



# **Etude de l'analyse des Alkylphénols**

Rapport final

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable  
Direction de l'Eau  
20 avenue de Ségur – 75302 PARIS 07 SP

Convention DE n° CV04000107 – Thème n°1

*A. BECUE, R. NGUYEN*

*Unité « Chimie Analytique Environnementale »  
Direction des Risques Chroniques*

**FEVRIER 2005**

# Etude de l'analyse des Alkylphénols

Rapport final

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable  
Direction de l'Eau  
20 avenue de Ségur – 75302 PARIS 07 SP

Convention DE n° CV04000107 – Thème n°1

**FEVRIER 2004**

*A. BECUE, R. NGUYEN*

*Unité « Chimie Analytique Environnementale »  
Direction des Risques Chroniques*

Ce document comporte 34 pages et les annexes listées en fin.

	<b>Rédaction</b>	<b>Vérification</b>	<b>Approbation</b>
<b>NOM</b>	BECUE Amaury NGUYEN Régis	STRUB Marie-Pierre	MORIN Anne
<b>Qualité</b>	Stagiaire à la DRC Ingénieur de la DRC	Ingénieur de la DRC	Responsable de l'Unité « Chimie Analytique et Environnementale »
<b>Visa</b>			

INERIS DRC-04-59501-CHEN-RNg-05.0113

## RESUME

---

Les Alkylphénols (AP) sont des substances chimiques très lipophiles et persistantes s'accumulant préférentiellement au niveau des sédiments et du sol. Le 4-nonylphénol et le 4-*tert*-octylphénol sont les principaux AP produits et commercialisés sous forme de dérivés. De par leur large spectre d'utilisation et l'absence de traitement adapté dans les stations d'épuration, ces composés sont ubiquitaires dans l'environnement.

Des études récentes ont démontré le potentiel toxicologique des AP principalement en tant que perturbateur endocrinien chez l'animal mais également chez l'Homme. Les AP ont donc été classés parmi les 33 substances prioritaires de la Directive Eau de l'Union Européenne. Un projet de norme ISO/DIS 18857-1 sur l'étude du 4-nonylphénol et du 4-*tert*-octylphénol a été validé par un essai interlaboratoires regroupant 18 laboratoires internationaux dont l'INERIS.

Les principaux outils analytiques pour l'étude des AP sont la LC/MS et la GC/MS. Cette dernière méthode présente un spectre d'utilisation plus intéressant pour l'étude du 4-nonylphénol et du 4-*tert*-octylphénol. Par conséquent, la GC/MS reste donc la méthode de référence pour le développement du dosage des AP.

## SOMMAIRE

---

<b>RESUME.....</b>	<b>2</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>3</b>
<b>GLOSSAIRE.....</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>2. ALKYLPHENOLS : GENERALITES .....</b>	<b>6</b>
2.1 NOMENCLATURE.....	6
2.2 GÉNÉRALITÉS .....	6
2.3 PRODUCTION ET DEGRADATION .....	7
2.4 ETUDES TOXICOLOGIQUES .....	9
<b>3. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES METHODES ANALYTIQUES .....</b>	<b>11</b>
3.1 EXTRACTION.....	11
3.2 ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE .....	13
3.3 SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE .....	14
3.4 RECAPITULATIF DES DOMAINES D'APPLICATION DES PRINCIPALES METHODES D'ANALYSE DES AP ET DERIVES.....	16
<b>4. ESSAI INTERLABORATOIRES : VALIDATION DU PROJET DE NORME ISO/DIS 18857-1 .</b>	<b>17</b>
4.1 PRESENTATION DE L'ESSAI .....	17
4.2 MODE OPERATOIRE.....	17
4.3 RESULTATS DE L'ESSAI.....	18
<b>5. ETUDE DE L'ANALYSE DES ALKYLPHENOLS .....</b>	<b>19</b>
5.1 ETUDE DE LA STABILITÉ DES COMPOSÉS .....	19
5.2 ETUDE D'UNE ÉVENTUELLE POLLUTION .....	23
5.3 CARACTÉRISATION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE.....	24
<b>6. CONCLUSION .....</b>	<b>29</b>
<b>RÉFÈRENCES .....</b>	<b>30</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>34</b>

## GLOSSAIRE

---

4NP	Coupe des 4-nonylphénols	
4OP	4- <i>tert</i> -octylphénol	
ADN	Acide désoxyribonucléique	
AP	Alkylphénol	
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique	
APE ou APnEO	Alkylphénol éthoxylate	
APEC ou APnEC	Alkylphénol carboxylate	
ASE	Accelerated solvent extraction	
CV <sub>r</sub>	Coefficient de variation relatif de répétabilité	
CV <sub>R</sub>	Coefficient de variation relatif de reproductibilité	
DCM	Dichlorométhane	
ECD	Détecteur par capture d'électron	
EI	Ionisation par impact électronique	
ESI	Ionisation par électrospray	
FID	Détection par ionisation de flamme	
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse associée au spectromètre de masse	
HPLC	Chromatographie liquide haute performance	
ISO	International standards organization	
L/L	Liquide/liquide	
LD	Limite de détection	
LQ	Limite de quantification	
MES	Matière en suspension	
MS	Spectrométrie de masse	
NCI	Ionisation chimique négative	
NP	Nonylphénol	
NPE ou NPnEO	Nonylphénol éthoxylate	avec n précisant le degré d'éthoxylation
NPEC ou NPnEC	Nonylphénol carboxylate	avec n précisant le degré d'éthoxylation
ODS	Octadecylsilane	
OP	Octylphénol	
OPE ou OPnEO	Octylphénol éthoxylate	avec n précisant le degré d'éthoxylation
OPEC ou OPnEC	Octylphénol carboxylate	avec n précisant le degré d'éthoxylation
OSPAR	Convention Oslo - Paris	
PFBCl	Chlorure de pentafluorobenzoyl	
PLE	Pressurized liquid extraction	
r	Coefficient de corrélation	
r <sup>2</sup>	Coefficient de détermination	
SFE	Extraction par fluide supercritique	
SIM	Selected Ion Monitoring	
SIS	Selected Ion Storage	
SPE	Extraction en phase solide	
uma	Unité de masse atomique	
X	Moyenne des résultats fournis par les laboratoires de l'essai	
interlaboratoires		
X <sub>ref</sub>	Valeur de dopage	

## 1. INTRODUCTION

---

En 1998, la réunion ministérielle d'OSPAR s'est accordée sur l'objectif de cessation des rejets, émissions et pertes de toutes les substances dangereuses dans l'environnement marin d'ici 2020 et a inclus les nonylphénols et les nonylphénols éthoxylates (NP/NPE) sur la première liste de substances nécessitant une action prioritaire pour atteindre cet objectif [1]. Depuis lors, le nonylphénol (NP) a été classé dans le cadre de la Directive Eau de l'Union Européenne comme « substance dangereuse prioritaire », de telle sorte qu'une action de prévention de ses rejets dans l'eau sur 20 ans soit requise dans les pays membres [2]. Une décision sur la priorisation des octylphénols et des octylphénols éthoxylates (OP/OPE) est toujours en discussion.

Les alkylphénols (NP, OP) font partie de la liste des 87 substances à rechercher obligatoirement dans le cadre de l'opération « recherche et réduction des rejets des substances dangereuses dans l'eau » RSDE, et figurent dans le cahier des charges technique préparé par l'INERIS<sup>1</sup>.

Ce rapport a pour but de décrire et de présenter les différentes méthodes analytiques permettant l'étude des AP. Nous avons également souhaité présenter le projet de norme ISO/DIS 18857-1<sup>2</sup>, ainsi que l'essai interlaboratoires réalisé dans le but de valider cette norme, auquel l'INERIS a participé. L'analyse et les commentaires de cet essai sont présentés en fin de rapport.

1 <http://rsde.ineris.fr> (mise à jour : 23/12/2003)

2 « Qualité de l'eau – Dosage des alkylphénols sélectionnés – Partie 1 : Méthode pour échantillons non filtrés par extraction en phase liquide et chromatographie en phase gazeuse et détection sélective de masse »

## 2. ALKYLPHENOLS : GENERALITES

### 2.1 NOMENCLATURE

La nomenclature des alkylphénols (AP) est assez complexe et source de nombreuses confusions. L'INERIS a souhaité apporter un éclairage concret sur la nomenclature des principaux alkylphénols produits ou retrouvés dans l'environnement. Un tableau récapitulatif de ce travail est présenté en annexe 1.

Le 4-nonylphénol (mélange de nonylphénols à chaîne ramifiée substitués en position 4) sur le noyau, représente la grande majorité des nonylphénols (80 %) dans les mélanges techniques commerciaux. Le terme octylphénol désigne uniquement le 4-*tert*-octylphénol. Pour les OP, seul cet isomère intervient en usage industriel.

### 2.2 GENERALITES

Les alkylphénols sont fabriqués en grandes quantités, et servent d'intermédiaires dans la fabrication des agents tensioactifs, des résines phénoliques, etc. Ils se forment également lors de la dégradation des alkylphénols éthoxylés (APEO ; cf.§ 2.3). Il n'y a pas d'exemple de synthèse naturelle des AP et APEO. Leur présence dans les milieux aquatiques est donc uniquement anthropogénique. En Europe, la production et l'importation des nonylphénols avoisinaient les 82 000 tonnes en 1997 [3]. En Allemagne, cette production est passée de 18 500 tonnes en 1984 à 4 900 tonnes en 1990 [4].

Les alkylphénols sont ubiquitaires dans l'environnement de par leur large spectre d'utilisation et l'absence de traitement approprié dans les stations d'épuration. En effet, on estime que 65 % des alkylphénols et dérivés entrant dans les stations d'épuration sont rejetés dans l'environnement [5]. La présence d'alkylphénols a été détectée dans l'air, l'eau, les sédiments et le sol [6].

Le tableau 1 présente les propriétés physico-chimiques du 4-NP et de l'OP.

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques du 4-NP et de l'OP [7]

Propriété	4-nonylphénol	4- <i>tert</i> octylphénol
N°CAS	84852-15-3	140-66-9
Formule moléculaire	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O
Poids moléculaire	220,3	206,3
Point de fusion (°C)	81 - 83	84 - 85
Point d'ébullition (°C)	295 - 320	280 - 302
Couleur	Incolore à jaune paille (liquide)	Blanc (solide)
Densité	0,953	0,922
Pression de vapeur (Pa)	(4,55 ±3,5).10 <sup>-3</sup>	4,7.10 <sup>-3</sup>
Solubilité (mg/L)	5,43	12,6
Log K <sub>ow</sub>	4,2 - 4,48	4,12
Constante de Henry (Pa.m <sup>3</sup> /mol)	11,02	0,70

Ces caractéristiques favorisent l'accumulation préférentielle des nonylphénols et des octylphénols dans les boues et les sédiments. La demi-vie du 4-nonylphénol dans les sédiments est de 28 à 104 jours [7]. Selon les résultats de l'étude réalisée par Isobe et *al.* [8], 20 % des nonylphénols sont retrouvés au sein du milieu aquatique, dans la phase particulaire et 80 % dans l'eau elle-même. L'adsorption des alkylphénols sur les MES joue un rôle important dans le devenir environnemental de ces composés dans les milieux aquatiques.

