté en 5 étapes :

Étape 1	Effectuer une revue de la littérature sur les composés cibles, en commençant par le nonyl et l'octylphénol puis par les éthoxylates.
Étape 2	Réaliser un travail méthodologique exploratoire visant à examiner et à déterminer la(s) technique(s) d'extraction la(les) plus adaptée(s) aux alkylphénols ciblés.
Étape 3	Développer les méthodes quantitatives ad hoc pour les composés ciblés.
Étape 4	Mettre en œuvre la méthodologie développée et réaliser des premiers tests de robustesse qui permettront de vérifier les performances quantitatives de l'analyse.
Étape 5	Appliquer ces méthodes à un premier relevé d'occurrence dans une sélection d'échantillons de sérum et lait maternel.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

II-1. Mise au point d'une méthode de mesure par GC-MS/MS

Afin de développer une méthode analytique dédiée aux composés sélectionnés, je me suis appuyée sur des travaux réalisés lors d'un précédent projet interne portant sur les alkylphénols. Ainsi, je disposais pour chaque molécule, de deux à quatre transitions diagnostiques et des énergies de collisions optimales associées. Ces informations sont présentées en Annexe 6. Les conditions mises en œuvre sont décrites dans la partie "Partie expérimentale".

II-1-a. Application de la méthode existante sur standards

J'ai procédé à l'injection de 2 μ L d'un mélange de standards comportant 0,1 ng/ μ L de chaque AP et 1 ng/ μ L de chaque OPEO soit respectivement 0,2 et 2 ng. Les temps de rétention ont ensuite été attribués à chaque composé à l'aide des transitions diagnostiques. Selon les critères d'identification imposés par la décision européenne 2002/657/EC, un minimum de deux transitions est nécessaire pour garantir une identification non ambiguë d'une molécule.

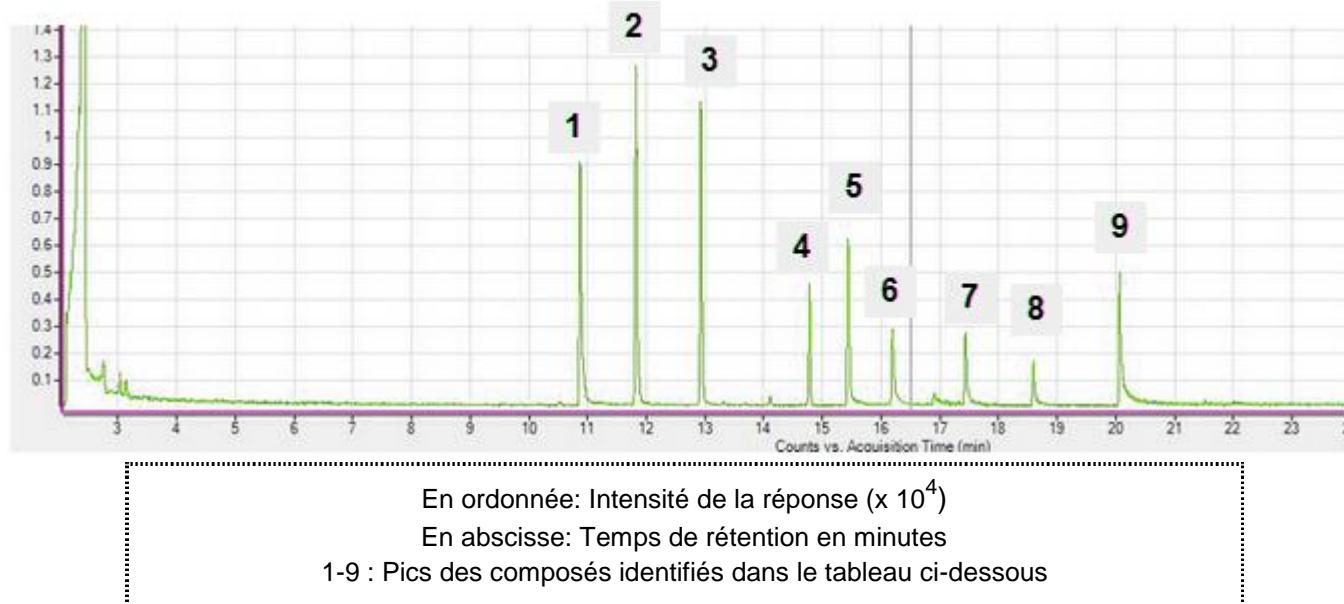


FIGURE 8: CHROMATOGRAMME ISSU DE L'INJECTION DU MÉLANGE DE STANDARD

N°	tr (min)	Référence interne	Nom du composé	C_x	Nombre de transitions observées / nombre de transitions programmées
1	10.872	026N-I	3-tert-butylphénol	C4	3/4
2	11.826	035N-I	2-tert-butyl-4-méthylphénol	C5	4/4
3	12.927	048N-I	2-tert-butyl-4-éthylphénol	C6	4/4
4	14.781	067N-I	2,6-di-tert-butyl-4-éthylphénol	C10	4/4
5	15.444	003N-I	4-tert-octylphénol	C8	4/4
6	16.194	053N-I	4-n-heptylphénol	C7	2/2
7	17.438	105X-II	4-n-octylphénol	C8	3/4
8	18.600	016N-I	4-n-nonylphénol	C9	2/3
9	20.063	007N-I	Octylphénol monoéthoxylé	C8	2/3

TABLEAU 1 : IDENTIFICATION DES NEUFS MOLECULES DÉTECTÉES

Sur 16 composés seulement 9 ont été détectés ($S/N > 3$). Cela peut être dû au fait d'une quantité injectée insuffisante ($Q_{\text{injecté}} < \text{LOD}$).

II-1-b. Ajustement de la méthode d'acquisition aux composés cibles

Afin de confirmer cette hypothèse j'ai injecté 2 μL de solution contenant 50 ng de chaque analyte. C'est alors treize composés qui ont été détectés, au lieu de neuf. Parmi les treize molécules, cinq n'ont pas pu être identifiées de manière non ambiguë du fait d'un nombre de transition observé insuffisant ou d'une quantité injectée inférieure à la limite de détection. Il s'agit du mélange de 4-NP, du 4-n-dodecyl-o-cresol, d'OP3EO, d'OP4EO et du 4-nitrophénol. J'ai résolu ce problème en injectant individuellement chacun de ces composés avec des quantités croissantes, ce qui a permis deux choses : la première est la détermination de leur temps de rétention et la deuxième est l'évaluation de leur limite de détection. J'ai alors procédé à l'injection d'un mélange contenant chaque composé à une quantité supérieure à sa limite de détection. Une séparation nette a pu être obtenue en programmant plusieurs fenêtres d'acquisition. L'ajout de fenêtre permet un ajustement du dwell (temps en secondes durant lequel un m/z donné est suivi), ce qui a un impact direct sur le nombre de cycles par secondes, sachant que le fonctionnement de l'instrument utilisé est optimal à 4 cycles par seconde. Le chromatogramme obtenu est présenté ci-dessous. Un tableau récapitulatif des temps de rétention correspondant aux composés d'intérêt ainsi que les quantités injectées est présenté en Annexe 7.

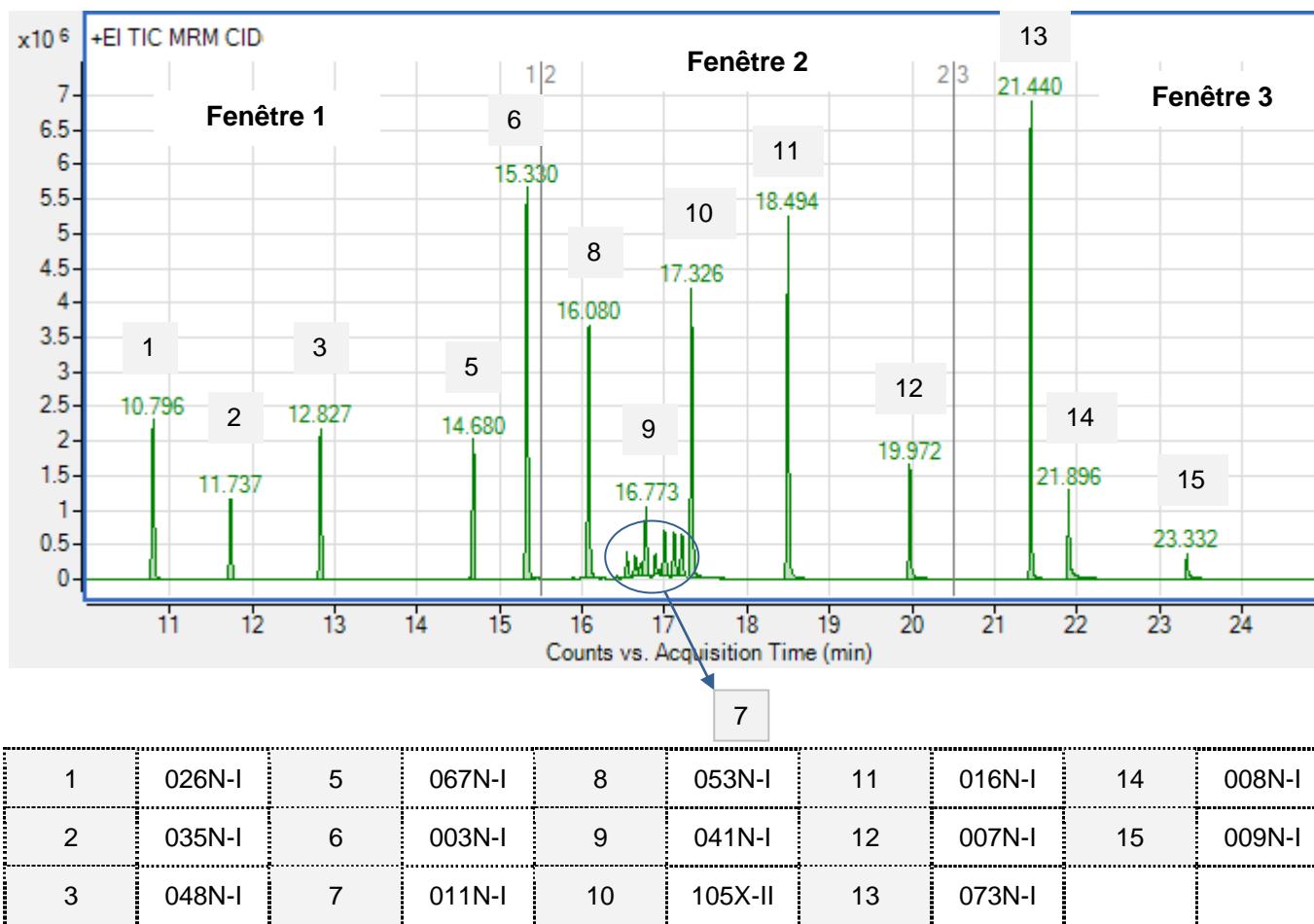


FIGURE 9: CHROMATOGRAMME D'IONS TOTAL OBTENU POUR L'INJECTION DU MÉLANGE DE 16 ANALYTES

Deux composés ne sont pas visibles, le 4-nitrophénol et OP4EO respectivement référencés 010N-I et 103X-II. Ceci peut être dû à une limite de détection en GC-EI-MS² trop élevée, une volatilité insuffisante ou une instabilité thermique. Je peux valider une de ces hypothèses par injection des composés cibles préalablement dérivés.

II-1-c. Dérivation des composés d'intérêt

La dérivation consiste ici en une réaction de silylation de l'alkylphénol ou du dérivé éthoxylé considéré. Elle met en jeu l'attaque du groupement silylé du MSTFA par l'oxygène du phénol ou de l'alcool tel que :

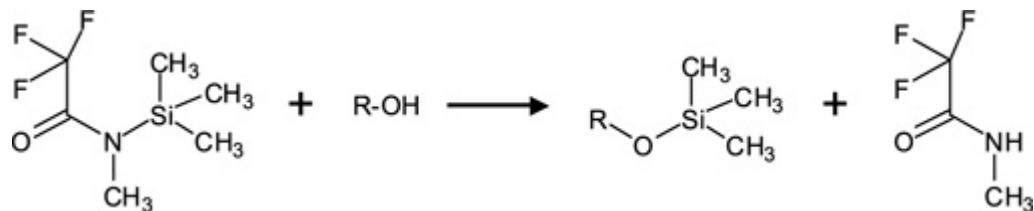


FIGURE 10: REACTION GENERALE DE SILYLATION PAR LE MSTFA

Ainsi, on ajoute +72 à chaque *m/z*. Afin d'affirmer ou infirmer les hypothèses énoncées précédemment, trois composés ont été dérivés, le 4-nitrophénol et OP4EO qui ne sont pas visibles, ainsi qu'OP3EO. J'ai réalisé trois essais avec des préparations différentes afin d'obtenir une moyenne puis un facteur de dérivation (Tableau 3).

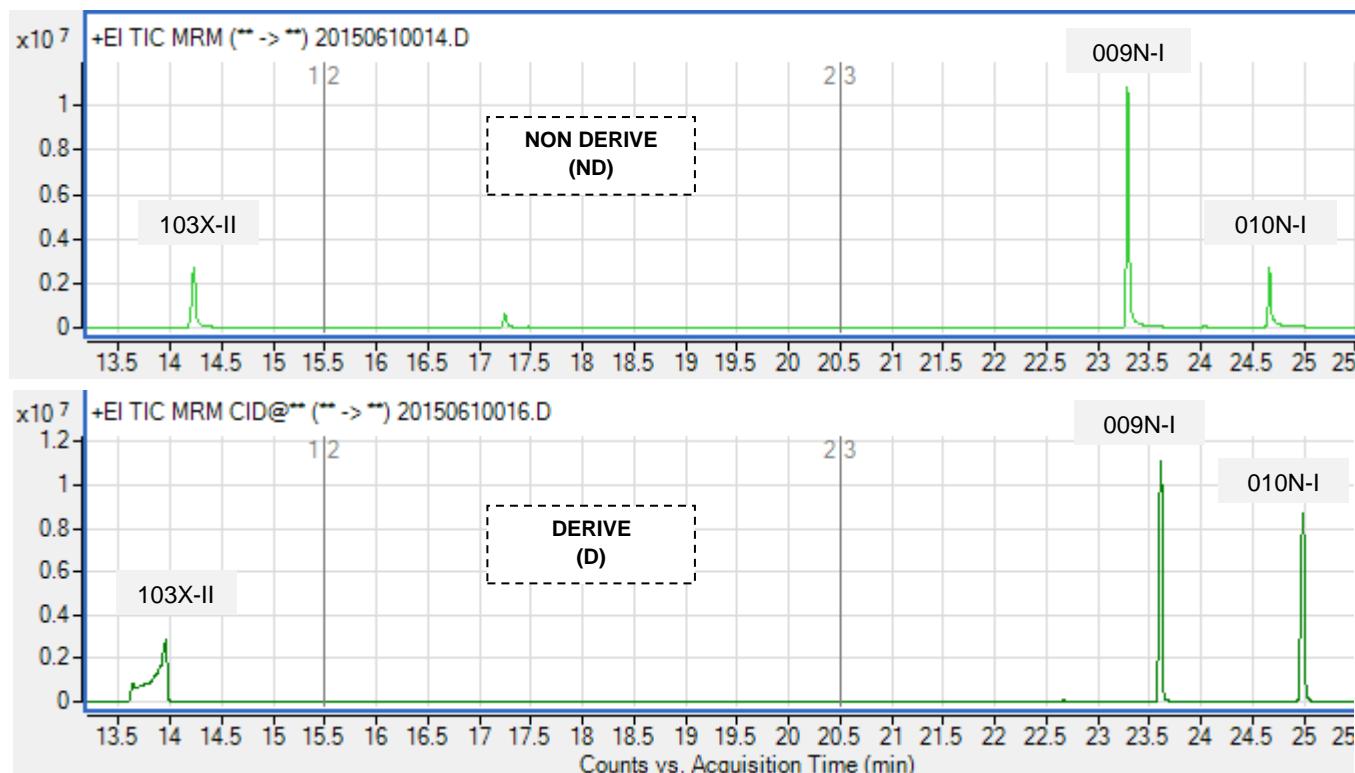


FIGURE 11 : TIC ISSU DE L'INJECTION DE 100 NG DE 103X-II, 009N-I ET 010N-I NON DERIVE OU DERIVE AVEC DU MSTFA

	Aires			Hauteurs			
	103X-II	009N-I	010N-I	103X-II	009N-I	010N-I	
Moy (ND)	5207364	13993024	3743974	Moy (ND)	1752527	6970011	1386315
Moy (D)	10949740	14958181	13558129	Moy (D)	1804000	7288713	5589034
D/ND	2.10274	1.06897	3.62132	D/ND	1.02937	1.04572	4.03158

TABLEAU 2 : AIRES ET HAUTEURS DES SIGNALS OBTENUES POUR 103X-II, 009N-I, ET 010N-I AVEC OU SANS DERIVATION

Au vu des rapports signal « dérivé » sur signal « non dérivé », la dérivation n'est significative que pour OP4EO. En effet, l'intensité du signal augmente d'un facteur compris entre 3 et 4. L'hypothèse est donc validée pour ce composé. La dérivation n'a aucun impact sur l'intensité du signal d'OP3O, mais on observe une amélioration au niveau de la forme du pic qui s'approche plus d'une gaussienne « idéale ». Enfin, le cas du 4-nitrophénol reste non résolu. Les intensités de signal obtenues avec ou sans dérivation sont équivalentes, et les pics sont larges et asymétriques. Le rapport S/N étant égal à 75, cela n'est pas dû à la présence de pics générés par le MSTFA qui co-éluent avec celui du 4-nitrophénol (Annexe 10). La seule chose qui distingue le 4-nitrophénol des autres alkylphénols étudiés est la présence d'un groupement nitro à la place d'une chaîne alkyle. Celui-ci joue peut-être sur les résultats obtenus.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

II-2. Mise au point d'une méthode de mesure par UHPLC-MS/MS

Le développement de la méthode de mesure par UHPLC-MS/MS a été réalisé en deux temps. Il a tout d'abord fallu optimiser les conditions d'ionisation, et ensuite les conditions de détection et de séparation. L'effort a été concentré sur les composés dont la sensibilité en GC-MS/MS est faible. Ainsi, j'ai conduit la plus grande partie des optimisations sur les octylphénols éthoxylés et ai ajouté par la suite les autres alkylphénols.

II-2-a. Paramètres optimisés d'ionisation et de détection

La formation d'un ion positif est plus favorable que celle d'un ion négatif dans le cas des alkylphénols éthoxylés. De plus ces derniers ont une forte affinité pour les cations tel que Na^+ et NH_4^+ [16] ce qui favorise la formation d'adduits positifs. L'ion positif se forme par protonation d'un site riche en électrons. Trois sites de protonation sont probables (Figure 10), à savoir le cycle aromatique (1), l'oxygène de la fonction éther (2) ou l'oxygène de la fonction hydroxylée. Ici elle a lieu sur l'oxygène 2 qui est plus réactif que l'aromatique et dont le cation résultant est stabilisé par mésomérie contrairement à celui issu de la protonation du site 3. L'ion négatif se forme de façon minoritaire par arrachement du proton porté par l'oxygène 3 en présence d'une base.

Ainsi, l'électronébullisation positive, ESI-(+) est le mode d'ionisation choisi. J'ai procédé aux tests de deux conditions expérimentales, la première étant l'ajout d'acide formique à 0,1 % et la seconde l'ajout de tampon ammonium à 20 mM, pH 3,7 dans les flacons d'injection. Une injection en mode infusion a montré que l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ est formé de façon majoritaire avec le tampon ammonium. C'est donc la piste qui a été privilégiée pour l'optimisation des paramètres d'acquisition à l'aide du logiciel Intellistart. Ceux-ci sont présentés en Annexe 8-a.

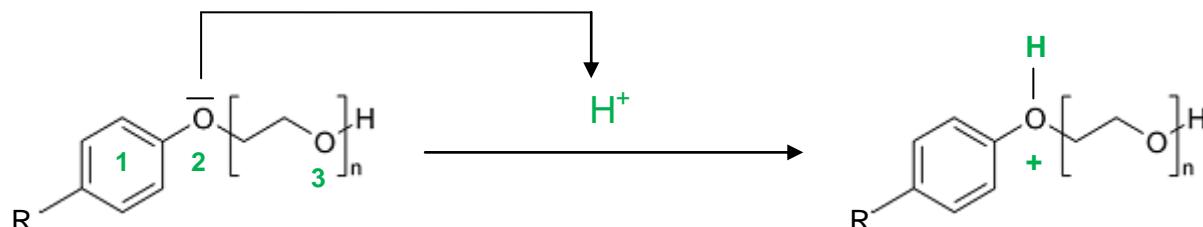


FIGURE 12 : MÉCANISME DE FORMATION DE L'ION PSEUDO-MOLÉCULAIRE

En ce qui concerne les alkylphénols, l'ionisation est conduite en mode ESI-(-) du fait de l'absence de la fonction éther et de la présence d'un proton phénolique acide. J'ai néanmoins testé l'ionisation en mode ESI-(+) dans les mêmes conditions énoncées précédemment. Il en ressort que ce mode n'est effectivement pas assez sensible vis-à-vis des APs même à de fortes concentrations. En mode négatif, l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ est obtenu à partir de l'arrachement du proton porté par le phénol. J'ai alors procédé à l'ajout d'ammoniaque dans le but de rendre le milieu plus basique ; ensuite plusieurs variables ont été testées afin de conclure sur la condition d'ionisation la plus favorable.

Conditions	initiales	1	2	3	4
Variable	-	Quantité d'AP injecté par minute	Proportion en MeOH	Concentration en NH ₃ à 32 %	Solution standard
Détail	50 ng/min 80% MeOH 20% H ₂ O + NH ₃ à 32 %	10 ng/min 80% MeOH 20% H ₂ O + NH ₃ à 32 %	50 ng/min 50% MeOH 50% H ₂ O + NH ₃ à 32 %	50 ng/min 80 % MeOH 20 % H ₂ O+ NH ₃ à 32% dilué	50 ng/min 80% MeOH 20 % H ₂ O +NH ₃ à 32 %

TABLEAU 3 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTES VARIABLES TESTEES A PARTIR DES CONDITIONS INITIALES

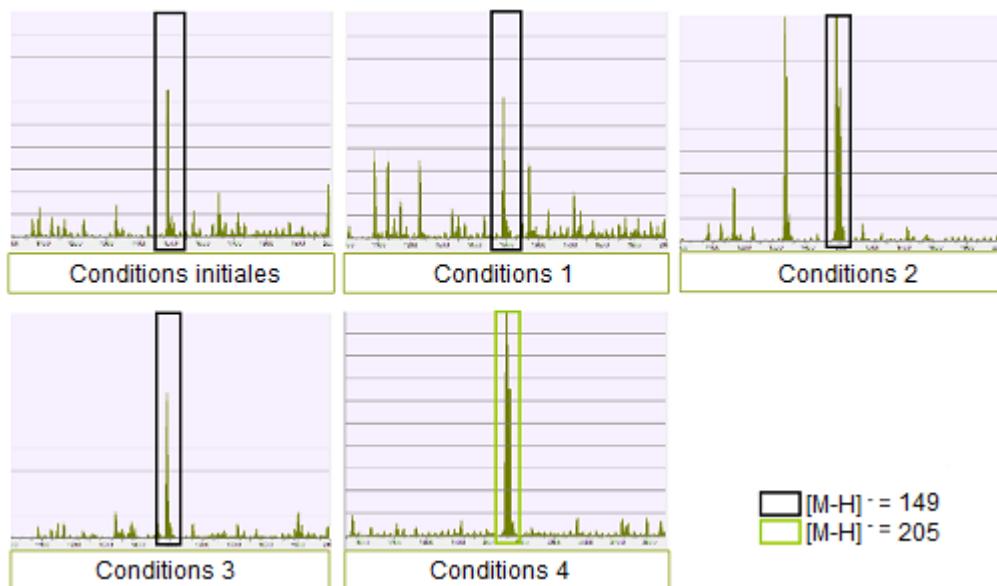


FIGURE 13: ZOOM SUR LES SPECTRES DE MASSE OBTENUS EN MODE ESI(-) DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS

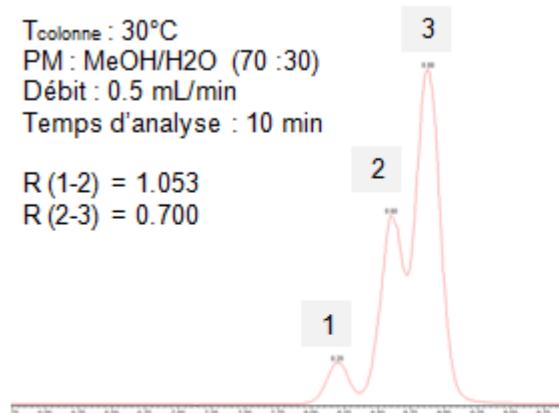
Le pic moléculaire obtenu dans les conditions 2 et 4 est le plus intense. Pour une même molécule il s'avère que les conditions 2 sont meilleures. J'ai donc choisi ces conditions pour l'obtention des paramètres d'ionisation optimisés qui sont présentés en Annexe 8-b.