### 2.3 PRODUCTION ET DEGRADATION

L'une des principales sources d'alkylphénols est la biodégradation des alkylphenols éthoxylés (cf. figure 1). Les APEO sont produits principalement en tant qu'adjuvants, détergents dans l'industrie textile, le traitement de surface et comme additifs de désencrage dans l'industrie papetière. D'autres usages sont également significatifs : émulsifiants, adjuvants de formulation de pesticides et autres produits agricoles, peintures à l'eau. Ils se retrouvent en quantité importante au sein des stations de retraitement des eaux mais également dans l'environnement (cf. tableau 2).

**Tableau 2. Présence des APEO dans les rejets aqueux et dans les sédiments en aval de diverses industries et stations d'épuration [9]**

SOURCE	SEDIMENT		EFFLUENT	
	% d'échantillon > LD	Concentration (µg/kg)	% d'échantillon > LD	Concentration (µg/L)
Stations d'épuration	54	< 5 à 12400	15	< 1 à 33
Chantiers navals militaires	56	< 5 à 1650	57	< 1 à 11
Chantiers navals civils	71	< 5 à 5260	14	< 1 à 6300
Industries diverses	22	< 5 à 648	0	< 0,1

Les nonylphénols éthoxylés (NPEO) subissent un processus de biodégradation complexe. En condition anaérobies, ce processus biologique conduit à la formation de nonylphénol (NP) et d'éthoxylates de degré inférieur (monoéthoxylat NP1EO ou diéthoxylat NP2EO). En condition aérobie, les NPEO sont biotransformés en acide nonylphenoxy acétique (NP1EC) ou acide nonylphénoxy-éthoxyacétique (NP2EC) et en nonylphénol (NP).

La biodégradation des octylphénols éthoxylés (OPEO) est similaire à celle des NPEO. Ces processus de dégradation sont représentés dans la figure 1.

Par rapport à leurs composés parents, les alkylphénols (produits de dégradation) sont plus persistants, plus toxiques, plus lipophiles et moins hydrosolubles [10].

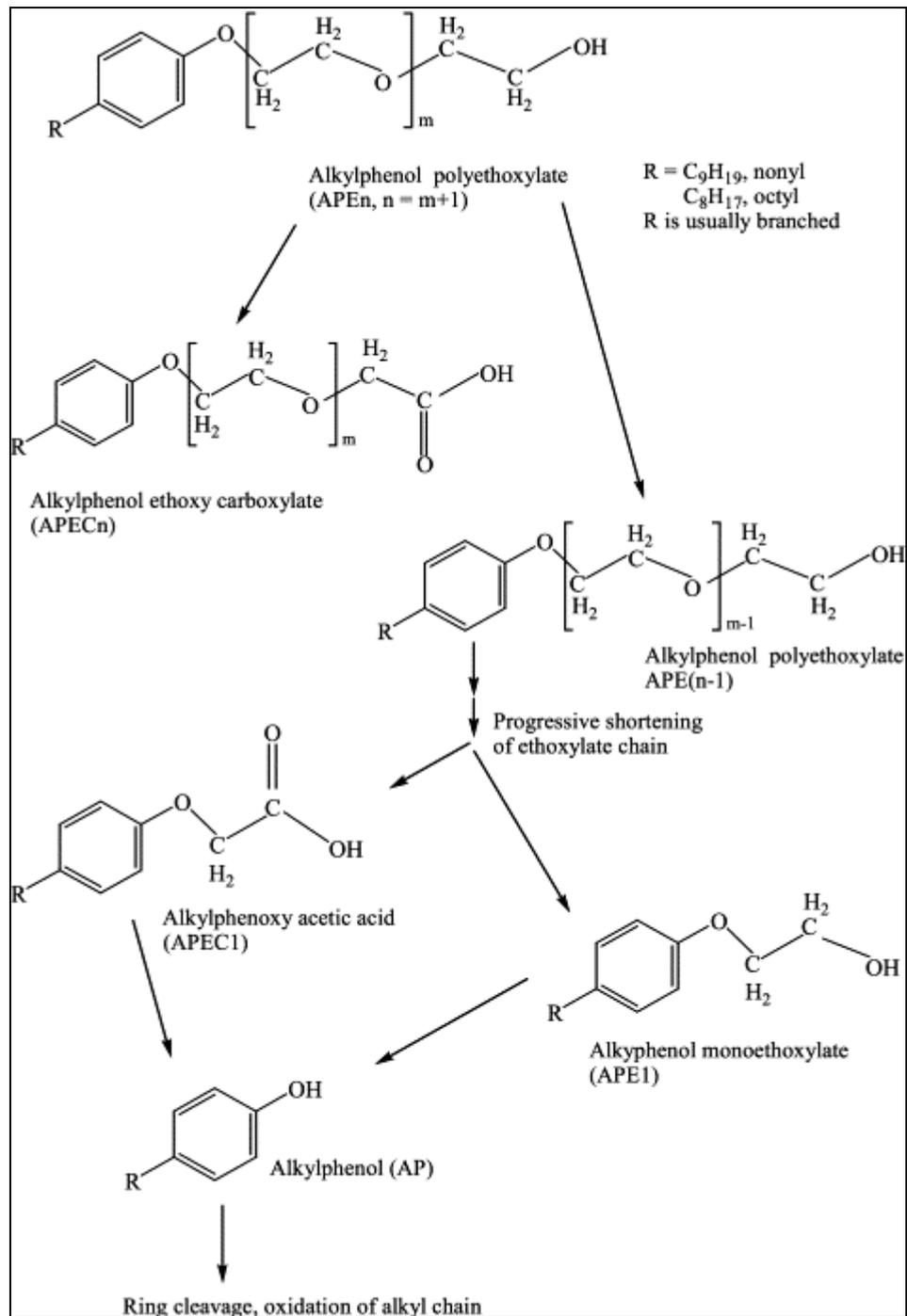


Figure 1. Voies de dégradation biologique des alkylphénols polyéthoxylés [6]  
(source d'alkylphénols)

## 2.4 ETUDES TOXICOLOGIQUES

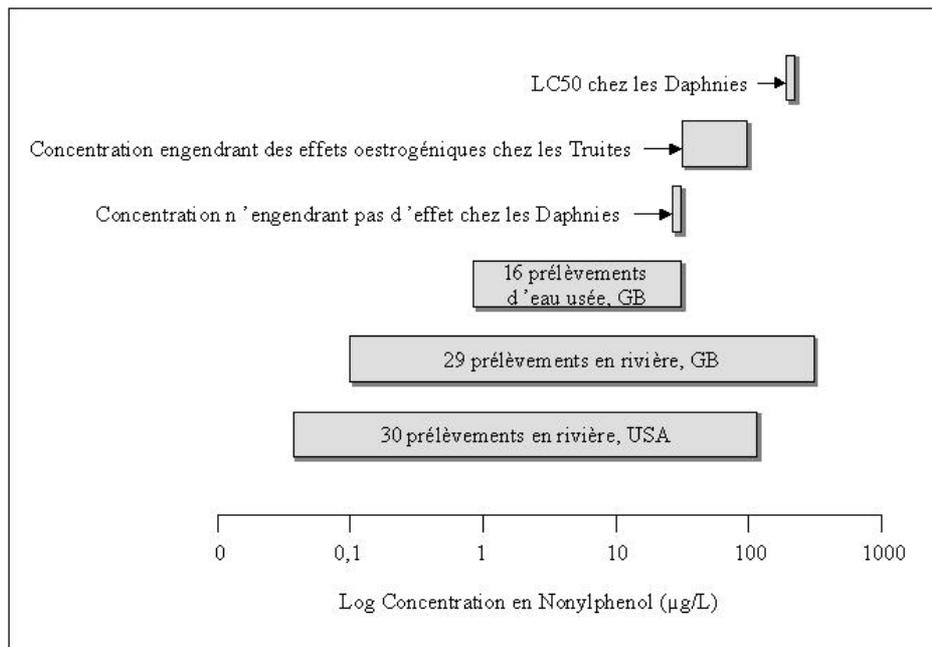
De récentes études ont démontré le potentiel toxicologique des AP principalement en tant que perturbateurs endocriniens chez l'animal, mais aussi chez l'Homme.

Les AP, de par leur structure chimique, peuvent se fixer, par compétition avec l'œstrogène, sur les récepteurs oestrogéniques [6]. Ceci entraîne notamment une induction de la vitellogenine altérant le métabolisme stéroïdien et la croissance testiculaire. Des effets directs du NP sur la structure et les fonctions de l'ADN dans la larve de bernacle ont été décrits [11]. Ce mécanisme pourrait être responsable des effets de perturbation hormonale observés dans l'ensemble des organismes vivants. Peu d'informations sont disponibles sur la toxicité des OP et dérivés, cependant, il a été démontré une toxicité sur l'activité oestrogénique quarante fois plus importante pour les OP par rapport aux NP et aux NP1EC [12].

Une bioconcentration des AP a été constatée au sein d'espèces aquatiques (algues, plantes aquatiques, poissons, moules). Une synthèse bibliographique sur la toxicité aquatique des AP a été publiée par Servos [12]. La figure 2 représente des données concernant la toxicité des nonylphénols pour quelques espèces aquatiques, ainsi que la concentration généralement déterminée dans certaines rivières anglaises lors d'une étude réalisée par Blackburn *et al.*, en 1994.

Des travaux récents ont soulevé des préoccupations relevant directement de la santé humaine. Par exemple, Chitra *et al.* [13] et Adeoya-Osiguwa *et al.* [14] décrivent des effets sur les fonctions du sperme chez les mammifères, tandis que de récents documents citent également une détérioration de l'ADN dans les lymphocytes humains [15].

L'évaluation des risques effectuée par l'Union Européenne pour les nonylphénols a conclu à la présence de risques significatifs pour l'environnement aquatique, les sols et pour les organismes supérieurs par empoisonnement secondaire (accumulation des NP dans la chaîne alimentaire). Du fait de cette toxicité démontrée, une volonté de réduction et de régulation des NPE a été mise en place en Europe (commission Oslo-Paris : OSPAR [7]) et en Amérique du Nord depuis quelques années.



**Figure 2. Toxicité et concentrations environnementales des NP [21]**

### **3. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES METHODES ANALYTIQUES**

L'analyse des AP nécessite la mise en œuvre de différentes étapes analytiques décrites dans les paragraphes suivants. Les limites de détection, très variables en fonction de la matrice (eau, boue et sédiment) sont également présentées.

#### **3.1 EXTRACTION**

##### **3.1.1 Matrice eau**

###### **3.1.1.1 Entrainement à la vapeur :**

Cette méthode d'extraction est actuellement peu utilisée [16]. Ahel et Giger [17] ont utilisé la distillation par la vapeur pour extraire le 4-NP de la matrice « eau de rejet ». Cette technique d'extraction nécessite une étape de purification permettant d'isoler les NP des autres composés volatils et semi-volatils contenus dans l'échantillon étudié. Cette étape supplémentaire augmente le temps d'analyse et rend la méthode peu intéressante.

###### **3.1.1.2 Extraction Liquide/Liquide :**

L'utilisation de l'extraction L/L est généralement limitée aux composés peu polaires (NP, OP). Certaines études ont montré que le meilleur solvant d'extraction pour les NP, était le dichlorométhane (DCM) avec des rendements variant de 87 à 98 % [18]. L'emploi de la technique d'extraction L/L en continu (solvant : DCM), permet d'atteindre des rendements d'extraction de l'ordre de 100 %, pour les NP [19]. En raison de sa toxicité et de sa volatilité importante, l'utilisation du DCM est à éviter, et donc, d'autres solvants d'extraction ont été testés lors du développement de la norme ISO/DIS 18857-1 [41], (hexane, cyclohexane, *tert*-butyl methyl ether, acétate d'éthyle, toluène). Avec un rendement d'extraction de 87 %, le toluène a finalement été retenu comme solvant d'extraction pour l'analyse des AP.

###### **3.1.1.3 Extraction sur phase solide (SPE) :**

Contrairement à l'extraction L/L, l'extraction SPE ne nécessite que peu de solvant et peut être automatisée. Préalablement, l'échantillon doit être filtré sur un filtre en fibre de verre (porosité : 1,2 µm ou moins) dans le but d'éliminer la phase particulaire pour éviter les risques de colmatage des supports SPE. Deux types sont principalement utilisés :

- **Carbone graphité** : Ce type de cartouche permet de préconcentrer les NP. L'élution est réalisée à l'aide d'un mélange DCM/méthanol 70 : 30 v/v [20].
- **Octadecylsilane C18 (ODS)** : Permet de préconcentrer les NP et les OP. Avant l'extraction, 1g d'octadecylsilane est préconditionné par 5 mL d'acétonitrile, 5 mL méthanol et 10 mL d'eau [21,22].

Cependant, il est important de noter que l'élimination de la phase particulaire lors de la filtration préalable engendre la perte des composés qui s'y trouvent adsorbés. (20 % selon l'étude d'Isobe et *al.* cf. § 2.2)

### 3.1.2 Matrice solide (boue, sédiment)

Préalablement à l'étape d'extraction, les échantillons solides (boue, sédiment) sont généralement séchés par lyophilisation. La faible volatilité des APE/AP rend cette opération possible sans perte à basse température.

#### 3.1.2.1 Extraction par Soxhlet :

Différents solvants ou mélanges de solvant d'extraction peuvent être utilisés pour extraire les AP, par Soxhlet, à partir d'échantillons solides :

- Hexane [23]
- Méthanol [23]
- DCM [24]
- Méthanol/DCM (1 : 2, v/v) [25]
- Acétone/hexane (59 : 41, v/v) [24]

#### 3.1.2.2 Extraction accélérée par solvant, ASE (Dionex®) :

Le principal avantage de l'ASE, outre sa rapidité et son automatisation, est sa faible consommation de solvant. Cette technique a été optimisée en vue de l'extraction du 4NP dans des échantillons de boue [26]. Différents solvants et mélanges de solvants ainsi que différentes températures d'extraction ont été évalués. Les paramètres optimisés sont les suivants :

- Solvant d'extraction : mélange acétate d'éthyle/ acide formique 9 :1 v/v
- Température d'extraction : 170° C
- Pression : 140 atm.

D'après la littérature [27, 38], les principaux solvants d'extraction utilisés en Soxhlet peuvent être également utilisés en ASE. La pression est comprise entre 100 et 140 atm. La température d'extraction est voisine de 100° C.

#### 3.1.2.3 Entraînement à la vapeur :

L'extraction des échantillons solides par distillation à la vapeur est possible mais cette méthode n'est actuellement que peu utilisée, principalement du fait de sa faible spécificité d'extraction.

#### 3.1.2.4 Extraction par Fluide Supercritique (SFE) :

1 g de boue lyophilisée est extrait par du CO<sub>2</sub> pur supercritique (345 atm.). Les AP sont extraits en deux phases successives (statique et dynamique) puis convertis en dérivés acétylés volatils en présence d'anhydride acétique et triéthylamine [28].

Un autre protocole est décrit pour l'extraction des NP. Préalablement à l'extraction, il est conseillé d'ajouter du méthanol à l'échantillon. Le méthanol joue le rôle de modificateur polaire ayant pour fonction d'améliorer le rendement d'extraction. L'extraction SFE (45 min, 100° C, 150 et 450 atm.) s'effectue avec du CO<sub>2</sub>/méthanol jusqu'à atteindre des taux de récupération de l'ordre de 85 % pour les NP [29].

### 3.2 ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

L'analyse des AP peut s'effectuer par chromatographie en phase gazeuse. De par leur volatilité importante, aucune étape de dérivation n'est absolument nécessaire. Les colonnes utilisées sont essentiellement capillaires et greffées d'une phase stationnaire faiblement polaire (OV1 / DB5 / SE 54)

#### 3.2.1 Détection par ionisation de flamme (FID) :

Dans la littérature récente consultée, ce type de détecteur n'est pratiquement plus présenté pour l'étude des AP.

#### 3.2.2 Détection par capture d'électrons (ECD) :

L'utilisation de ce type de détecteur nécessite une étape supplémentaire dans l'analyse des AP : la dérivation afin d'introduire des éléments halogènes sur la molécule. L'agent dérivant le plus fréquemment utilisé est le PFBCl (chlorure de pentafluorobenzyl). Dans le cas de l'étude des NP, la LD de ces composés étudiés en GC/ECD est de 2,9 pg/g de matière sèche [30]. Le détecteur ECD n'est actuellement que rarement utilisé. En effet, malgré sa bonne sensibilité, ce détecteur est rapidement pollué par les différents interférents de l'échantillon étudié.

#### 3.2.3 Détection par spectromètre de masse (MS) :

##### 3.2.3.1 Ionisation Electronique (EI) :

La GC/MS permet l'étude et l'analyse des OP, NP et NP<sub>n</sub>EO ( $1 \leq n \leq 3$ ). Par conséquent, la GC/EI/MS est la méthode d'analyse la plus fréquemment utilisée pour l'étude et l'analyse des AP [21,27,28 31,32].

Le spectre de masse des différents isomères du NP libre (non dérivatisés) a été décrit pour la première fois par Giger et *al.* [33], puis détaillé par Bhatt et *al.* [34] et Wheeler et *al.* [35]. L'ion moléculaire (M<sup>+</sup>) ( $m/z = 220$ ) est de faible abondance pour tous les isomères des NP. Les OP ne forment qu'un seul fragment ( $m/z = 135$ ) d'abondance plus faible que l'ion parent  $m/z = 206$ .

Dans le cas où une étape de dérivation (acétylation ou utilisation du chlorure de pentafluorobenzyle PFBCl) est mise en place, les spectres de masse du NP dérivatisé présentent les mêmes ions principaux que celui du NP libre. Seul l'ion moléculaire (M<sup>+</sup>) diffère. Dans le cas de l'acétylation, l'ion moléculaire est  $m/z = 262$  [28]. Pour la dérivation par PFBCl, l'ion moléculaire est  $m/z = 315$  [30]. Le spectre de masse de l'OP acétylé est caractérisé par un pic parent  $m/z = 135$  et un ion moléculaire M<sup>+</sup>  $m/z = 248$  [28].

Le tableau 3 présente les LD en fonction de la méthode d'extraction et de la matrice pour l'analyse des NP et OP.

**Tableau 3. LD pour l'étude et l'analyse des NP et OP en GC/EI/MS**

Matrice	Paramètre	Extraction	Analyse	LD	Référence
Eaux résiduaires	NP, OP	SPE (ODS)	GC/EI/MS	0,5 µg/L	[32]
Eaux de rivière	NP, OP	SPE (ODS)	GC/EI/MS DB-5	30-200 ng/L (NP) 50-250 ng/L (OP)	[21]
Boues	NP, OP	SFE (CO <sub>2</sub> )	GC/EI/MS HP-5MS	100 ng/kg (NP) 10 ng/kg (OP)	[28]
Sédiments, boues	NP	Soxhlet + dérivatisation	GC/EI/MS DB-5MS	1,4 ng/kg	[30]

### 3.2.3.2 Ionisation Chimique Négative (NCI) :

D'après la littérature, l'utilisation de la GC/MS en mode d'ionisation chimique négative (NCI) est peu courante pour l'analyse des AP. Une étape de dérivatisation des NP par le PFBCl s'avère nécessaire afin de produire des ions moléculaires intenses en présence de méthane (gaz réactant) [18]. En NCI, l'ion spécifique choisi pour la détection des NP est l'ion  $m/z = 414$ .

Par ce mode d'ionisation, la limite de détection des NP est cinq fois plus faible qu'en mode d'ionisation par impact électronique. La sensibilité est également améliorée [30].

**Tableau 4. Comparaison de la LD pour l'étude et l'analyse des NP et OP en fonction du détecteur**

Matrice	Paramètre	Extraction	Analyse	LD	Référence
Sédiments et boues	NP	Soxhlet + dérivatisation	GC/ECD DB-5	2,9 ng/kg	[30]
			GC/EI/MS DB-5MS	1,4 ng/kg	
			GC/NCI/MS DB-5MS	0,3 ng/kg	

## 3.3 SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Selon la littérature étudiée, la chromatographie en phase liquide peut également être utilisée comme méthode de séparation chromatographique.

La HPLC en phase normale ne peut être appliquée qu'à l'étude des NP et NPnEO ( $1 \leq n \leq 5$ ). [36]. A contrario, la HPLC en phase inverse permet l'étude et l'analyse des NP, des NPnEO ( $1 \leq n \leq 2$ ) mais également des OP. Dans certaines publications récentes [37, 38], la séparation chromatographique en phase liquide des AP peut s'effectuer simultanément par exclusion stérique et adsorption en phase inverse. Il est constaté toutefois une élution plus rapide de l'OP que du NP. Cela suggère que le mécanisme de séparation en phase inverse prédomine sur le mécanisme d'exclusion stérique [38]. Pour l'étude des AP en HPLC, une étape supplémentaire de dérivatisation n'est pas nécessaire [24].

### 3.3.1 Détection par UV et fluorescence :

Pour les AP, la présence du groupe phénol permet d'utiliser la détection par fluorescence, la détection UV ainsi que la détection par barrette de diodes. Ces deux derniers détecteurs ne sont toutefois plus utilisés pour l'analyse des AP [24].

L'analyse de AP à partir de matrices environnementales peut être réalisée par HPLC couplée à un détecteur par fluorescence [5, 20, 22, 29, 39]. Pour ce mode de détection, la longueur d'onde d'excitation est fixée à 230 nm et la longueur d'onde d'émission à 300 nm. Ce type de détecteur permet d'obtenir des LD comprises entre 1 et 40 ng/g de matière sèche pour les boues [36].

### 3.3.2 Détection par SM :

Plus récemment, des méthodes de HPLC (en phase inverse ou exclusion stérique-phase inverse), couplée à la détection par SM ont été décrites pour l'étude des NP et des OP [36].

#### 3.3.2.1 Ionisation par Electrospray (ESI):

Le mode d'ionisation par électrospray (ESI) est une technique très utilisée du fait de son large champs d'application. Selon Ferguson et *al.* [37], la HPLC-ESI-MS permet d'étudier les NP à partir de matrices complexes (sédiments, eaux de rejet) avec une bonne sensibilité, sélectivité et précision. Pour l'analyse des NP et OP, l'ionisation par électrospray est plus sensible que la méthode d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) [36]. Cette meilleure sensibilité s'explique par un bruit de fond beaucoup moins important en ESI qu'en APCI.