II-2-b. Détection et séparation des octylphénols éthoxylés

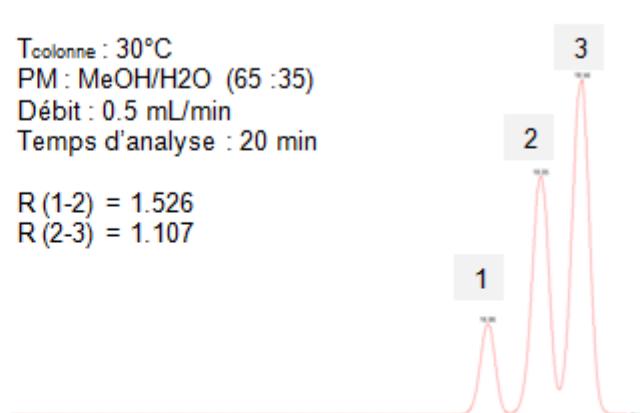
Plusieurs colonnes HPLC ont été testées, à savoir des colonnes C18, PFP, HILIC avec différentes phases mobiles, différents gradients d'élution ou en mode isocratique et à différentes températures. Jusqu'à présent je n'ai réussi à séparer les OPEOs qu'avec la colonne C18 et sans toutefois obtenir une résolution égale ou supérieure à 1,5 entre chaque composé. Les OPEOs ne diffèrent que par leur nombre d'unité éthoxylée qui varie ici de 1 à 4. Leur comportement chromatographique est alors très proche ce qui explique peut-être les difficultés rencontrées pour mener à bien leur séparation. J'ai mené toutes les acquisitions avec une colonne C18 et une PM composée de MeOH et H₂O. L'acétonitrile a été testé mais ne permet pas une séparation suffisante, résultat qui a également été obtenu par T. Takasu [17].

- Modes d'élution

L'élution en gradient conduit à la co-élution des composés, qui éluent à partir de 60% de méthanol. J'ai alors entrepris de tester une élution en régime isocratique avec un pourcentage de MeOH entourant cette valeur. Ainsi, les régimes isocratiques à 50, 60, 65, 70 et 80 % de méthanol ont été testés. J'ai ainsi pu séparer les composés avec 65 et 70% de méthanol.



	tr (min)	δ (cm)	δ (min)
1 : OP2EO	8,20	0,90	0,18
2 : OP3EO	8,60	1,00	0,20
3 : OP4EO	8,88	1,00	0,20



	tr (min)	δ (cm)	δ (min)
1 : OP2EO	16,86	0,60	0,36
2 : OP3EO	18,05	0,70	0,42
3 : OP4EO	18,98	0,70	0,42

FIGURE 14: CHROMATOGRAMMES D'ION TOTAL OBTENU AVEC 70 ET 65 % DE METHANOL, A 30°C POUR 10 NG INJECTEE

Le pic correspondant au mono-éthoxylé n'est pas visible et ce quelque soit la quantité injectée. J'en déduis que cette méthode n'est pas adaptée à OP1EO. Des résultats similaires sont observables dans la littérature avec une colonne C18, notamment par Armond et al. qui le justifie par l'absence d'ionisation des composés à $n=0$ ou 1 [18]. Plus le degré d'éthoxylation est élevé et plus le composé est retenu. On pourrait s'attendre à l'inverse puisque plus le nombre d'unité éthoxylée est important, plus le composé est hydrophile et donc moins il a d'affinité avec la phase de la colonne. Donc ici, seule la longueur de la chaîne éthoxylée joue sur la séparation. L'intensité augmente avec le degré d'éthoxylation ce qui s'explique par la présence de plus d'oxygène protonable et donc une ionisation plus efficiente. Dans l'ensemble j'obtiens une meilleure résolution avec une phase mobile comportant 65% de méthanol. Avec une résolution de $R=1,5$; l'OP2EO et l'OP3EO sont bien séparés. Ce qui n'est pas le cas d'OP3EO et OP4EO dont la résolution reste inférieur à 1,5. Cependant elle est suffisante pour effectuer une quantification en travaillant en mode SRM (Annexe 9).

- Variation de la température et du débit de la phase mobile

Le temps d'analyse est allongé avec 65% de MeOH (> 10 min). La température de la colonne et le débit de la phase mobile sont deux paramètres qui ont un impact sur le temps d'analyse. Je décide donc de les faire varier afin de réduire ce temps.

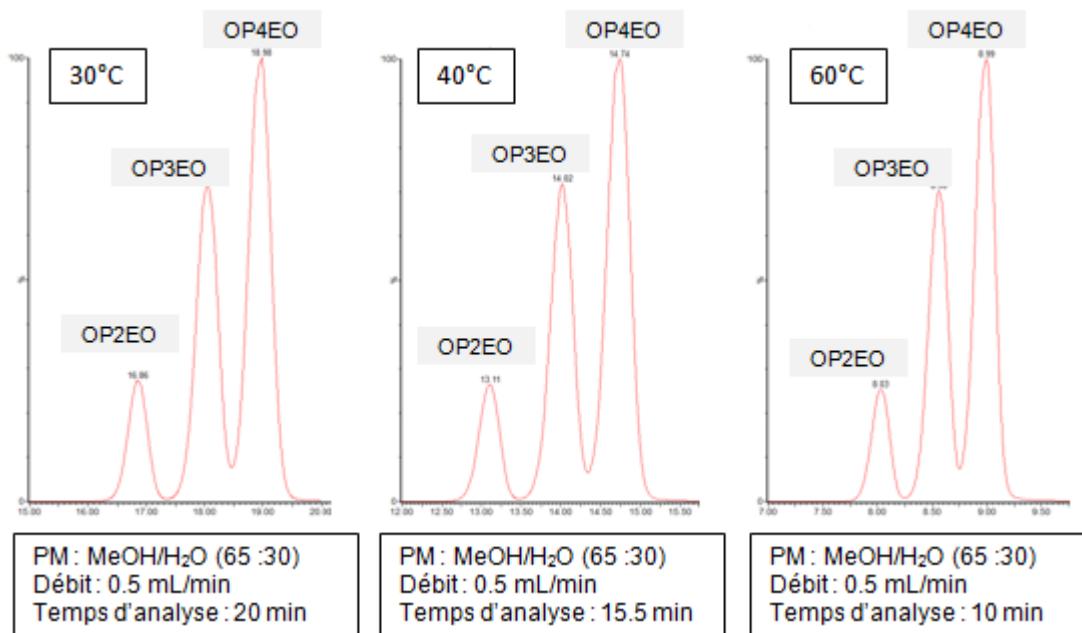


FIGURE 15: CHROMATOGRAMME OBTENUS PAR VARIATION DE LA TEMPÉRATURE DE LA COLONNE POUR 10 NG INJECTÉS

La température est inversement proportionnelle à $\ln(t_R)$. En augmentant par deux la température de la colonne, on divise par deux le temps d'analyse sans impacter de manière significative la résolution. On passe alors de 20 minutes à 30 °C à 10 minutes à 60 °C. Le reste de l'optimisation se fait alors à 60 °C en faisant varier le débit.

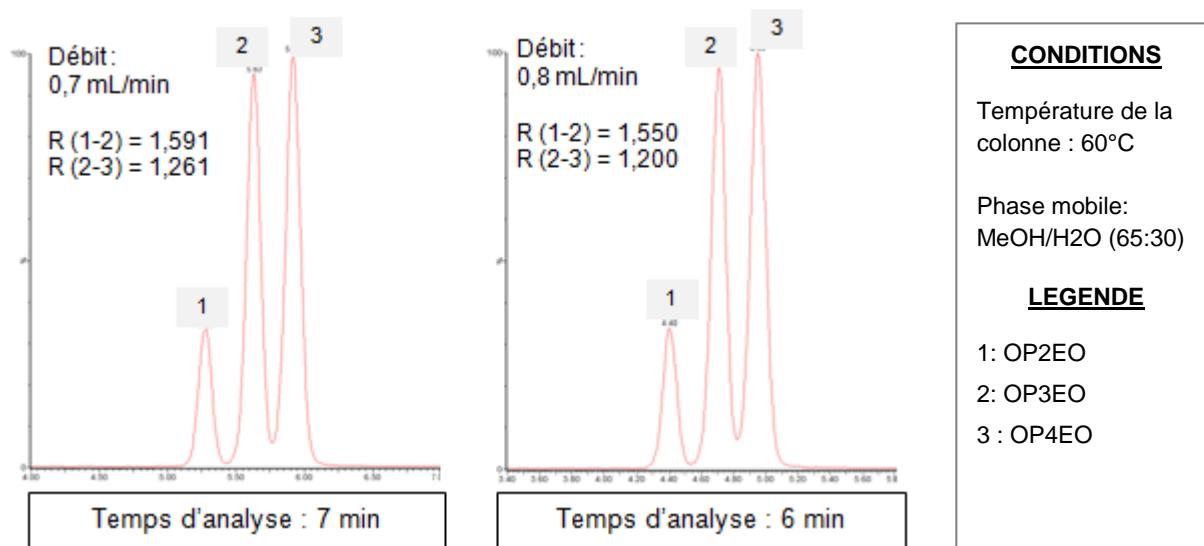


FIGURE 16: CHROMATOGRAMME OBTENUS PAR VARIATION DU DÉBIT DE LA PHASE MOBILE POUR 10 NG INJECTÉS

L'augmentation du débit m'a permise de gagner 4 à 5 minutes de temps d'analyse. De plus, la résolution en TIC s'en retrouve également augmentée.

II-2-c. Choix des conditions de détection et de séparation des alkylphénols

J'ai procédé à l'injection des alkylphénols sur colonne C18 en utilisant la même phase mobile que précédemment (MeOH/H₂O) en gradient d'élution à 60°C avec un débit de 0,5 mL/min puis 0,6 mL/min. Deux composés, (035N-I, 067N-I) n'ont pas été étudiés car je n'ai pas pu obtenir leurs paramètres d'ionisation optimisés. Au regard de leur structure, on constate que le proton phénolique est rendu moins accessible du fait de la présence de groupements encombrants à proximité. Le proton ne pouvant pas être arraché ou très difficilement, l'ion [M-H]⁻ n'est pas observable. A ce stade, ils ne peuvent donc être analysés que par GC-MS/MS.

- Premier gradient testé : de 10 à 100 % de MeOH durant 10 minutes à 60°C, et un débit de 0,6 mL/min.

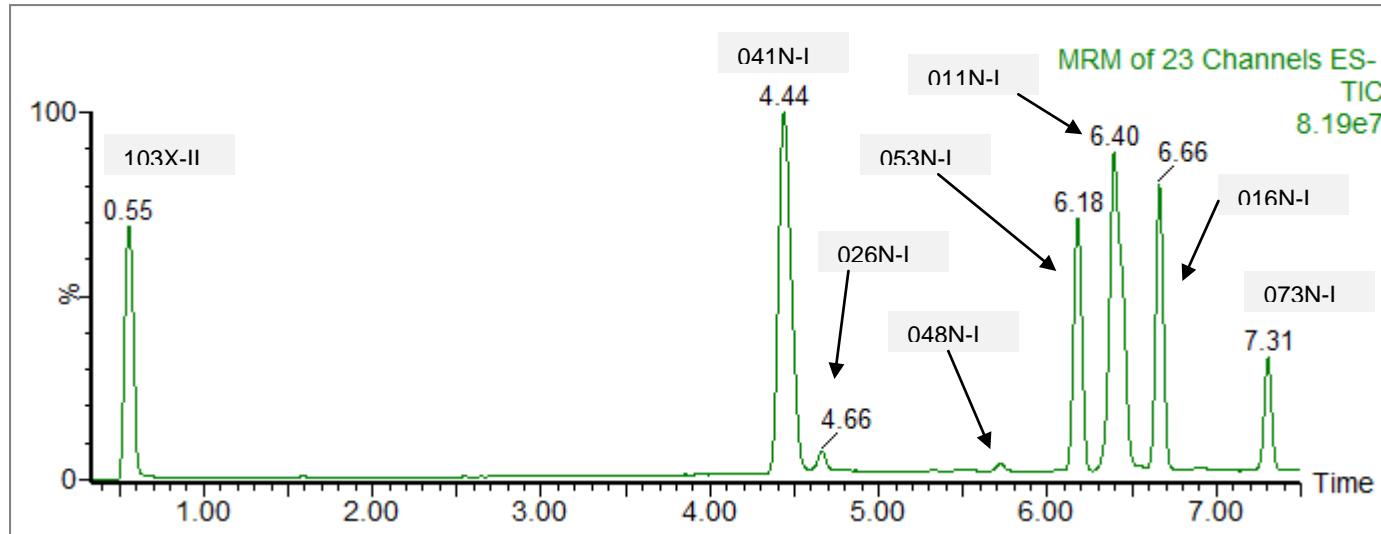


FIGURE 17 : CHROMATOGRAMME D'ION TOTAL (TIC) ISSU DE L'INJECTION DE 10 APs A 100 NG CHACUN EN MODE GRADIENT

Sur les dix composés injectés, six sont détectables avec S/N > 3 (103X-II, 041N-I, 053N-I, 011N-I, 016N-I et 073N-I), deux sont visibles en SRM (026N-I, 048N-I). Le 4-n-nonylphénol co-élue avec 011N-I à 6,40 min. L'ordre d'élution suit la longueur de la chaîne alkyle et son encombrement. Ainsi le 4-nitrophénol qui n'a pas de chaîne alkyle est le moins retenu, suivi du 4-phénylphénol et des composés à carbone quaternaire. Dans la même logique le 4-n-dodécyl-o-crésol qui a une chaîne linéaire en C12 est le composé le plus retenu.