**Tableau 5. LD et LQ pour l'étude et l'analyse des NP et OP en CL/MS/ESI**

NP		OP	
Matrice eau	Matrice sédiment	Matrice eau	Matrice sédiment
LD = 0,2 ng/L	LD = 0,9 ng/L	LD = 0,3 ng/L	LD = 1,4 ng/L
LQ = 10 ng/L	LQ = 40 ng/g de poids sec	LQ = 9 ng/L	LQ = 40 ng/g de poids sec

La HPLC en couplage MS/MS en tandem est possible. Selon Loyo-Rosales [38], la LD obtenue est alors comparable à celle obtenu en HPLC/MS, mais la sélectivité est supérieure.

#### 3.3.2.2 Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI) :

Cette technique d'ionisation permet la formation d'ions dans la phase gazeuse. Pattanaargson et *al.* [40] ont utilisé cette méthode d'ionisation associée à la MS pour déterminer la distribution des différents oligomères d'un mélange commercial (Tergitol) comprenant entre autres des NP.

### 3.4 RECAPITULATIF DES DOMAINES D'APPLICATION DES PRINCIPALES METHODES D'ANALYSE DES AP ET DERIVES

La grande hétérogénéité de polarité entre les AP et leur dérivés éthoxylés rend l'analyse de ces composés délicate. La figure 3 représente de façon synthétique les possibilités d'application des principales méthodes d'analyse utilisées pour l'étude des AP et APEO.

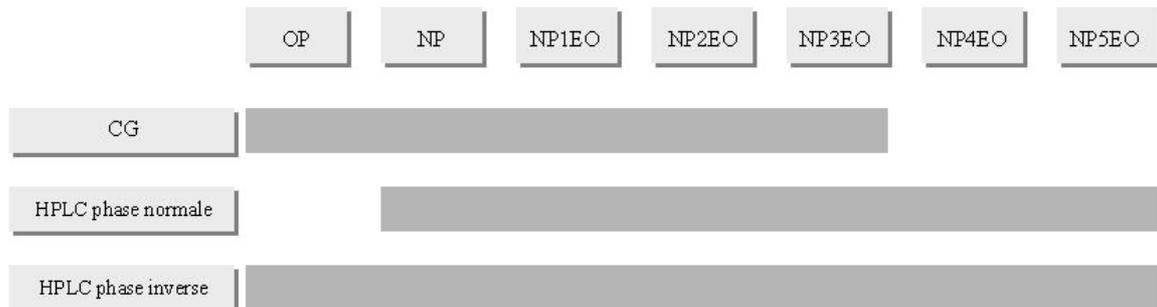


Figure 3. Domaines d'application pour les différentes méthodes d'analyses des AP et dérivés

## 4. ESSAI INTERLABORATOIRES : VALIDATION DU PROJET DE NORME ISO/DIS 18857-1

### 4.1 PRESENTATION DE L'ESSAI

Dans le but de valider la norme internationale ISO/DIS 18857-1 « *Qualité de l'eau – Dosage des alkylphénols sélectionnés – Partie 1 : Méthode pour échantillons non filtrés par extraction en phase liquide et chromatographie en phase gazeuse et détection sélective de masse* » [41], l'INERIS a participé à un essai interlaboratoires regroupant 18 laboratoires issus de 6 pays différents.

### 4.2 MODE OPERATOIRE

Cet essai interlaboratoires, a porté sur la détermination de l'octylphénol (N° CAS 140-66-9) et du mélange technique de nonylphénols (N° CAS 25154-52-3) dans les matrices eau de surface (2 échantillons) et eau usée de sortie de station d'épuration (1 échantillon). L'utilisation de ce mélange technique s'explique par le fait qu'il se compose de plus de 80 % de 4-nonylphénol (N° CAS 84852-15-3).

Cet essai interlaboratoires s'appuie sur le projet de norme ISO/DIS 18857-1 visant à doser les isomères du 4-nonylphénol (N° CAS 84852-15-3) et le 4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol (N° CAS 140-66-9) dans les échantillons non filtrés provenant d'eaux de consommation, d'eaux souterraines et d'eaux de surfaces, dans une gamme de concentration de 5 ng/L à 200 ng/L. Selon la matrice, cette méthode peut être applicable aux eaux usées dans une concentration de 0,1 µg/L à 50 µg/L.

L'extraction des 4-nonylphénols et du 4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol est réalisée à partir de la matrice eau via une méthode d'extraction liquide/liquide avec un solvant organique (toluène). L'extrait est ensuite purifié sur gel de silice.

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'un mélange technique de 4-nonylphénol (1 ng/µL) ainsi que du 4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol (1 ng/µL). Le dosage s'appuie sur un étalonnage interne. L'étalon interne recommandé par le projet de norme ISO/DIS 18857-1 est le 4-*n*-nonylphénol [cycle <sup>13</sup>C<sub>6</sub>] (C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] H<sub>4</sub>-OH) à une concentration de 1 ng/µL (N°CAS 104-40-5)

La quantification et l'identification des 4-NP et OP est effectuée en spectrométrie de masse grâce aux ions spécifiques suivants :

**Tableau 6. Ions quantifiants et qualifiants préconisés pour l'étude du 4-NP et de l'OP (ISO/DIS 18857-1)**

Composés	Ions quantifiants (uma)	Ions qualifiants (uma)
4-nonylphénol	135, 107	135, 107
4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol	135, 107	135, 107
4- <i>n</i> -Nonylphénol [cycle <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ] (Etalon interne)	113	113

Il est à noter que des précautions doivent être prises pour éviter que l'échantillon soit contaminé par contact direct avec du matériel en matière plastique (susceptible de contenir des alkylphénols).

### 4.3 RESULTATS DE L'ESSAI

Pour l'octylphénol, un bon accord entre concentration théorique et concentration moyenne (taux de récupération compris entre 87 et 100 %) ainsi que des coefficients de variation jugés satisfaisants ( $CV_R < 30 \%$ ) ont permis de valider la méthode proposée dans cette norme.

Pour les 4-nonylphénols, les résultats en terme de justesse et de répétabilité ont été jugés satisfaisants pour l'ensemble des laboratoires pour des concentrations de l'ordre de 100 à 1000 ng/L (taux de récupération compris entre 92 et 112 %,  $CV_R$  entre 20 et 30 %). Cependant, pour un niveau de concentration de l'ordre de la dizaine de ng/L, le  $CV_R$  élevé (57 %) paraît indiquer que cette concentration est voisine du bas du domaine d'application de la norme.

Les résultats de cet essai interlaboratoires tendent à prouver la fiabilité de la méthode avec une limite d'applicabilité inférieure réévaluée à 25 ng/L pour les nonylphénols et permettent donc de valider la norme ISO 18857-1, dont le texte définitif inclura les résultats de cet essai.

**Tableau 7. Résultats de l'essai interlaboratoires (validation du projet de norme ISO/DIS 18857-1)**

	Matrice	Paramètre	Valeur de référence	Moyenne consensuelle hors abbérants	Résultats de l'INERIS
Alkyl 1	Eau de surface	4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol	19,0 ng/L	16,6 ng/L	15,7 ng/L
		4-nonylphénol	23,0 ng/L	28,7 ng/L	135,5 ng/L
Alkyl 2	Eau de surface	4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol	75,0 ng/L	66,8 ng/L	73,1 ng/L
		4-nonylphénol	90,0 ng/L	82,8 ng/L	188 ng/L
Alkyl 3	Eau résiduaire	4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol	1,40 µg/L	1,40 µg/L	0,73 µg/L
		4-nonylphénol	1,80 µg/L	2,02 µg/L	1,575 µg/L

Concernant les résultats fournis par l'INERIS, les valeurs mesurées sont acceptables pour les trois matrices d'un point de vue justesse (taux de récupération compris entre 83 et 97 % dans les eaux de surface) et répétabilité ( $CV_r$  compris entre 7 et 10 %) pour l'octylphénol, ainsi que pour les 4-nonylphénols à forte concentration. En revanche, pour des niveaux de concentration plus faibles, le dosage de ces derniers composés a posé des difficultés avec des taux de récupération supérieur à 200 %. Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer les écarts observés, notamment :

- Une dégradation des composés dosés dans les extraits et/ou dans les étalons. Bien que les alkylphénols soient des molécules très stables (température de décomposition proche de 300°C), l'hypothèse d'une dégradation d'un des composés a tout de même été considérée ;

- Une pollution éventuelle survenue lors de l'analyse. Le dosage des alkylphénols nécessite un grand nombre d'étapes de préparation au cours desquelles tout risque de contamination ne peut être exclu. En effet, les alkylphénols peuvent s'adsorber sur différents types de matériel de laboratoire ;
- Une cause analytique liée à l'appareillage. Les analyses ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse de type trappe d'ions. La sensibilité de ce détecteur peut varier de façon notable au cours du temps ce qui pourrait engendrer une erreur de mesure sur les résultats lors d'une séquence d'analyse comportant un grand nombre d'échantillons ;
- Une cause liée à une quantité analysée trop faible par rapport à la limite de quantification pouvant être atteinte par l'INERIS.

Dans le but de vérifier toutes ces hypothèses, différentes séries d'analyses ont donc été réalisées.

## **5. ETUDE DE L'ANALYSE DES ALKYLPHENOLS**

---

### **5.1 ETUDE DE LA STABILITE DES COMPOSES**

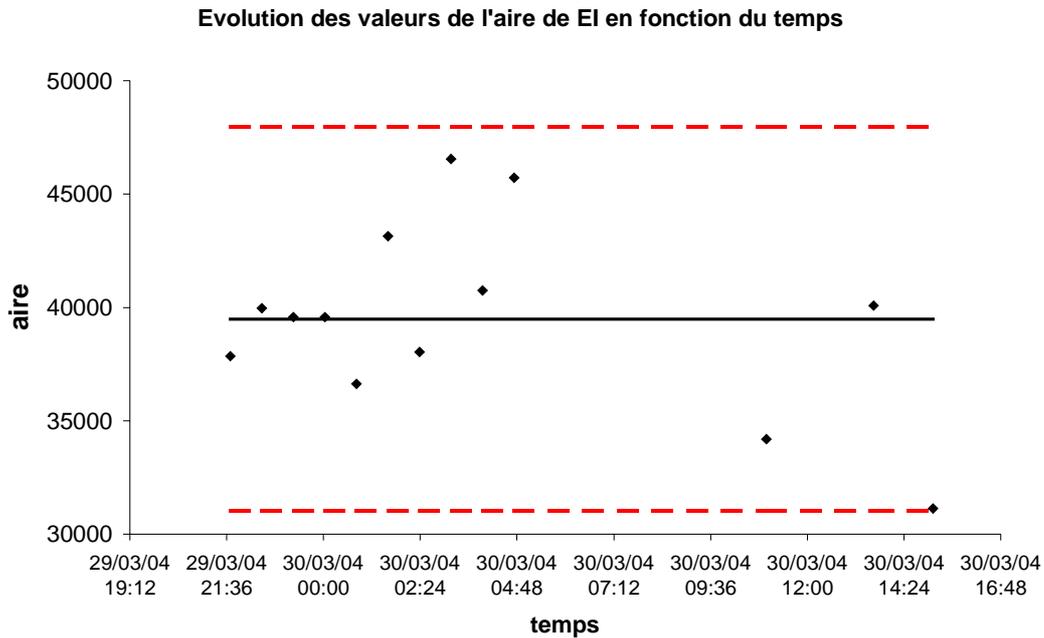
La stabilité des différentes molécules utilisées au cours du dosage (le 4-*tert*-octylphénol, le mélange des 4-nonylphénols et le 4-*n*-nonylphénol marqué au <sup>13</sup>C sur le cycle aromatique) a été étudiée en effectuant plusieurs suivis cinétiques de solutions synthétiques contenant ces composés. En effet, une dégradation de l'étalon interne conduirait à surestimer la concentration des alkylphénols contenus dans les échantillons.

Les deux études présentées dans ce document ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse de type quadropôle afin de s'affranchir des variations importantes de sensibilité rencontrées lors de l'utilisation de la trappe d'ions.

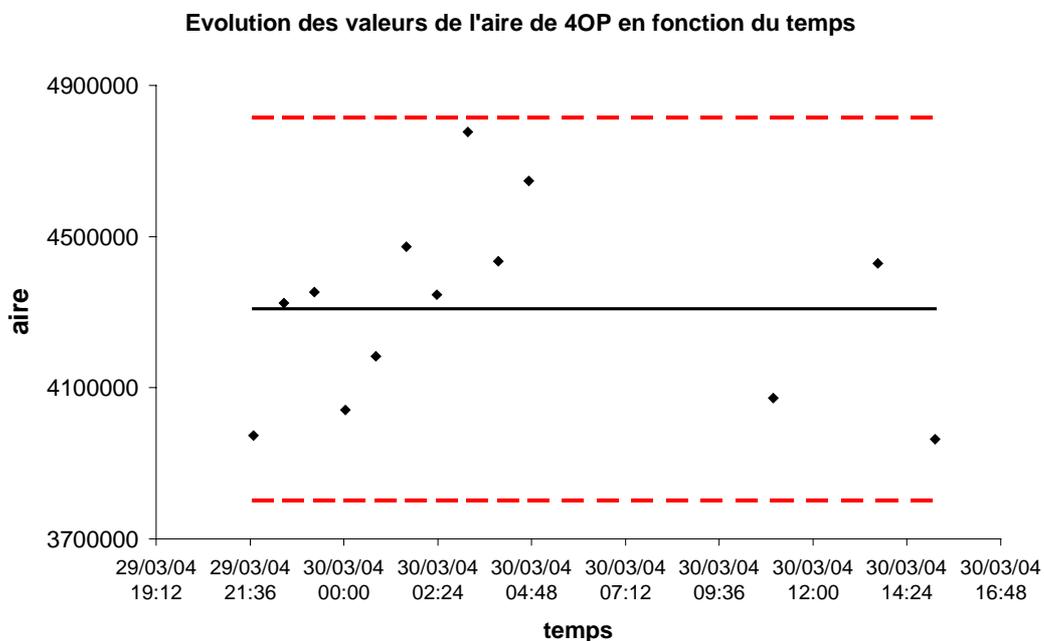
#### **5.1.1 Première étude cinétique**

Cette première étude a porté sur une solution synthétique contenant 40 µg/L de 4-*n*-nonylphénol marqué au <sup>13</sup>C sur le cycle aromatique (EI\*), 3 mg/L de 4-nonylphénol (4NP) et 2,6 mg/L de 4-*tert*-octylphénol (4OP).

Les résultats obtenus mettent en évidence une bonne stabilité des composés, notamment de EI\* sur une période d'environ un jour (tableau en annexe 2). En effet, durant cet intervalle de temps, et quel que soit le composé considéré, les valeurs d'aires mesurées sont toujours comprises dans un intervalle de +/- deux écarts types autour de la moyenne des valeurs (figures 4 à 7). Au-delà de 24 heures, le signal augmente jusqu'à atteindre deux jours plus tard, environ 250 % et 150 % de la valeur moyenne respectivement, pour l'étalon interne (EI\*) et les 4-alkylphénols (4OP et 4NP) (figure 4).



**Figure 4. Etude de l'évolution de l'aire mesurée pour 40 µg/L d'étalon interne (EI\*) en fonction du temps. Moyenne +/- deux écart-type**



**Figure 5. Etude de l'évolution de l'aire mesurée pour 2,6 mg/L de 4-tert-octylphénol (4OP) en fonction du temps. Moyenne +/- deux écart-type**

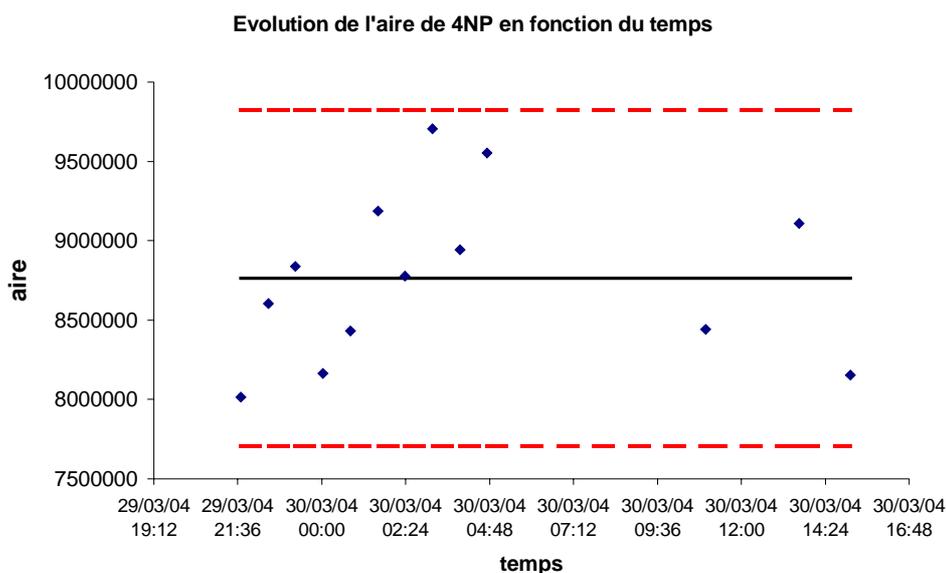


Figure 6. Etude de l'évolution de l'aire mesurée pour 3 mg/L de 4-nonylphénol (4NP) en fonction du temps. Moyenne +/- deux écart-type

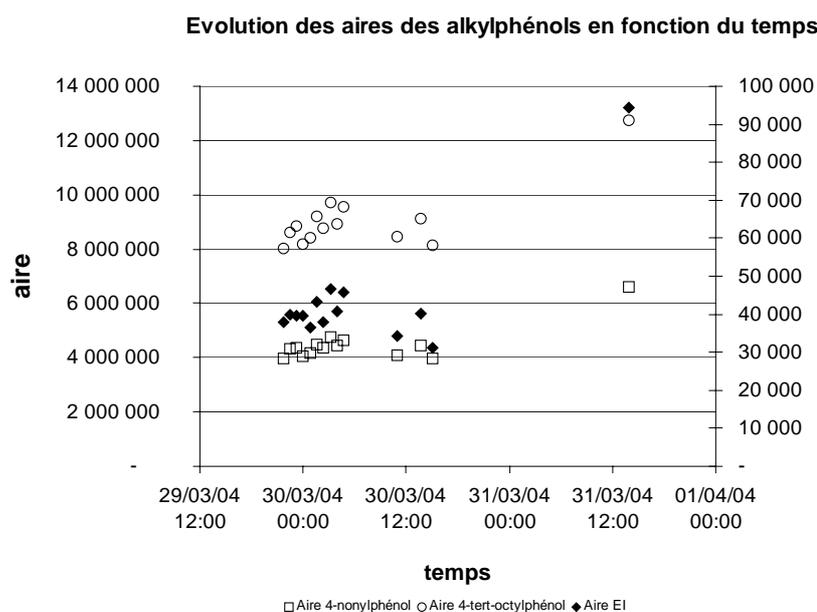


Figure 7. Etude de l'évolution de l'aire mesurée pour 40 µg/L de EI\*, 3 mg/L de 4NP, et 2,6 mg/L de 4OP en fonction du temps.

Il est donc important de noter qu'au cours de cette première étude, aucune dégradation des composés n'est observée. La surestimation des concentrations n'est donc pas liée à une dégradation de l'étalon interne au cours du temps.

En revanche, l'augmentation du signal observée au-delà d'un jour pourrait être en partie expliquée par une dérive normale des réglages de l'appareil au cours du temps en raison de deux phénomènes possibles :

- Une dérive de la calibration en masse. Dans ce cas, le détecteur ne mesure plus le maximum du pic de masse, ce qui se traduit alors par une perte en sensibilité. (voir seconde étude cinétique)
- Une baisse ou une augmentation du maximum du pic de masse mesurée qui engendrerait une baisse ou une augmentation de la sensibilité.

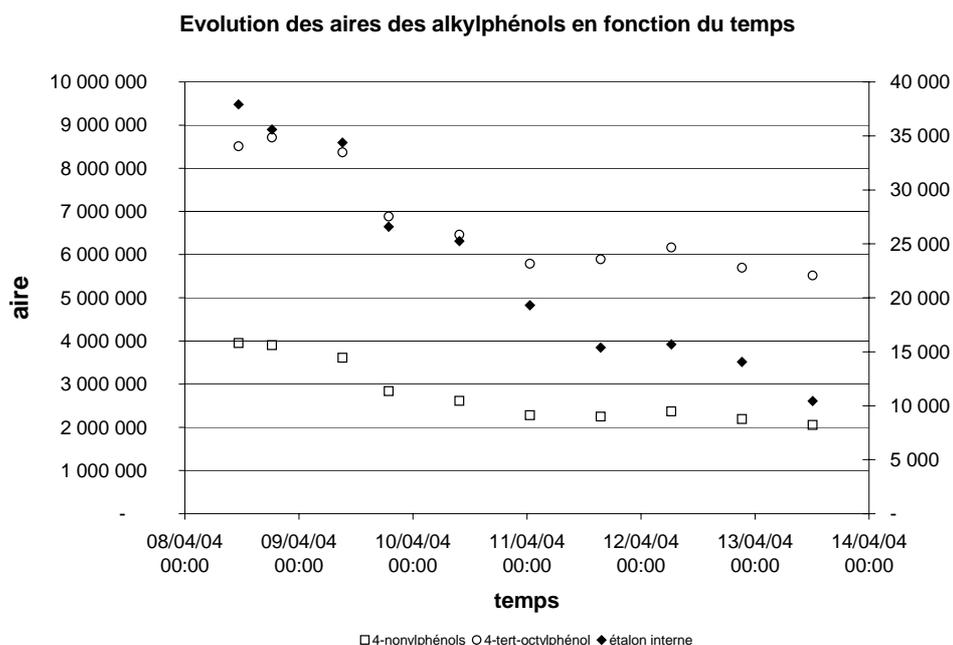
Afin de palier ces inconvénients, le constructeur recommande de réaliser quotidiennement une calibration en masse de l'appareil. Cependant, lors de longues séries d'analyses, il est peu judicieux d'arrêter la séquence d'acquisitions pour recalibrer le spectromètre.