- Second gradient testé : de 65 à 100 % MeOH durant 8 minutes à 60 °C, et un débit de 0,6 mL/min.

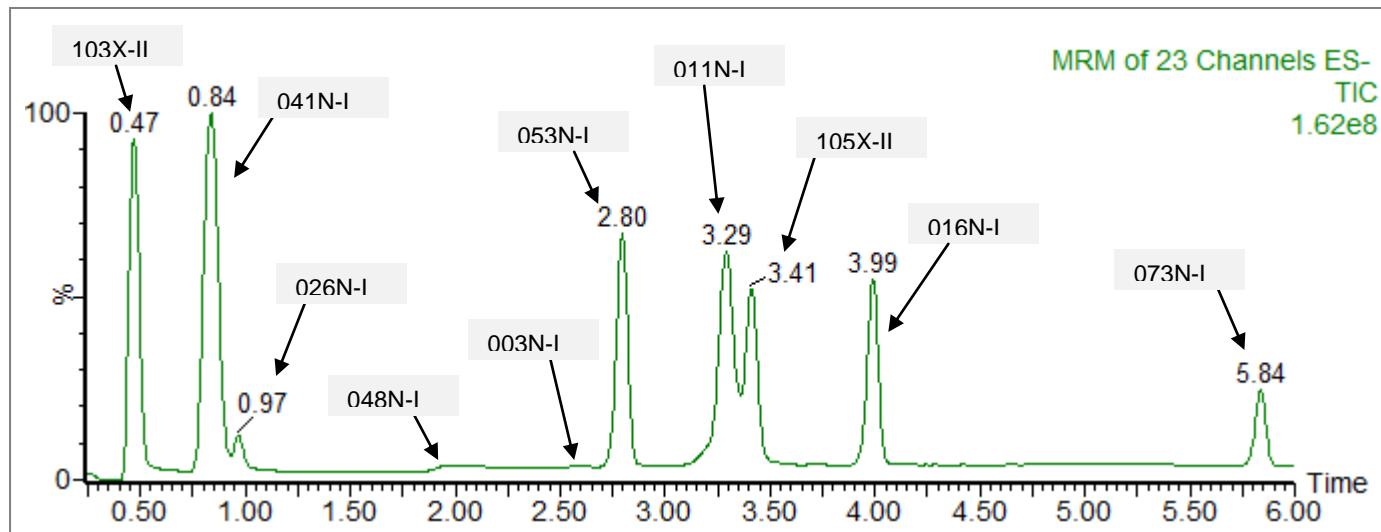


FIGURE 18 : CHROMATOGRAMME D'ION TOTAL (TIC) ISSU DE L'INJECTION DE 10 APs A 100 NG CHACUN EN MODE GRADIENT

- Dans les mêmes conditions en programmant deux fenêtres :

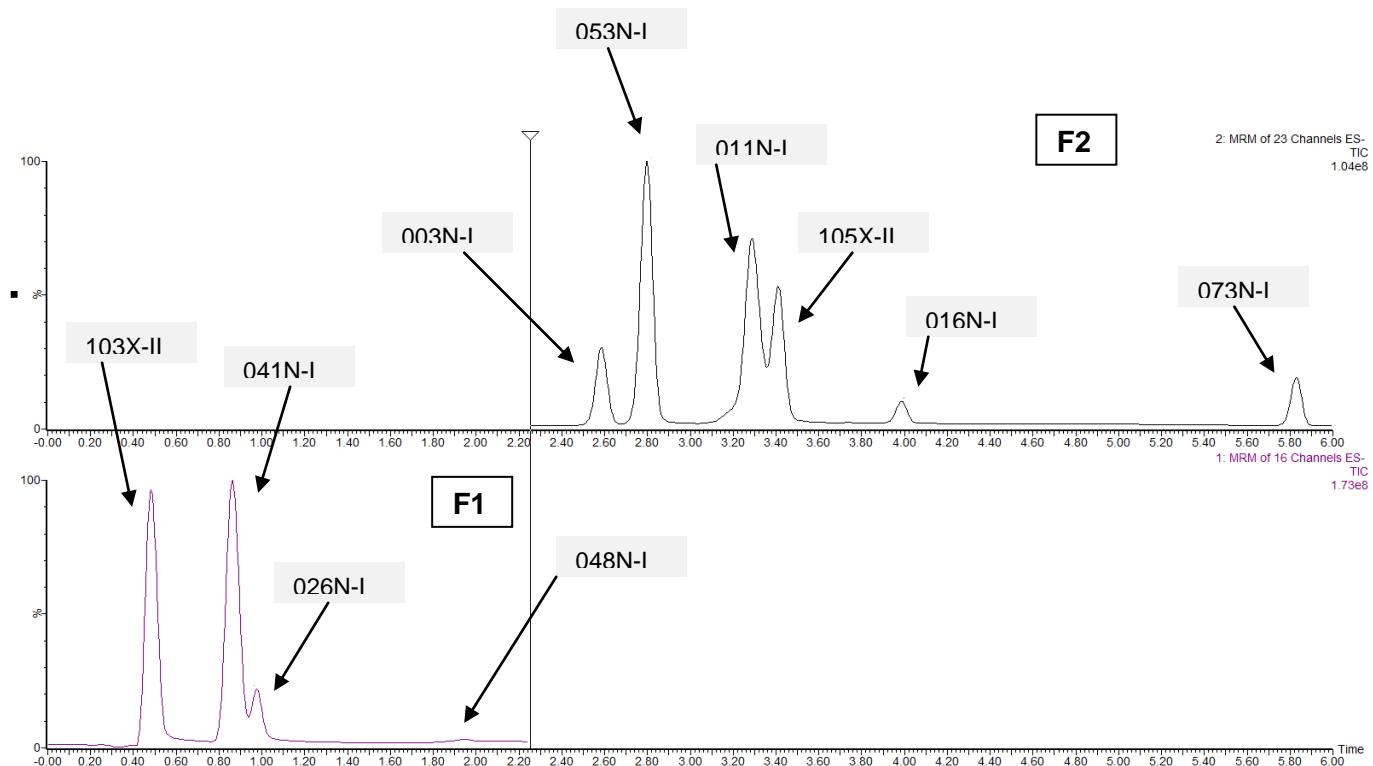


FIGURE 19 : CHROMATOGRAMME D'ION TOTAL (TIC) ISSU DE L'INJECTION DE 10 APs A 100 NG CHACUN EN MODE GRADIENT

Le passage d'un gradient commençant à 10 % à un gradient commençant à 65 % de méthanol a permis l'observation d'un début de séparation entre le 4-n-nonylphénol et le mélange d'isomères de 4-NP. Les premiers composés éluent à partir de ce pourcentage ce qui explique une élution moins tardive.

Enfin en programmant deux fenêtres, le 4-tert-octylphénol jusqu'à là non observé, est détecté. Neuf analytes sur dix sont alors détectables. L'intensité du signal dépend entre autre de l'efficacité d'ionisation. Or, le proton phénolique du 2-tert-butyl-4-éthylphénol (048N-I) est en ortho d'un groupement tert-butyl encombrant, ce qui peut expliquer la faiblesse du signal.

Le bruit observé dans les deux premiers chromatogrammes provient de l'ammoniaque qui a été introduit dans le flacon d'injection en quantité trop importante. Une injection de 2 μ L d'ammoniaque à 32 % montre effectivement une intensité de bruit significative entre 4 et 8 minutes (de l'ordre de 10^6) et plus faible à l'extérieur de cet intervalle. Il peut être diminué en diluant l'ammoniaque sans que cela impact le processus d'ionisation, ce qui a été fait pour obtenir ce dernier chromatogramme.

Comme mentionné précédemment, l'ionisation en mode électrospray positif n'ayant pas été effective pour l'octylphénol monoéthoxylé, j'envisage un essai en ionisation négative dans ces mêmes conditions.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

III-3. Développement de la procédure de préparation de l'échantillon

Deux matrices sont considérées dans le cadre de ce stage : le sérum et le lait maternel. Ce sont tous deux des liquides biologiques aqueux considérés comme des matrices complexes de par leur composition. Ils comportent en effet, de nombreux composés (ions, protéines, oses, lipides, hormones...) pouvant interférer avec l'analyse des composés d'intérêt qui sont présents en concentrations moins importantes. Cela empêche d'ailleurs toute analyse directe de l'échantillon. Il est alors nécessaire de passer par des étapes dites de préparation telles que la centrifugation, des phases d'extraction, de purification et de concentration afin de minimiser les interférences et maximiser la récupération des analytes avant l'étape proprement dite d'analyse. En outre, les APs sont biotransformés en conjugués une fois arrivés dans le sang, notamment en métabolites de phase II, par glucuronidation. Il est alors fréquent d'utiliser des enzymes ayant une activité glucuronidase et/ou sulfatase capables de cliver les groupements conjugués. Cette procédure permet ainsi la détermination de la concentration totale (AP libre + métabolites de phase II) [19].

Les méthodes dites classiques pour l'extraction des alkylphénols sont la LLE et la SPE. On peut également citer la SPME, la SBSE, et la LPME que l'on retrouve dans certaines publications scientifiques [20, 21].

III-3-a. Principe général de l'extraction sur phase solide, SPE

Le coût et la fragilité de la SPME, combiné au manque de sélectivité de la SBSE dans le cas des matrices complexes sont des éléments faisant de la SPE la méthode d'extraction privilégiée. Lors d'une extraction sur phase solide, les composés sont séparés sur la base de leur affinité avec la phase solide conditionnée et par la force des interactions mises en jeu. On parle alors d'adsorption sélective pour désigner cette séparation qui est fonction des propriétés physico-chimiques des constituants de l'échantillon. Elle repose sur quatre étapes : le conditionnement, le dépôt, le lavage et l'élation. Ces deux dernières étapes doivent être optimisées (choix des solvants, de leur proportion, de leur volume et de leur débit d'écoulement).