Des problèmes chromatographiques pourraient également engendrer de tels phénomènes. En effet, les variations importantes du signal sont généralement observées après l'injection d'échantillons réels. La saturation progressive de l'insert par des composés extraits lors de l'étape d'extraction liquide/liquide pourrait entraîner une altération progressive du signal soit liée directement à l'adsorption ou bien à un relargage.

### 5.1.2 Seconde étude cinétique

Afin de confirmer les résultats précédents, une seconde étude cinétique a été réalisée. Elle a porté sur le suivi des aires des différents alkylphénols : EI\* (40 µg/L), 4OP (2,6 mg/L), et 4NP (3 mg/L). La solution synthétique a été analysée sur environ 5 jours en mode triplicat (tableau en annexe 3).

La figure 8 présente les moyennes pour chaque série de triplicats. Comme lors de l'étude précédente, la solution est stable sur environ un jour. En effet, les variations observées au cours de cette période sont inférieures à 20 %. En revanche, comme dans l'étude précédente, au-delà d'un jour, une variation importante de sensibilité est observée avec une baisse de 30 % pour 4OP, de 50 % pour 4NP, et de 300 % pour EI\*. Cette variation est actuellement attribuée à un dérèglement de l'appareil. (Voir paragraphe voir 5.1.1.)



**Figure 8. Etude de l'évolution de l'aire mesurée pour 40 µg/L de EI\*, 3 mg/L de 4NP, et 2,6 mg/L de 4OP en fonction du temps.**

### 5.1.3 Conclusion des études cinétiques

Les deux études cinétiques réalisées afin de caractériser la stabilité des composés chimiques à doser n'ont pas mis en évidence de dégradation sur une période d'un jour, temps généralement nécessaire à la réalisation d'une séquence d'analyses. La surestimation observée au cours de l'essai interlaboratoires ne peut donc être attribuée à un tel phénomène.

## 5.2 ETUDE D'UNE EVENTUELLE POLLUTION

Une deuxième hypothèse envisagée pour expliquer les résultats de l'essai interlaboratoires de 2002 est celle d'une éventuelle pollution des échantillons lors de leur préparation. Afin de vérifier cette hypothèse, une série d'échantillons reconstitués ont été analysés à l'aide d'un spectromètre de masse de type trappe d'ions, identique à celui employé pour l'essai interlaboratoires de la norme ISO/DIS 18857-1.

Les échantillons ont été préparés en dopant de l'eau minérale d'Evian® à l'aide de solutions synthétiques d'alkylphénols. Les niveaux de concentrations étaient de l'ordre de grandeur de ceux étudiés lors de l'essai interlaboratoires de mars et avril 2002 :

- Respectivement 50 ng/L et 40 ng/L pour les 4-nonylphénols et pour le 4-*tert*-octylphénol dans le cas d'une eau faiblement chargée ;
- Respectivement 1 600 ng/L et 1 300 ng/L pour les 4-nonylphénols et pour le 4-*tert*-octylphénol dans le cas d'une eau fortement chargée.

Les résultats obtenus (tableau 8) mettent en évidence une surestimation moyenne de 40 % de la concentration en 4-nonylphénol dans le cas d'une eau faiblement chargée. En revanche, pour une eau fortement chargée le rendement moyen sur deux extractions est de 95 %.

**Tableau 8 Résultats d'analyse de dopage à deux niveaux de concentration pour les 4-nonylphénols réalisées en mode duplicat**

<i>4-nonylphénols</i>		
valeur de dopage (ng)	Quantité mesurée (ng)	Rendement(%)
51	72	141
1 590	1 510	95

Au cours de cette étude, l'analyse de blancs d'échantillons d'eau minérale d'Evian® non dopés a été réalisée. Les chromatogrammes présentent des pics parasites dans la région d'éluion des nonylphénols mettant en évidence une pollution lors du traitement des échantillons, ou lors de contacts avec du matériel de laboratoire. Cependant, la valeur obtenue après intégration n'excède pas 10 % de la valeur obtenue pour l'analyse de l'échantillon à 50 ng/L. Il est donc probable qu'une pollution, ou qu'un bruit de fond important peut contribuer à la surestimation de la concentration des alkylphénols pour des échantillons faiblement chargés, mais elle ne permet en aucun cas de l'expliquer totalement.

En raison de ces derniers résultats, nous avons décidé d'étudier de façon plus approfondie le domaine d'application et la limite de quantification de l'analyse.

### **5.3 CARACTERISATION DE LA METHODE ANALYTIQUE**

#### **5.3.1 Introduction**

Dans le projet de norme 18857-1, le domaine d'application est défini pour pouvoir doser des concentrations de l'ordre de 20 ng/L pour les 4-nonylphénols et de 5 ng/L pour le 4-*tert*-octylphénol.

Cependant, nous avons réalisé une enquête auprès de quelques laboratoires dans le but de connaître les limites de quantification qu'ils pensent obtenir pour ce type d'analyse. A cet effet, nous avons consulté une partie des dossiers des laboratoires participant à la campagne de recherche et de réduction des rejets des substances dangereuses dans l'eau (RSDE<sup>1</sup>) en appui à la Directive Cadre sur l'Eau<sup>2</sup>.

Seul un petit nombre de laboratoires a été étudié. Parmi ceux qui pratiquent le projet de norme ISO/DIS 18857-1, la majorité annonce des limites de quantification de l'ordre de 100 ng/L pour l'ensemble des nonylphénols, et aucun ne revendique la valeur annoncée de 20 ng/L pour la coupe des 4-nonylphénols.

Nous avons donc déduit de cette enquête qu'il était difficile pour les laboratoires, d'atteindre la valeur basse du domaine d'application du projet de norme. Aussi, avons nous décidé de réaliser une nouvelle série d'analyses d'échantillons pour confirmer cette observation.

---

<sup>1</sup> RSDE : Recherche des Substances Dangereuses dans l'Eau. Site Internet : <http://rsde.ineris.fr>

<sup>2</sup> Directive européenne 2000/60/CE

## 5.3.2 Etude et résultats

### 5.3.2.1 Objectif de l'étude

L'étude a été réalisée en utilisant des échantillons reconstitués à partir d'eau minérale d'Evian® et de solutions synthétiques d'alkylphénols. Les résultats des analyses précédemment réalisées à l'INERIS, ainsi que l'étude des données des laboratoires examinés précédemment, nous ont permis de fixer deux niveaux de concentration différents :

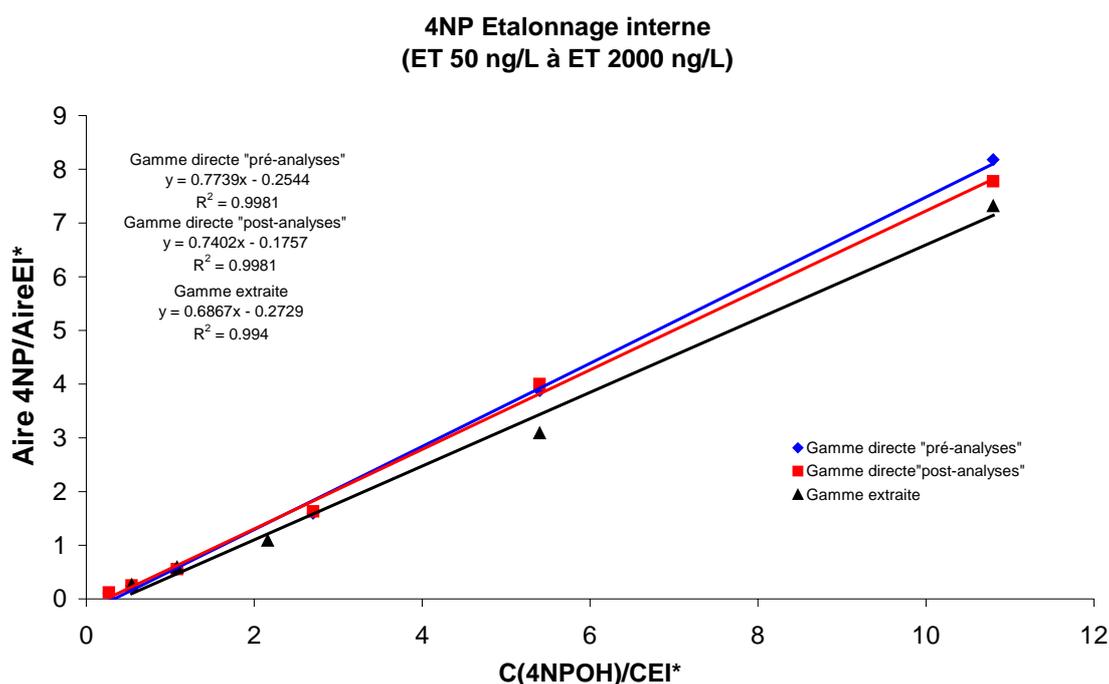
- Deux échantillons à 50 ng/L en 4-nonylphénols ont été étudiés afin de mettre en évidence l'impossibilité de déterminer avec précision une concentration si basse.
- Deux échantillons à 100 ng/L en 4-nonylphénols ont été choisis pour définir la limite de quantification de la méthode analytique.

L'étalonnage a été réalisé à partir d'une gamme extraite, c'est-à-dire ayant subi un traitement identique à celui appliqué à l'échantillon. Le rendement d'extraction a été contrôlé à partir de l'injection d'une gamme d'étalons synthétiques. L'analyse de « blancs », c'est à dire d'échantillons ne contenant pas de composés, a également été effectuée afin de contrôler d'éventuelles pollutions. Enfin, les calculs de concentration ont été effectués en tenant compte de l'étalon interne, le 4-*n*-nonylphénol marqué au <sup>13</sup>C sur le cycle aromatique.

Nous nous attacherons dans cette partie à détailler le cas des 4-nonylphénols qui posaient le plus de problèmes pour l'essai interlaboratoires. Cependant, les courbes d'étalonnage et les limites de quantification seront données en annexe 4 pour le cas du 4-*tert*-octylphénol.

### 5.3.2.2 Domaine d'application

La figure 9, représente les trois gammes d'étalonnage établies lors de notre étude. Deux gammes directes ont respectivement été analysées en début et en fin de séquence, afin de s'assurer de la stabilité de la chaîne analytique. Une gamme extraite a également été réalisée afin de déterminer les concentrations des échantillons en tenant compte du rendement d'extraction.



**Figure 9** Courbes d'étalonnage interne pour le 4NP.

Les résultats obtenus mettent en évidence une assez bonne régression linéaire avec un coefficient de détermination  $r^2$  supérieur à 0,99. Par ailleurs, lorsque l'on considère les gammes réalisées en début et fin d'analyse, il est à noter que la pente et l'ordonnée à l'origine varient très peu sur la période de deux jours étudiée.

Au cours de cette étude le domaine de concentrations étudié s'étendait de 50 ng/L à 2 000 ng/L, ce qui nous a finalement permis de définir un domaine d'application de la méthode pour des concentrations variant de 100 ng/L à 2 000 ng/L. Enfin, la stabilité de l'appareil permet de réaliser des analyses sur une période d'au moins deux jours.

### 5.3.2.3 Limite de quantification

Afin de déterminer une limite de quantification pour l'analyse, nous avons décidé d'étudier deux types d'échantillons d'eau d'Evian, dopés en 4-nonylphénols aux niveaux de concentration suivants : 50 ng/L et 100 ng/L.