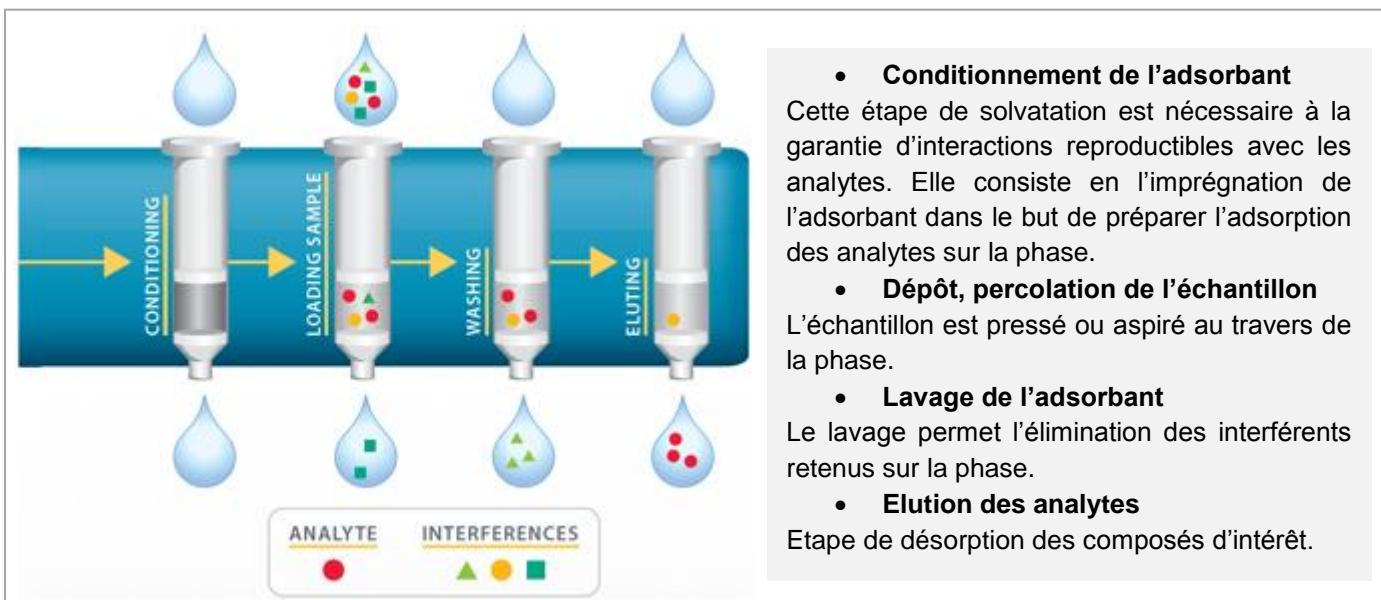


FIGURE 20: PRINCIPE GÉNÉRAL D'UNE SPE PAR RÉTENTION DES ANALYTES ET ÉLIMINATION DES INTERFÈRENT

III-3-b. Test de l'efficacité d'extraction sur standards

Les phases solides les plus communes sont à base de silice greffée ou de polymères. L'emploi d'une phase adaptée est déterminant pour l'obtention de bons taux de récupération assurés notamment par une rétention suffisante des analytes. Les alkylphénols étant amphiphiles, j'ai pu envisager plusieurs choix d'adsorbants. J'ai donc mené des tests sur quatre types de cartouches impliquant des interactions différentes avec les analytes: C₁₈, NH₂, Oasis HLB et MIP. Tous les résultats présentés ont été obtenus par GC-EI-MS².

Cartouche	Base de la phase	Type	Interactions mises en jeu
Octadécyl (C₁₈)	Silice greffée	Apolaire (phase inverse)	Forces de Van der Waals, interactions hydrophobes
Aminopropyle (NH₂)	Silice greffée	Polaire (phase normale)	Interactions polaires, liaisons hydrogène
Oasis HLB	Polymère	Mixte	Interactions hydrophiles et lipophiles
MIP phénolique	Polymère à empreinte moléculaire	Spécifique	Reconnaissance moléculaire

TABLEAU 4 : CARACTÉRISTIQUES DES CARTOUCHES SPE SÉLECTIONNÉES

J'ai effectué des extractions sur chacune des cartouches sélectionnées en ajustant des protocoles trouvés dans la littérature (Oasis HLB, NH₂, C₁₈), ou en suivant les instructions fournies par les fournisseurs (MIP, Oasis HLB). J'ai ensuite évalué l'efficacité d'extraction de chacune en fonction du protocole utilisé par calcul d'un taux de récupération (Figure 21).

$$\text{Taux de récupération} = [\text{Aire des pics après extraction} / \text{Aire des pics avant extraction}] \times 100$$

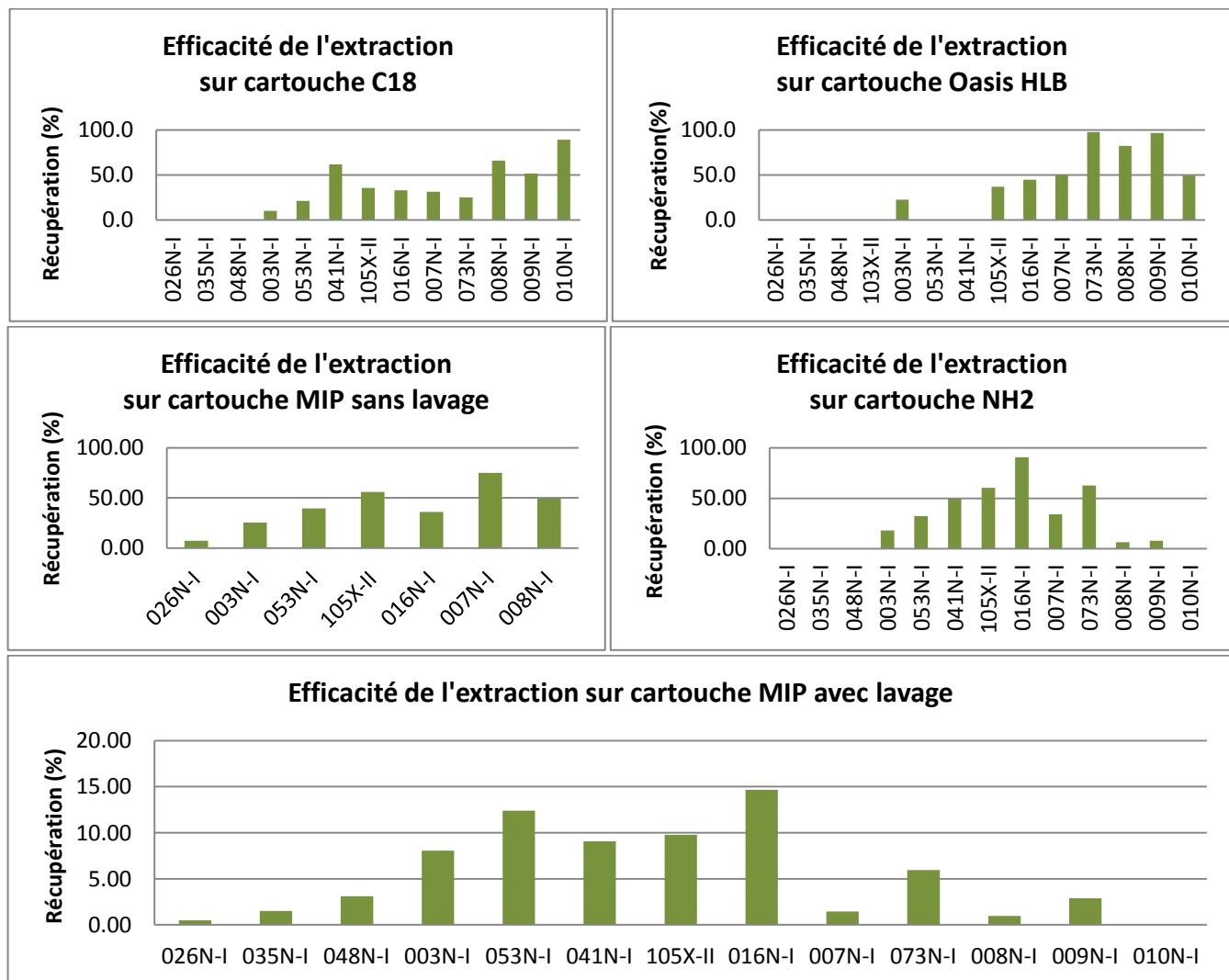


FIGURE 21 : EFFICACITÉ DE L'EXTRACTION SUR LES CARTOUCHES C18, OASIS HLB, MIP ET NH2

C'est avec les cartouches C₁₈ et NH₂ que j'ai obtenu les meilleurs taux de récupération. J'ai néanmoins poursuivi des essais avec les deux autres cartouches. La réalisation de profils d'élution a confirmé l'efficacité des cartouches octadécylique et aminopropyle. Ainsi pour ces deux cartouches j'obtiens des taux de récupération allant de 90 % à 10%. Les composés peu retenus sur cartouche C₁₈, le sont sur cartouches NH₂ et inversement. Celles-ci sont donc complémentaires. La colonne Oasis HLB employée avec le protocole du fournisseur n'est pas efficace dans le cas présent, mais celui obtenu dans la littérature donne de très bons résultats pour les APs en C7 jusqu'en C12 et les dérivés éthoxylés avec des taux de récupération allant de 96 % à 22%. Dans le cas des APs à chaîne plus courte, la récupération n'est pas significative (presque nulle). Enfin, je ne peux pas encore conclure quant à l'efficacité de l'extraction de la cartouche MIP les résultats étant très variables d'une manipulation sur l'autre, notamment du fait de problèmes techniques rencontrés.

Les résultats bruts sont présentés en Annexe 11.

Colonne SPE	Rétention des APs à courte chaîne (C4-C6)	Rétention des APs à longue chaîne (C7-C12)	Rétention des OPEOs
C18	-	X	X
NH ₂	-	X	
Oasis HLB		X	X
MIP	-	-	-

TABLEAU 5: RECAPITULATIF DE L'EFFICACITE D'EXTRACTION DES COLONNES C18, NH₂, OASIS HLB ET MIP SUR STANDARDS
L'absence de résultats est représentée par un tiret, un résultat positif par une croix et un résultat négatif par une case vide.

III-3-c. Test de l'efficacité d'extraction sur matrice

- Extraction liquide-liquide (LLE) sur sérum humain

L'extraction liquide-liquide est basée sur le partage des composés d'intérêts entre une phase organique et une phase aqueuse. Son efficacité dépend entre autre de l'affinité des analytes avec le(s) solvant(s) considéré(s). Le protocole suivi s'appuie sur celui utilisé au laboratoire pour le bisphénol A qui comme les APs est une molécule phénolique. Il consiste en une étape de précipitation des protéines, suivie d'une délipidation pour terminer avec l'extraction liquide-liquide. Un schéma simplifié résumant la démarche suivie est donnée ci-après:

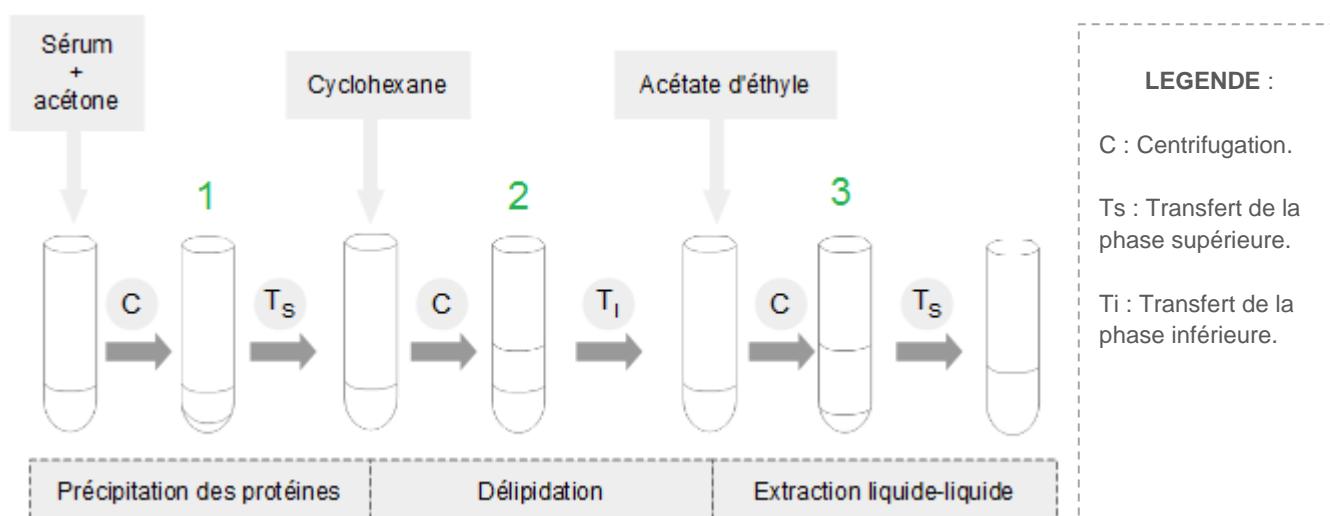


FIGURE 22 : MODE OPÉRATOIRE DE L'EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE MIS EN OEUVRE SUR SÉRUM HUMAIN

(1) Les protéines précipitent dans un milieu lorsqu'elles n'y sont plus solubles, notamment à cause d'un changement conformationnel: elles sont dites dénaturées. En milieu aqueux, les chaînes latérales hydrophiles se répartissent à la surface pour interagir avec l'eau tandis que les chaînes latérales hydrophobes sont "enfouies", ce qui facilite la solubilité des protéines. Lorsqu'on met en contact les protéines avec un solvant organique où elles ne sont pas solubles, ici l'acétone, cette organisation est perturbée, ce qui conduit à leur précipitation. Il se forme alors un agrégat blanc au fond du tube après centrifugation.

(2) Les lipides sont hydrophobes, ils ont donc plus d'affinité avec les solvants apolaires comme le cyclohexane, ce qui permet leur passage de la phase aqueuse (phase inférieure plus dense) à la phase organique (phase supérieure moins dense).

(3) Enfin l'acétate d'éthyle qui est polaire mais non miscible dans l'eau permet d'extraire les composés cibles de la phase aqueuse. Le mélange acétate d'éthyle/acétone constitue la phase supérieure organique et la phase aqueuse (phase inférieure) est éliminée.

- SPE sur sérum humain

Les tests sur matrice seront conduits en employant successivement deux cartouches afin d'extraire le maximum de composés. J'ai effectué un premier test sur chacune des cartouches pour avoir une idée de l'efficacité de l'extraction sur matrice. Des résultats plus exhaustifs doivent être obtenus afin de conclure quant à l'efficience de chacune de ces SPE. Les cartouches retenues sont la C₁₈ et la NH₂ pour les alkylphénols et l'Oasis HLB pour les octylphénols éthoxylés.

Cartouche	Conditionnement	Dépôt	Lavage	Elution
C18	3 x 3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	Echantillon dans MeOH/H ₂ O (50 :50)	3 mL H ₂ O	1,5 mL MeOH/H ₂ O (70 :30) 1,5 mL EtOAc
NH ₂	3 x 3 mL hexane 3 mL EtOAc	Echantillon dans Hex/AcEt (90 :10)	3 mL hexane	3 mL EtOAc
Oasis HLB	3 mL MTBE 3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	Echantillon dans MeOH/H ₂ O	3 mL H ₂ O	3 mL MTBE/MeOH (90:10)

TABLEAU 6: PROTOCOLES RETENUS POUR L'EXTRACTION DES APs ET OP1-4EO PRESENTS DANS LE SERUM HUMAIN

CONCLUSION

Les alkylphénols, composés chimiques synthétiques, sont des contaminants ubiquitaires retrouvés dans les stations d'épuration puis dans l'environnement où ils persistent, suite à la dégradation de leurs dérivés éthoxylés. Étudiés du fait de la toxicité avérée des nonyl- et octylphénols en tant que perturbateurs endocriniens, le but de ce stage est de développer une stratégie analytique permettant leur mesure, celle de leurs dérivés éthoxylés ainsi que celle de molécules alternatives dans les fluides biologiques. A ces fins deux méthodes couplant chromatographie et spectrométrie de masse ont été envisagées, à savoir la GC-MS/MS et l'UHPLC-MS/MS.

Parmi les seize molécules ciblées, quatorze ont pu être mesurées par GC-EI-MS/MS avec une colonne DB5-MS par injection de 50, 100 ou 200 ng sans dérivation, en 26 minutes. Une attention particulière doit être prêtée aux trois analytes les plus légers (3-tert-butylphénol, 2-tert-4-méthylphénol et 2-tert-butyl-4-éthylphénol) qui sont volatils, ce qui entraîne une perte non négligeable lors des étapes d'évaporation. L'octylphénol tétraéthoxylé s'ajoute à la liste des composés détectés lorsqu'une dérivation est réalisée au préalable. Enfin le 4-nitrophénol, molécule n'appartenant pas à la famille des APs, n'a pas pu être détecté et les raisons sont encore à déterminer. Ces deux derniers composés sont détectés avec succès par UHPLC-MS/MS, ainsi que dix autres analytes injectés à 10 ou 100 ng en ESI-(+) pour les OPEOs et en ESI(-) pour les APs, avec une colonne C18. Ainsi, l'analyse des OPEOs est réalisée par élution en régime isocratique avec un mélange MeOH/H₂O (65:35) en 6 minutes, et celle des APs en élution graduée avec le même mélange en faisant varier le pourcentage de méthanol de 65 à 100 % en 8 minutes. Trois composés n'ont pas pu être étudiés en UHPLC-MS/MS faute d'une ionisation insuffisante: l'octylphénol monoéthoxylé, le 2-tert-butyl-4-méthylphénol, le 2-tert-butyl-4-éthylphénol, et le 2,6-di-tert-butyl-4-éthylphénol.

Les essais sur matrice seront précédés d'une procédure de préparation des échantillons incluant une extraction liquide-liquide et des extractions sur phase solide avec des colonnes C18, NH₂ et Oasis HLB.

Ainsi, lors de ces 2,5 mois, les trois premières étapes de l'objectif de ce stage ont été remplies, à savoir l'élaboration d'un rapport bibliographique portant sur les composés cibles, le choix de la méthode d'extraction jugée la plus adaptée, ainsi que la mise au point des méthodes permettant leur quantification. Les mois restants seront consacrés aux deux étapes restantes:

- Mettre en œuvre la méthodologie développée et réaliser des premiers tests de robustesse qui permettront de vérifier les performances quantitatives de l'analyse.
- Appliquer ces méthodes à un premier relevé d'occurrence dans une sélection d'échantillons de sérum et lait maternel.

Les risques de contamination devront être évalués et maîtrisés. Pour cela, certaines précautions quant au choix des matériels et matériaux à utiliser, sont à prendre :

- ne pas utiliser de détergents pour nettoyer toute verrerie qui entrera en contact avec les échantillons.
- avant utilisation placée la verrerie dans un four de 400 °C pendant au moins 4 heures.
- éviter d'utiliser tout ce qui est en plastique, si ce n'est pas possible, les rincer abondamment avec différents solvants avant utilisation.
- inclure des « blancs » dans chaque séquence d'échantillons afin de pouvoir vérifier qu'aucune contamination n'a eu lieu au cours des différentes étapes de préparation de l'échantillon.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

- **Matériel employé en GC-EI-MS/MS**

Marque	Série	Logiciel de pilotage	Mode d'ionisation
Agilent	7000	MassHunter	Impact électronique
Gaz vecteur	Injecteur	DéTECTEUR	
Hélium, He	En mode : Pulsed Splitless Programmé à : 250 °C	Spectromètre de masse en tandem (MS/MS)	

TABLEAUX 6: CARACTÉRISTIQUES DU DISPOSITIF CHROMATOGRAPHE - SPECTROMETRE DE MASSE

Type de colonne	Dimensions	Phase stationnaire	Fournisseur
DB5-MS	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	Apolaire : polymère phénylarylène équivalent à une phase (5% phényl) - méthylpolysiloxane	Agilent

TABLEAU 7: CARACTÉRISTIQUES DE LA COLONNE

- **Matériel utilisé en LC-ESI-MS/MS**

Marque	Série	Logiciel de pilotage	Mode d'ionisation	Logiciel d'optimisation
Waters	Xévo TQS	MassLynx	ESI-(+) et ESI(-)	Intellistart
Gaz vecteur	Mode d'acquisition	DéTECTEUR		
Diazote, N ₂	Infusion ou SRM	Spectromètre de masse en tandem (MS/MS)		

TABLEAUX 8: CARACTÉRISTIQUES DU DISPOSITIF CHROMATOGRAPHE - SPECTROMETRE DE MASSE

Type de colonne	Dimensions	Phase stationnaire	Fournisseur
Hypersil Gold C18	100 x 2,1 mm x 1,9 µm	Apolaire: silice greffée par des chaînes octadécyl (phase inverse)	Thermo Fisher

TABLEAU 9: CARACTÉRISTIQUES DE LA COLONNE

- **Matériel utilisé pour l'extraction sur phase solide**



Appareil à vide pour colonnes SPE :
Visiprep™ SPE Vacuum Manifold DL (Disposable Liner), 24-port model, Supelco, vendu par Sigma-Aldrich.

Colonnes SPE :
Cartouches C18 Recovery 200 mg, 3 mL, vendus par Interchim.
Cartouches NH₂ 200 mg, 3 mL, vendus par United Chemical.
Cartouches MIP 100 mg, 3 mL, AFFINIMIP® SPE Phénoliques vendus par Affinisep.
Cartouches Oasis HLB 6 cc/500 mg vendus par Waters.