Le dosage des deux échantillons de concentration nominale 50 ng/L a conduit à des valeurs de l'ordre de 80 ng/L soit une surestimation de 40 % de la valeur attendue. En revanche, les valeurs obtenues pour les deux échantillons de concentration nominale 100 ng/L ont abouti à de très bons accords d'environ 100 %, respectivement 102 et 103 %.

Ainsi, la méthode appliquée et le matériel employé ne permettent pas de mesurer avec précision des valeurs de concentration inférieures à 100 ng/L. Nous avons donc choisi de définir 100 ng/L comme limite de quantification et de la vérifier en injectant successivement 10 fois l'extrait obtenu de l'échantillon à 100 ng/L afin de tester la répétabilité de la mesure. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 9.

**Tableau 9. Vérification de la limite de quantification pour le 4NP.**

<b>4-nonylphénol</b>		
<b>valeur ciblée (ng)</b>	<b>valeur mesurée (ng)</b>	<b>Rendement(%)</b>
108	122	113
108	125	116
108	115	107
108	118	109
108	122	113
108	122	113
108	114	106
108	112	103
108	113	104
108	111	103
Moyenne	117	109
Ecart type	5	5
CVr	5%	

En moyenne, la concentration mesurée est de 117 ng/L pour une concentration ciblée de 108 ng/L, soit un rendement moyen de 109 % et le coefficient de variation associé est de 4 %. Ces données permettent d'effectuer les tests préconisés par la norme française XP T 90 210 afin de vérifier la justesse et la fidélité de la limite de quantification choisie.

$$\text{Si } \left| \frac{LQ - \bar{u}_{LQ}}{\frac{S_{LQ}}{\sqrt{n}}} \right| < 10 \text{ alors la limite de quantification est juste}$$

Si  $CV_r < 20\%$  alors la limite de quantification est fidèle

Avec :

LQ : Limite de Quantification

- $u_{LQ}$  : Moyenne des  $n$  analyses réalisées à la LQ  
 $SLQ$  : Ecart-type des  $n$  analyses réalisées à la LQ  
 $n$  : nombre d'analyses réalisées à la LQ  
 $CV_r$  : Coefficient de variation

Dans notre étude les valeurs obtenues pour ces deux critères sont :

$$\left| \frac{LQ - \bar{u}_{LQ}}{\frac{SLQ}{\sqrt{n}}} \right| = 6$$

$$CV_r = 5 \%$$

La limite quantification choisie est donc acceptable au sens de la norme XP T 90-210. Si les critères semblent montrer une marge permettant d'espérer un abaissement de la LQ, en revanche, les mesures réalisées à 50 ng/L montrent que cette valeur ne pourra toutefois pas être atteinte.

## 6. CONCLUSION

---

L'inventaire des différentes méthodes de préparation des échantillons et d'analyse des 4-NP et de l'OP pour différents types de matrices (eau, boue et sédiment), à partir de la littérature scientifique, nous a permis de mettre en évidence que la GC/MS et la LC/MS étaient les deux méthodes les plus adaptées et les plus couramment employées pour l'analyse de ces composés.

L'étude des limites de détection associées au domaine d'application de la LC/MS et de la GC/MS confère à cette dernière méthode un spectre d'utilisation plus intéressant pour l'étude des 4NP et OP (substances dont l'étude est préconisée par la norme ISO/DIS 18857-1). Par conséquent, la GC/MS reste la méthode de référence pour le développement du dosage des AP.

Aux mois de mars et avril 2002, l'INERIS a participé à l'essai interlaboratoires international servant à valider la norme ISO/DIS 18857-1. Les résultats obtenus ont montré que la limite de quantification préconisée pour les 4-nonylphénols était trop basse. Cette dernière a donc été réévaluée pour être fixée à 20 ng/L au lieu de 5 ng/L.

D'autre part, les résultats rendus par l'INERIS pour les 4-nonylphénols étaient surestimés pour les basses concentrations. L'étude entreprise pour expliquer cet écart a montré qu'il était difficile d'estimer correctement des concentrations en 4-nonylphénols pour des valeurs inférieures à 100 ng/L. Cette difficulté s'explique en partie par le risque de pollutions, mais également en raison du type de détecteur employé et de son mode d'utilisation, c'est à dire la trappe à ions en mode SIS. Il est probable que les valeurs annoncées par la norme pourraient être atteintes avec l'utilisation d'un détecteur de type quadripôle en mode SIM.

## REFERENCES

---

- 1      OSPAR  
OSPAR strategy with regard to hazardous substances, OSPAR convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic.  
OSPAR (1998) 98/14/1 annexe 34.
- 2      Decision N° 2455/2001/EC of the European Parliament and of the council of 20 november 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC.  
Official Journal (2001) L249 : 27-30
- 3      European commission Directorate  
General environment socio-economic impacts of the identification of priority hazardous substances under the Water Framework Directive. Final report.  
Risk and policy analysts limited, Norfolk (2002).
- 4      Poremski  
Use pattern of nonylphenol ethoxylates and their application properties (1991) 23-40.  
In Proceedings of the seminar on nonylphenol ethoxylates and nonylphenol. Saltsjöbaden, (1991).  
Inguar Bingman, publ., Stockholm ISBN91-620-3907-5.
- 5      Ahel M., Giger W., Koch M.  
Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment – I. Occurrence and transformation in sewage treatment.  
Wat. Res. (1994) 28 : 1131-1142.
- 6      Ying G-G., Williams B., Kookana R.  
Environmental fate of alkylphenols and APE – a review.  
Environment International (2002) 28 : 215-226.
- 7      Maguire R.J.  
Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments.  
Water Qual. Res. J. Canada (1999) 34.
- 8      Isobe T., Nishiyama H., Nakashima A., Takada H.  
Distribution and behaviour of nonylphenol, octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area : their association with aquatic particles and sedimentary distributions.  
Environ. Sci. Technol. (2001) 35 : 1041-1049.
- 9      Hale M.  
Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls.  
Environ. Toxicol. Chem. (2000) 19 : 946-952.
- 10     Bennie D. T.  
Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates.  
Water. Qual. Res. J. Canada (1999) 34.
- 11     Atienzar F. A., Billingham Z., Depledge M. H.  
4-*n*-nonylphenol and 17-beta-estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae  
Environ. Pollut. (2002) 120 : 735-738.

- 
- 12 Servos M.R.  
Review of the aquatic toxicity estrogenic responses and bioaccumulation of AP and APE.  
Water. Qual. Res. J. Canada (1999) 34.
  - 13 Chitra K. C., Latchoumycandane C., Marthur P. P.  
Effect of nonylphenol on the antioxydant system in epididymal sperm of rats.  
Archives of toxicology (2002) 76 : 545-551.
  - 14 Adeoya-Osiguwa S. A., Markoulaki S., Pocock V., Milligan S. R., Fraser L. R.  
17-beta-estradiol and environmental estrogens significantly effect mammalian sperm function.  
Human Reproduction (2003) 18 : 100-107.
  - 15 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.
  - 16 Lee H. B.  
Review of analytical methods for the determination of nonylphenol and related compounds in environmental samples.  
Water. Qual. Res. J. Canada (1999) 34.
  - 17 Ahel M., Giger W.  
Determination of alkylphenols and alkylphenol mono and diethoxylates in environnmenatl samples by high performance liquid chromatography.  
Anal. Chem. (1985) 57 : 1577-1583.
  - 18 Wahlberg C., Renberg L., Wideqvist U.  
Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylate as their pentafluorobenzoates in water, sewage sludge and biota.  
Chemosphere (1990) 20 : 179-195.
  - 19 Stephanou E., Giger W.  
Persistent organic chemicals in sewage effluents. Quantitative determination of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography.  
Environ. Sci. Technol. (1982) 16 : 800-805
  - 20 Di Corsia A., Samperi R., Marcomini A.  
Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid phase extraction and liquid chromatography.  
Environ. Sci. Technol. (1994) 28 : 850-858.
  - 21 Blackburn M. A., Waldock M.J.  
Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales.  
Water Res. (1995) 29 : 1623-1629.
  - 22 Marcomini A., Corcia A., Samperi R., Capri S.  
Reversed phase high performance liquid chromatographic determination of linear alkylbenzene sulphonates, nonylphenol poly ethoxylates and their carboxylic biotransformation products.  
J. Chromatograph. (1993) 644 : 59-71
  - 23 Marcomini A., Cecchi F., Sfriso A.  
Analytical extraction and environmental removal of alkylbenzne sulphonates, nonylphenols and nonylphenol monoethoxylates from dated sludge-only landfills.  
Environ. Technol. (1991) 12 : 1047-1054.

- 
- 24 Lee H-B., Peart T. E., Bennie D. T., Maguire R. J.  
 Determination of nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic acid metabolites in sewage treatment plant sludge by supercritical carbon dioxide extraction.  
*J. Chromato. A* (1997) 785 : 385 –394.
- 25 Valls M., Fernandez P., Bayona J. M., Albaiges J.  
 Broad spectrum analysis of organic contaminants in urban wastewaters and coastal receiving systems. In organic contaminants in waste water, sludge and sediment : occurrence, fate and disposal. Eds. Quaghebeur, Temmerman, Angelett.  
 Elsevier applied science. New York (1988) 19-34.
- 26 Meesters R. J. W., Schröder H.F.  
 Simultaneous determination of 4-nonylphenol and bisphenol A in sewage sludge.  
*Anal. Chem.* (2002) 74 : 3566-3574.
- 27 Ding W-H., Fann J.C.H.  
 Application of pressurized liquid extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry to determine 4-nonylphenols in sediments.  
*J. Chromatogr. A* (2000) 866 : 79-85
- 28 Lee H. B., Peart T. E.  
 Determination of 4NP in effluents and sludge from sewage treatment plants.  
*Anal. Chem.* (1995) 34 : 1976-1980.
- 29 Kreisselmeier A., Dürbeck H. W.  
 Determination of alkylphenols, alkylphenol polyethoxylates and linear alkylbenzene sulfonates in sediments by accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction.  
*J. Chromatogr. A* (1997) 775 : 187-196.
- 30 Chalaux N., Bayona J.M., Albaiges J.  
 Determination of nonylphenols as pentafluorobenzyl derivatives by capillary gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection in environmental matrix.  
*J. Chromatogr. A* (1994) 686 : 275-281
- 31 Yuan S.Y., Yu C.H., Chang B.V.  
 Biodegradation of nonylphenol in river sediment  
*Environ. Pollut.* (2004) 127 : 425-430
- 32 Paxéus N.  
 Organic pollutants in the effluents of large wastewater treatment plants in Sweden.  
*Water Res.* (1996) 30 : 1115-1122
- 33 Giger W., Stephanou E., Schaffner C.  
 Persistent organic chemicals in sewage effluents : identification of nonylphenols and nonylphenols polyethoxylates by glass capillary column gas chromatography/ mass spectrometer.  
*Chemosphere* (1981) 10 : 1253-1263.
- 34 Bhatt B. D., Prasad J. V., Kalpana G., Ali S.  
 Separation and characterization of isomers of 4NP by capillary GC/GC-MS/GC-FTIR techniques.  
*J. Chromatogr. Sci.* (1992) 30 : 203-210.
- 35 Wheeler T. F., Heim J. R., LaTorre M. F., Janes A. B.  
 Mass spectral characterization of 4NP isomers using high resolution capillary GCMS.  
*J. Chromatogr. Sci.* (1997) 35 : 19-30.