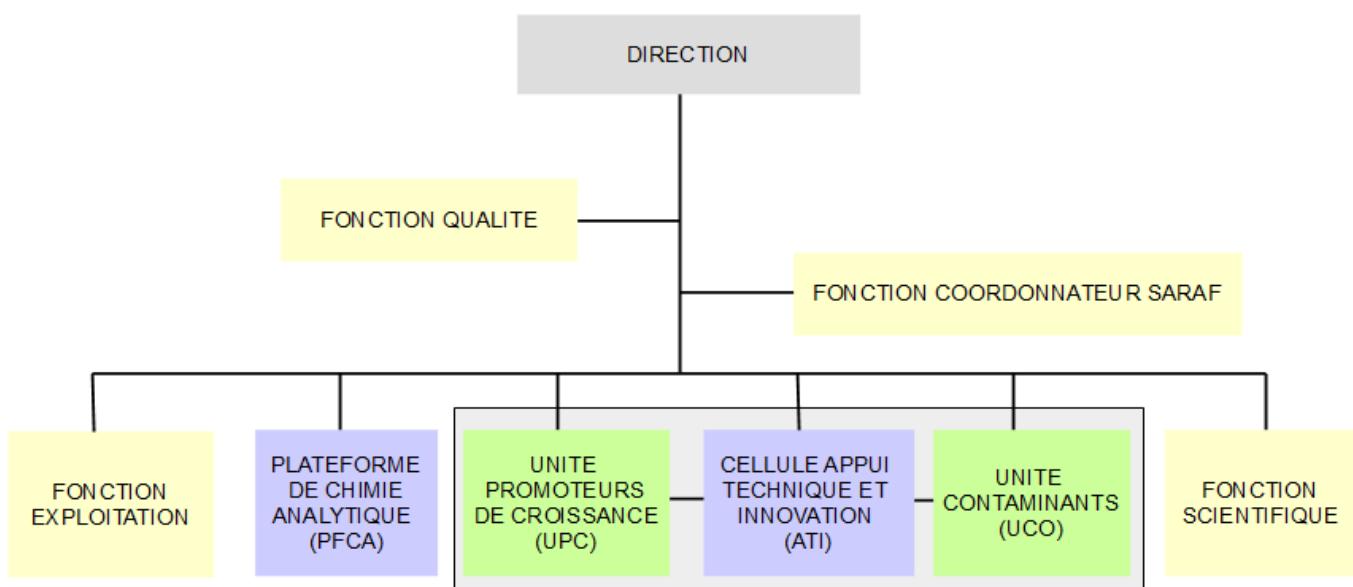
BIBLIOGRAPHIE

- [1] INERIS, 2011. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France: Nonylphénols, DRC-11-118962-11079A, 74p. <<http://www.ineris.fr/substances/fr/>>
- [2] M. Yvan LACHAUD. Rapport fait au nom de la commission des affaires sociales sur la proposition de loi visant à interdire l'utilisation des phtalates, des parabènes et des alkylphénols. [En ligne]. Enregistré à la Présidence de l'Assemblée nationale le 5 avril 2011, N°3306. <<http://www.assemblee-nationale.fr/13/rapports/r3306.asp>> (consulté le 08/04/2015).
- [3] X. Jie, J. Li, F. Zheng, G. Lei, Z. Biao, and Y. Jie, "Neurotoxic effects of nonylphenol: A review," *Wien. Klin. Wochenschr.*, vol. 125, no. 3–4, pp. 61–70, 2013.
- [4] Harreus U. A., Wallner B. C., Kastenbauer E. R., Kleinsasser N.H. Genotoxicity and cytotoxicity of 4-nonylphenol ethoxylate on lymphocytes as assessed by COMET assay. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (2002) 82 : 395-401.
- [5] Müller, S., Schmid, P., Schlatter, C., 1998b. Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 5, 257–265.1
- [6] INRS, 2006. Fiche toxicologique: Nonylphénol et 4-nonylphénol ramifié, 6p. <<http://www.inrs.fr/publications/bdd/doc/fichetox.html>>
- [7] Bécue A. et Nguyen R., 2005. Étude de l'analyse des Alkylphénols. INERIS, Unité « Chimie Analytique Environnementale », Direction des Risques Chroniques, Rapport final, 40 p. <<http://www.ineris.fr/centredoc/alkylsphenols.pdf>> (consulté le 03/04/2015).
- [8] Vega Morales T, Torres Padrón ME, Sosa Ferrera Z, Santana Rodríguez JJ. Determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in liquid and solid samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2009;28(10):1186-200.
- [9] Tan,B.L.L.,AliMohd,M.,2003. Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph-mass spectrometer. *Talanta* 61,385–391.
- [10] A. G. Asimakopoulos, N. S. Thomaidis, and M. a. Koupparis, "Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol," *Toxicol. Lett.*, vol. 210, no. 2, pp. 141–154, 2012.
- [11] Sosa-Ferrera Z, Mahugo-Santana C, Santana-Rodriguez JJ. Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples. *Biomed Res Int.* 2013;2013:674838.
- [12] Tang R, Chen MJ, Ding GD, Chen XJ, Han XM, Zhou K, et al. Associations of prenatal exposure to phenols with birth outcomes. *Environ Pollut.* 2013;178:115-20.
- [13] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, and M. Lehane, "Ion suppression: A critical review on causes, evaluation, prevention and applications," *Talanta*, vol. 115, pp. 104–122, 2013.
- [14] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, and A. De Leenheer, "Countering matrix effects in environmental liquid chromatography- electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals," *J. Chromatogr. A*, vol. 1029, no. 1–2, pp. 153–159, 2004.
- [15] E. Commission, "Commission Decision EC 2002/657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and," *Off J Eur Communities L*, pp. 8–36, 2002. <http://cemu10.fmv.ulg.ac.be/OSTC/2002657EC.pdf> (consulté le 25/04/2015).
- [16] P. L. Ferguson, C. R. Iden, and B. J. Brownawell, "Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry.," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 18, pp. 4322–4330, 2000.
- [17] T. Takasu, A. Iles, and K. Hasebe, "Determination of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates by reversed-phase high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 372, no. 4, pp. 554–561, 2002.
- [18] DeArmond PD, DiGregorio AL. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the analysis of alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates in environmental samples. *J Chromatogr A.* 2013;1305:154-63.
- [19] Ishii R, Takatori S, Akutsu K, Kondo F, Nakazawa H, Makino T. Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in media samples for in vitro fertilization by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Natural Science.* 2013;05(05):541-8.
- [20] Fabregat-Cabello N, Sancho JV, Vidal A, Gonzalez FV, Roig-Navarro AF. Development and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution. *J Chromatogr A.* 2014;1328:43-51.
- [21] Ros O, Vallejo A, Blanco-Zubiaguirre L, Olivares M, Delgado A, Etxebarria N, et al. Microextraction with polyethersulfone for bisphenol-A, alkylphenols and hormones determination in water samples by means of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Talanta.* 2015;134:247-55.

ANNEXES

Annexe 1

Schéma simplifié de l'organisation interne du LABERCA



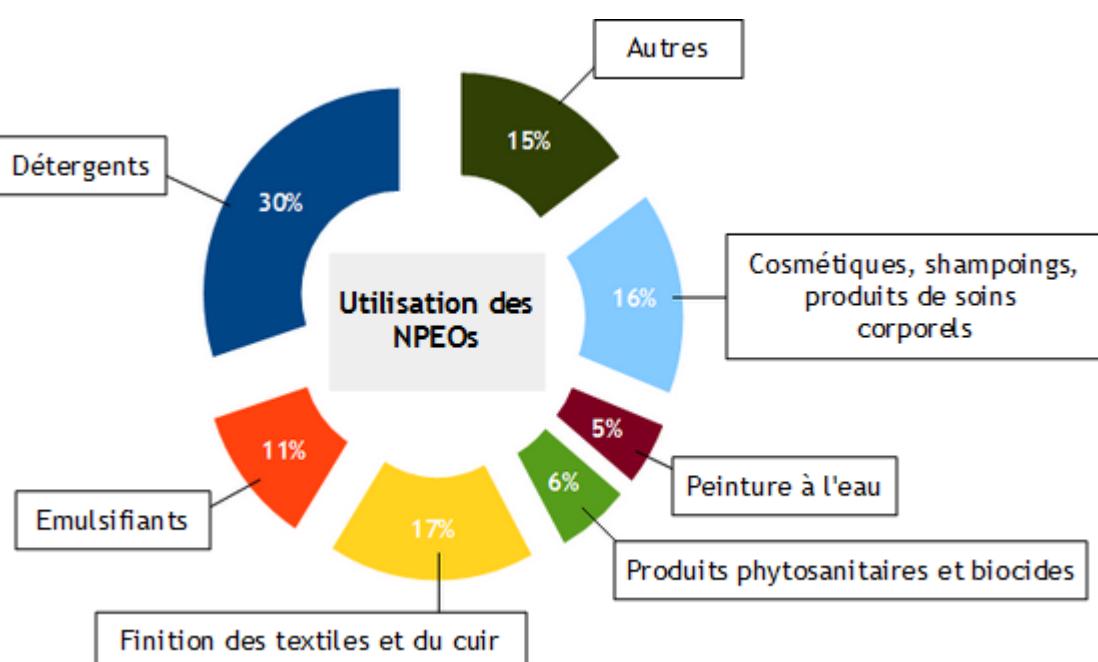
Annexe 2

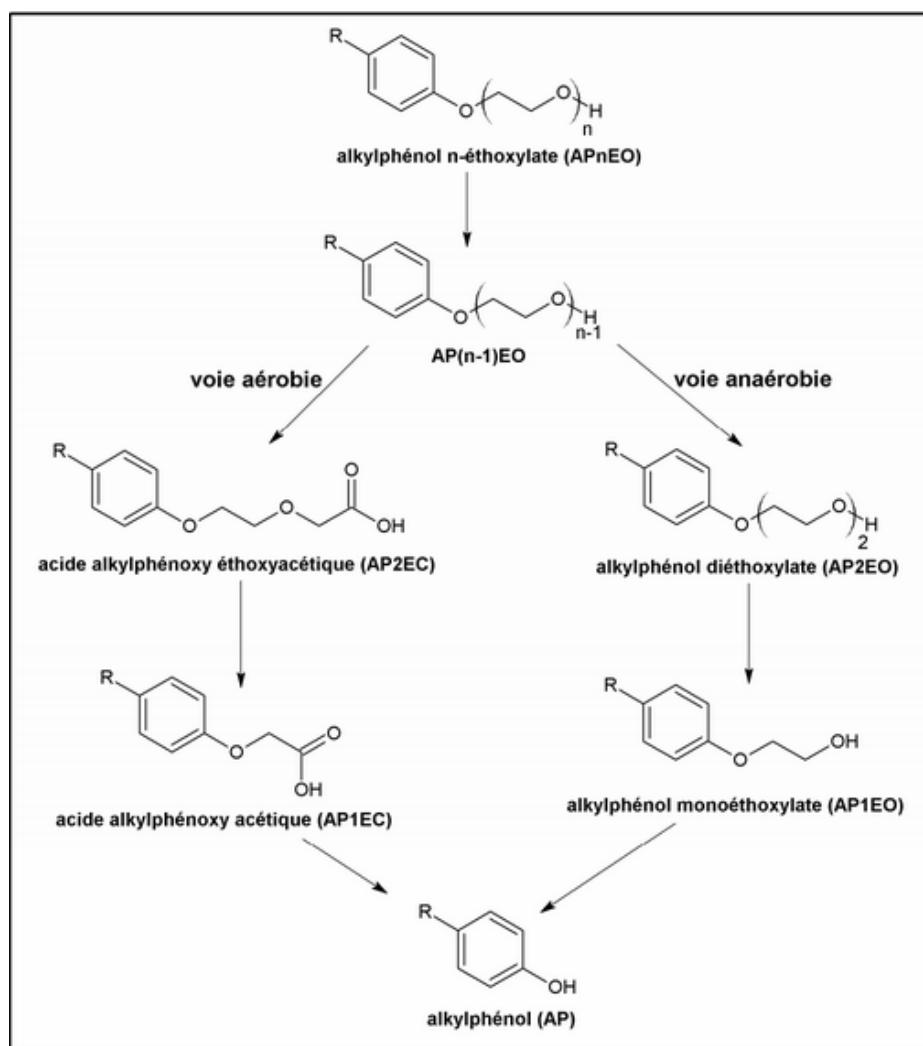
Données de consommation mondiale des nonylphénols éthoxylés [1]

Zone	UE	Allemagne	Angleterre	Canada	USA	Mondiale
Années	1997	1989	1992	1996	2006	2000
Consommation (t/an)	77 600	13 500	17 600	19 000	172 000	500 000

Annexe 3

Répartition de l'utilisation industrielle des éthoxylates d'alkylphénols





n	Molécule	Structure	MM (g/mol)	Réf.
1	Ethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether		250.4	007N-I
2	Diethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether		294.4	008N-I
3	Triethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether		338.5	009N-I
4	Tetraethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether		382.5	010N-I

Cx	Molécule	Structure	N°CAS	MM (g/mol)	Réf.
C4	3-tert-Butylphenol		585-34-2	150.22	026N-I
C5	2-tert-Butyl-4-methylphenol		2409-55-4	164.24	035N-I
C6	2-tert-Butyl-4-ethylphenol		96-70-8	178.27	048N-I
C6	4-Phenylphenol		92-69-3	170.21	041N-I
C7	4-n-Heptylphenol		1987-50-4	192.30	053-NI
C8	4-tert-Octylphenol		140-66-9	206.32	003N-I
C8	4-n-Octylphenol		1806-26-4	206.32	105X-II
C9	4-Nonylphénol (mélange d'isomères)		84852-15-3	220.35	011N-I
C9	4-n-Nonylphénol		104-40-5	220.35	016N-I
C10	2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol		4130-42-1	234.38	067N-I
C12	4-n-Dodecyl-o-cresol		29665-59-6	276.46	073N-I
C12	4-Nitrophénol		100-02-07	139.11	103X-II

Composé	Réf.	Transitions	eV
3-tert-Butylphenol	026N-I	1 135 > 107	10
		2 150 > 135	10
		3 135 > 77	25
		4 135 > 91	5
2-tert-Butyl-4-methylphenol	035N-I	1 149 > 121	10
		2 164 > 149	10
		3 164 > 121	25
		4 149 > 77	30
2-tert-Butyl-4-ethylphenol	048N-I	1 163 > 135	10
		2 178 > 163	10
		3 163 > 91	25
		4 163 > 107	20
4-Phenylphenol	041N-I	1 170 > 141	20
		2 141 > 115	20
		3 170 > 115	35
		4 170 > 55	20
4-n-Heptylphenol	053N-I	1 107 > 77	20
		2 192 > 107	15
4-tert-Octylphenol	003N-I	1 135 > 107	10
		2 135 > 77	30
		3 135 > 95	10
		4 206 > 135	5
4-n-Octylphenol	105X-II	1 107 > 77	30
		2 206 > 107	10
		3 107 > 55	30
		4 206 > 121	15
4-Nonyphénol (mélange d'isomères)	011N-I	1 135 > 107	10
		2 149 > 107	5
		3 135 > 77	25
		4 149 > 77	35
4-n-Nonylphénol	016N-I	1 107 > 77	20
		2 220 > 107	10
		3 107 > 55	25
2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol	067N-I	1 234 > 219	10
		2 219 > 57	15
		3 219 > 91	35
		4 219 > 159	15
4-n-Dodecyl-o-cresol	073N-I	1 121 > 77	20
		2 121 > 51	40
		3 121 > 91	15
		4 276 > 121	15
4-Nitrophénol	103X-II	1 139 > 109	10
		2 139 > 81	20
		3 109 > 81	10
		4 109 > 53	20

Molécule	Réf.	Transitions	eV
OP1EO: Ethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	007N-I	1 151 > 107 2 250 > 107 3 206 > 107	5 50 5
OP2EO: Diethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	008N-I	1 107 > 77 2 294 > 107 3 195 > 107 4 206 > 107	20 15 1 5
OP3EO: Triethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	009N-I	1 107 > 77 2 107 > 51 3 107 > 79	20 35 10
OP4EO: Tetraethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	010N-I	1 107 > 77 2 206 > 107 3 133 > 107 4 232 > 107	30 10 20 35

N°	t _R (min)	Référence interne	Nom du composé	Cx/n
1	10.8	026N-I	3-tert-Butylphenol	C4
2	11.8	035N-I	2-tert-Butyl-4-methylphenol	C5
3	12.9	048N-I	2-tert-Butyl-4-ethylphenol	C6
4	14.3	103X-II	4-Nitrophénol	-
5	14.7	067N-I	2,6-di-tert-butyl-4-ethylphénol	C10
6	15.3	003N-I	4-tert-Octylphenol	C8
7	15.5-17.5	011N-I	4-Nonyphénol (mélange d'isomères)	C9
8	16.1	053N-I	4-n-Heptylphenol	C7
9	16.79	041N-I	4-Phenylphenol	C6
10	17.33	105X-II	4-n-Octylphenol	C8
11	18.5	016N-I	4-n-Nonylphénol	C9
12	19.99	007N-I	OP1EO: Ethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	C8 n = 1
13	21.5	073N-I	4-n-Dodecyl-o-cresol	C12
14	21.9	008N-I	OP2EO: Diethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	C8 n = 2
15	23.5	009N-I	OP3EO: Triethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	C8 n = 3
16	24.73	010N-I	OP4EO: Tetraethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	C8 n = 4

TABLEAU : IDENTIFICATION DES 16 COMPOSES CIBLES

Composés à introduire à 50 ng	003N-I, 007N-I, 008N-I, 016N-I, 026N-I, 035N-I, 041N-I, 048N-I, 053N-I, 073N-I, 105X-II
Composés à introduire à 100 ng	011N-I, 067N-I
Composés à introduire à 200 ng	009N-I, 010N-I, 103X-II

TABLEAU: RÉCAPITULATIF DES QUANTITÉS A INTRODUIRE POUR LA RÉALISATION DU CHROMATOGRAMME TÉMOIN

Annexe 8-a

Paramètres d'ionisation optimaux obtenus pour les OPEOs

Molécule	Référence interne	Masse moléculaire (g/mol)	N°	Transitions	Tension du cône (V)	Energie de collision (eV)
<u>OP1EO:</u> Ethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	007N-I	250.4	1	251 > 71	40	12
			2	251 > 91	40	20
			3	251 > 57	40	14
			4	251 > 121	40	12
<u>OP2EO:</u> Diethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	008N-I	294.4	1	312 > 233	28	12
			2	295 > 233	46	8
			3	312 > 121	28	16
			4	312 > 207	28	10
<u>OP3EO:</u> Triethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	009N-I	338.5	1	356 > 277	36	12
			2	339 > 277	56	8
			3	356 > 233	36	16
			4	339 > 233	56	12
<u>OP4EO:</u> Tetraethylene glycol mono (p-n-octylphenyl) ether	010N-I	382.5	1	383 > 233	60	14
			2	383 > 277	60	12
			3	400 > 233	28	18
			4	400 > 277	28	14

Annexe 8-b

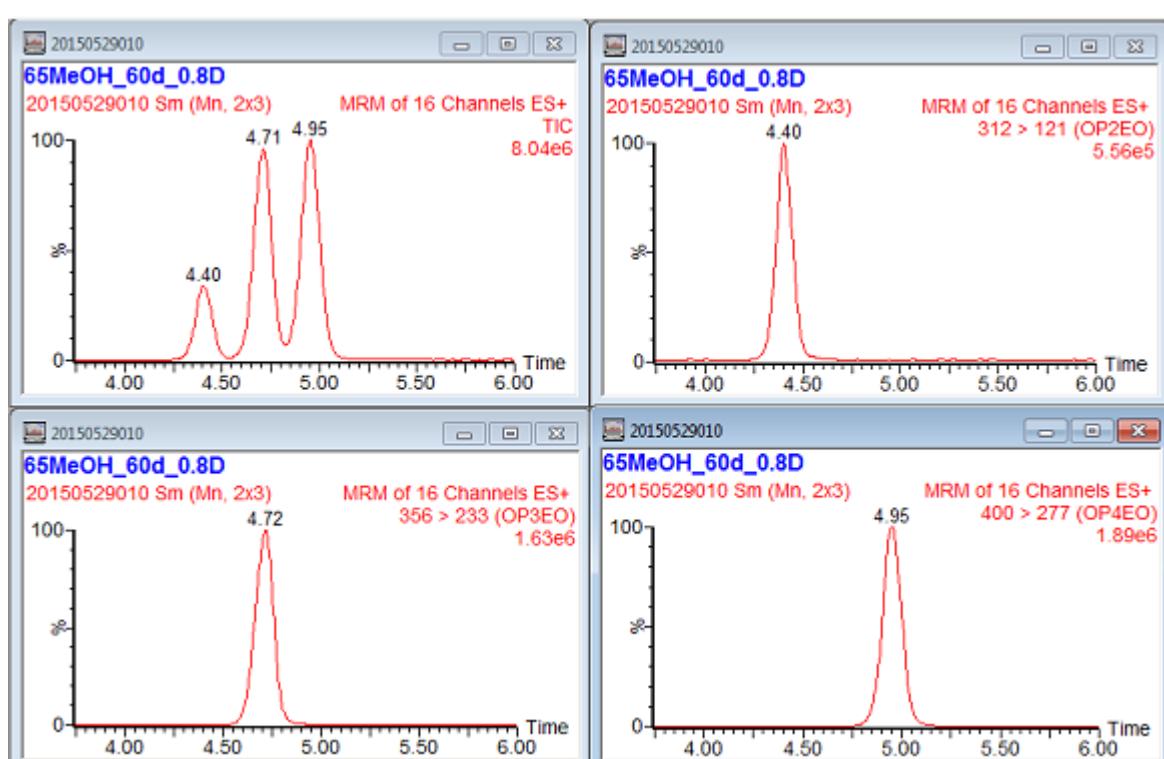
Paramètres d'ionisation optimaux obtenus pour les APs

Molécule	Référence interne	Masse moléculaire (g/mol)	N°	Transitions	Tension du cône (V)	Energie de collision (eV)
4-tert-Octylphenol	003N-I	206.3	1	205 > 133	46	24
			2	205 > 189	46	16
			3	205 > 93	46	38
			4	205 > 117	46	52
4-Nonylphenol (mélange d'isomères)	011N-I	220.3	1	219 > 133	38	30
			2	219 > 147	38	28
			3	219 > 162	38	16
			4	219 > 117	38	44
4-n-nonylphenol	016N-I	220.3	1	219 > 106	30	20
			2	219 > 119	30	34
			3	219 > 133	30	30
			4	219 > 77	30	34
3-tert-butylphenol	026N-I	150	1	149 > 133	50	24
			2	149 > 117	50	40
			3	149 > 92	50	24
			4	149 > 116	50	26
2-tert-butyl-4-methyl	035N-I	164.2	-	-	-	-
4-phenylphenol	041N-I	170.2	1	169 > 93	38	26
			2	169 > 141	38	24
			3	169 > 115	38	24
			4	169 > 65	38	32
2-tert-butyl-4-ethylphenol	048N-I	178.3	1	177 > 147	44	10
			2	177 > 162	44	20
			3	177 > 71	44	12
			4	177 > 123	44	18
4-n-heptylphenol	053N-I	192.3	1	191 > 106	60	18
			2	191 > 117	60	28
			3	191 > 77	60	24
			4	191 > 161	60	10

2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol	067N-I	234.4	-	-	-	-
4-n-dodecyl-o-cresol	073N-I	276.5	1 2 3 4	275 > 120 275 > 133 275 > 91 275 > 147	6 6 6 6	24 40 30 44
4-nitrophenol	103X-II	139.1	1 2 3 4	138 > 108 138 > 92 138 > 46 138 > 122	18 18 18 18	14 20 22 22
4-n-octylphenol	105X-II	206.3	1 2 3 4	205 > 106 205 > 119 205 > 77 205 > 83	2 2 2 2	20 30 28 18

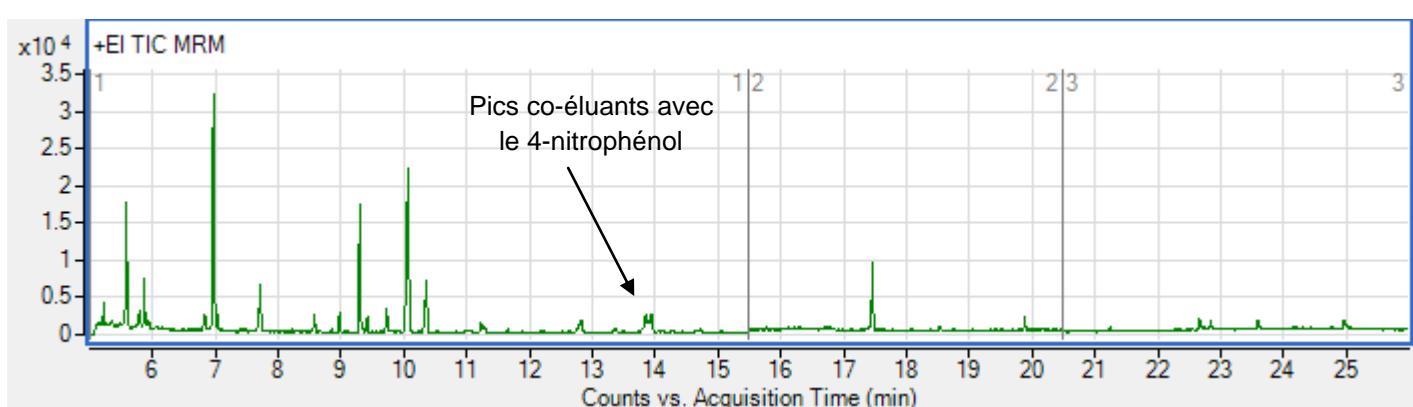
Annexe 9

Comparaison des pics obtenus en TIC avec ceux obtenus en SRM



Annexe 10

Ensemble des pics chromatographiques générés par la présence de MSTFA



Référence	TR1 (%)	Référence	TR2 (%)	Référence	Moyenne des TR
026N-I	6.68	026N-I	7.93	026N-I	7.31
003N-I	27.54	003N-I	23.47	003N-I	25.50
053N-I	49.40	053N-I	29.62	053N-I	39.51
105X-II	74.30	105X-II	37.87	105X-II	56.08
016N-I	47.60	016N-I	24.60	016N-I	36.10
007N-I	100.24	007N-I	50.07	007N-I	75.16
008N-I	63.41	008N-I	35.13	008N-I	49.27

TABLEAU : TAUX DE RECUPERATION OBTENUS AVEC LES CARTOUCHES MIP SANS ETAPÉ DE LAVAGE

Ref	10%	10%	20%	20%	30%	30%	40%	40%	50%	50%	60%	60%
	L	E	L	E	L	E	L	E	L	E	L	E
026N-I	0.00	0.00	0.00	0.36	0.00	0.78	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00
035N-I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
048N-I	0.00	0.00	25.18	0.00	1.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
003N-I	0.00	18.28	72.53	1.05	12.48	0.37	0.73	0.04	1.89	0.00	1.26	0.05
053N-I	0.00	32.51	47.36	2.72	24.45	0.40	4.41	0.08	8.38	0.00	6.03	0.00
041N-I	0.00	49.61	0.00	50.04	5.95	36.16	5.33	0.20	7.39	0.00	5.78	0.00
105X-II	0.00	60.41	163.04	2.08	32.68	0.36	10.48	0.11	12.82	0.00	9.86	0.00
016N-I	0.00	90.61	131.86	1.67	26.78	0.29	21.17	0.06	17.51	0.00	13.36	0.00
007N-I	0.00	34.03	0.00	8.96	-	0.89	3.80	0.00	3.72	0.00	2.62	0.00
073N-I	0.59	62.66	92.24	0.17	0.00	0.00	2.10	0.08	5.94	0.00	6.39	0.00
008N-I	0.00	6.59	0.00	4.86	0.00	3.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
009N-I	0.00	7.87	0.00	8.29	0.00	14.77	0.00	0.00	0.00	51.14	0.00	42.35
010N-I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

TABLEAU : TAUX DE RECUPERATION OBTENUS AVEC LES CARTOUCHES NH2 ENTRE 10 ET 60 % D'ACETATE D'ETHYLE AU LAVAGE (L) ET UNE ELUTION (E) A 100 %

Référence	60% E	70% L	80% L	80% E	90% L	90% E
026N-I	1.57	0.00	2.31	0.12	8.80	0.00
035N-I	1.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
048N-I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
103X-II	1.30	12.75	0.77	0.67	27.40	0.00
003N-I	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
053N-I	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
041N-I	0.18	160.63	55.16	0.24	55.86	0.00
105X-II	0.02	2.01	1.05	0.00	1.51	22.69
016N-I	0.07	8.36	2.14	0.00	5.04	35.94
007N-I	0.00	1.87	0.31	0.00	0.00	7.05
073N-I	0.08	15.33	1.93	0.00	3.85	133.41
008N-I	0.00	26.53	4.35	0.00	17.61	27.95
009N-I	0.00	187.99	18.64	0.00	90.13	60.36
010N-I	0.00	118.82	12.61	0.01	66.19	0.00

TABLEAU : TAUX DE RECUPERATION OBTENUS AVEC LES CARTOUCHES OASIS HLB ENTRE 60 ET 90 % DE MTBE AU LAVAGE (L) ET UNE ELUTION (E) A 100 %