- 
- 36 Schmitz-Alonzo I., Loyo-Rosales J.E., Aviles M., Rattner B.A., Rice C.P.  
Determination of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates in biota by liquid chromatography with detection by tandem mass spectrometry and fluorescence spectroscopy.  
J. Chromatogr. A (2003) 1010 : 25-35.
- 37 Ferguson P. L., Iden C. R., Brownawell B.J.  
Analysis of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates in environmental samples by mixed-mode high performance liquid chromatography – electrospray mass spectrometry.  
J. chromatog. A (2001) 938 : 79-91.
- 38 Loyo-rosales J.E., Schmitz-Afonso I., Rice C.P., Torrents A.  
Analysis of octyl- and nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry.  
Anal. Chem. (2003) 75 : 4811-4817.
- 39 Fremmersvik G., Hansen N.  
LAS and Nonylphenols  
Horizontal (2003) 13, 25 p.
- 40 Pattanaargsorn S., Sangvanish P., Petsom A., Roengsumran S.  
Determination of oligomer distribution of alkylphenol polyethoxylates and fatty alcohol polyethoxylates by positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.  
Analyst (1995) 120 : 1573-1576.
- 41 ISO/DIS 18857-1  
« Qualité de l'eau – Dosage des alkylphénols sélectionnés – Partie 1 : Méthode pour échantillons non filtrés par extraction en phase liquide et chromatographie en phase gazeuse et détection sélective de masse » 18 p.

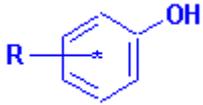
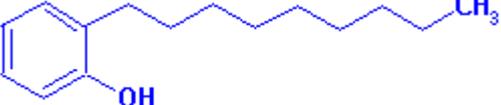
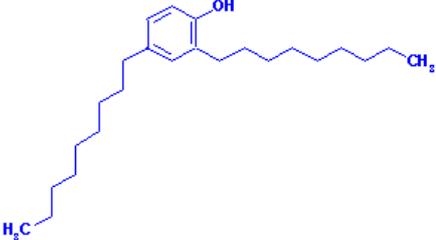
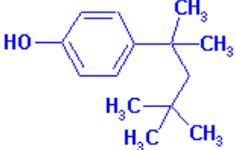
**LISTE DES ANNEXES**

---

---

<b>Repère</b>	<b>Désignation précise</b>	<b>Nb pages</b>
1	Nomenclature des principaux AP retrouvés dans l'environnement	1
2	Données brutes de la première étude cinétique	1
3	Données brutes de la seconde étude cinétique	1
4	Domaine de linéarité et limite de quantification pour le 4- <i>tert</i> -octylphénol	2

## ANNEXE1 : NOMENCLATURE DES PRINCIPAUX AP RETROUVES DANS L'ENVIRONNEMENT

	Nom :	<b>nonylphénol</b>
	N° CAS :	25154-52-3
	Formule moléculaire :	C15-H24-O
	Selon Reed [1], le terme nonylphénol englobe un <b>mélange</b> de C <sub>9</sub> -alkylphénols (4-nonylphénol, 2-nonylphénol, etc.) <b>ramifiés ou non et substitués en différentes positions.</b>	
	Nom :	<b>4-nonylphénol</b>
	N° CAS :	84852-15-3
	Formule moléculaire :	C15-H24-O
	Le terme 4-nonylphénol englobe un <b>mélange</b> de nonylphénols <b>ramifiés et substitués en position 4.</b> Représente la grande majorité des nonylphénol (80%) dans les productions commerciales	
	Nom :	<b>4-n-nonylphénol</b>
	N° CAS :	104-40-5
	Formule moléculaire :	C15-H24-O
	Le terme 4-n-nonylphénol représente <b>un seul isomère linéaire et substitué en position 4.</b> Quasiment absent dans les mélanges commerciaux de nonylphénol	
	Nom :	<b>2-nonylphénol</b>
	N° CAS :	136-83-4
	Formule moléculaire :	C15-H24-O
	Le terme 2-nonylphénol représente <b>un seul isomère linéaire et substitué en position 2.</b> Impureté retrouvée dans les mélanges commerciaux de nonylphénol (5%)	
	Nom :	<b>2,4-dinonylphénol</b>
	N° CAS :	137-99-5
	Formule moléculaire :	C24-H42-O
	Le terme 2,4-dinonylphénol représente <b>un seul isomère linéaire et substitué en position 2 et 4.</b> Impureté retrouvée dans les mélanges commerciaux de nonylphénol (5%)	
	Nom :	<b>4-tert-octylphénol</b> <b>4(1,1,3,3)tetra methylbutylphenol</b>
	N° CAS :	140-66-9
	Formule moléculaire :	C14-H22-O
	Selon Reed (1978), le terme octylphénol désigne uniquement le <b>4-tert-octylphénol.</b> Bien que théoriquement d'autres isomères existent, seul le 4-tert-octylphénol intervient au niveau industriel.	

**ANNEXE 2 DONNEES BRUTES DE LA PREMIERE ETUDE CINETIQUE**

<b>injection</b>	<b>Aire EI*</b>	<b>Aire 4NP</b>	<b>Aire 4OP</b>
29/03/04 21:41	37 846	3 973 574	8 015 093
29/03/04 22:28	39 971	4 324 599	8 603 410
29/03/04 23:15	39 567	4 353 580	8 838 227
30/03/04 00:02	39 567	4 040 594	8 163 320
30/03/04 00:49	36 635	4 183 827	8 430 999
30/03/04 01:36	43 153	4 472 931	9 187 407
30/03/04 02:23	38 038	4 346 615	8 776 189
30/03/04 03:10	46 549	4 777 157	9 705 730
30/03/04 03:57	40 754	4 435 252	8 943 372
30/03/04 04:44	45 716	4 647 745	9 552 182
30/03/04 10:59	34 199	4 072 568	8 441 537
30/03/04 13:39	40 071	4 428 584	9 108 181
30/03/04 15:07	31 124	3 963 374	8 153 580
31/03/04 13:57	94 388	6 625 422	12 733 153

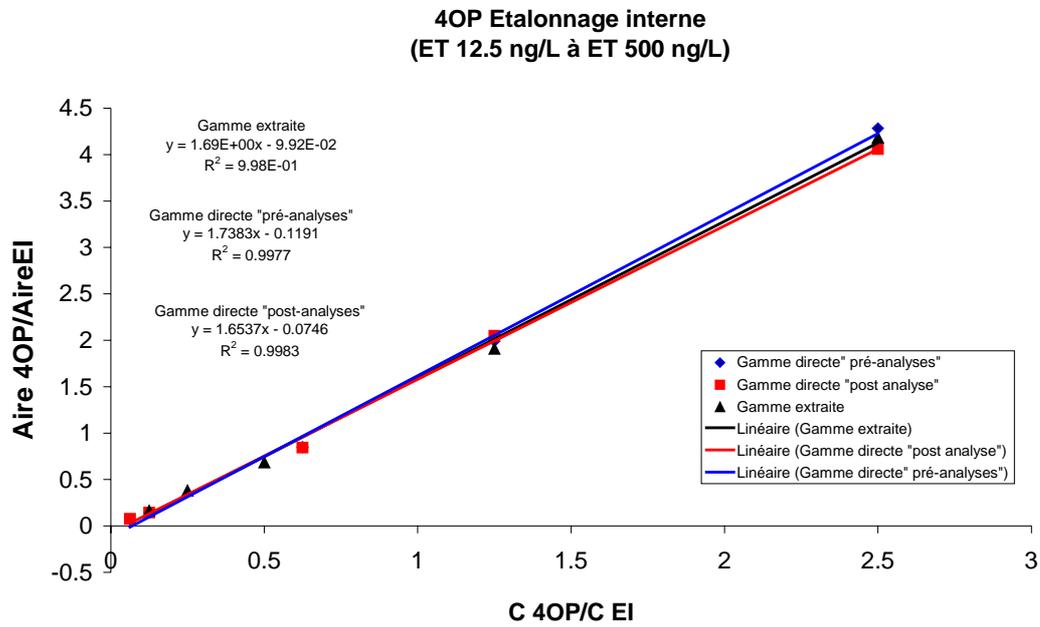
Première étude cinétique portant sur des concentrations de 40 pg/μL, 3 ng/μL et de 2,6 ng/μl respectivement pour EI\*, 4NP et 4OP

**ANNEXE 3 DONNEES BRUTES DE LA SECONDE ETUDE CINETIQUE**

<b>Injection</b>	<b>Aire EI</b>	<b>Aire 4NP</b>	<b>Aire 4OP</b>
08/04/04 10:36	36 491	3 783 837	8 245 777
08/04/04 11:17	40 220	4 272 031	9 084 920
08/04/04 11:58	37 029	3 804 286	8 201 083
08/04/04 17:39	33 930	3 838 177	8 568 507
08/04/04 18:20	35 396	3 890 154	8 706 205
08/04/04 19:01	37 453	3 975 118	8 867 375
09/04/04 08:30	35 219	3 666 241	8 537 479
09/04/04 09:11	33 365	3 547 780	8 170 016
09/04/04 09:52	34 557	3 621 274	8 391 930
09/04/04 18:13	26 512	2 829 505	6 836 836
09/04/04 18:54	26 571	2 863 995	6 934 681
09/04/04 19:35	26 656	2 815 916	6 877 487
10/04/04 09:05	24 769	2 464 655	6 174 184
10/04/04 09:46	27 244	2 795 696	6 863 482
10/04/04 10:27	23 784	2 575 915	6 345 943
10/04/04 23:57	17 898	2 230 394	5 692 528
11/04/04 00:38	19 161	2 210 359	5 621 070
11/04/04 01:19	20 877	2 405 256	6 054 046
11/04/04 14:49	14 449	2 235 056	5 865 627
11/04/04 15:30	16 463	2 295 460	5 968 033
11/04/04 16:11	15 279	2 218 636	5 837 963
12/04/04 05:42	15 059	2 288 421	5 943 154
12/04/04 06:23	14 418	2 367 198	6 213 157
12/04/04 07:04	17 549	2 453 965	6 337 183
12/04/04 20:34	13 440	2 181 878	5 730 993
12/04/04 21:15	13 931	2 166 407	5 572 783
12/04/04 21:56	14 811	2 224 894	5 776 504
13/04/04 11:26	10 178	2 097 441	5 680 817
13/04/04 12:07	10 422	2 146 163	5 725 347
13/04/04 12:48	10 694	1 928 439	5 146 098

Seconde étude cinétique portant sur des concentrations de 40 pg/μL, 3 ng/μL et de 2,6 ng/μl respectivement pour EI\*, 4NP et 4OP. Injection en mode triplicat.

**ANNEXE 4 DOMAINE DE LINEARITE ET LIMITE DE QUANTIFICATION POUR LE 4-TERT-OCTYLPHENOL**



<b>4-tert-octylphénol</b>		
<b>valeur de dopage (ng)</b>	<b>Quantité mesurée (ng)</b>	<b>Rendement (%)</b>
25	27	106
25	27	109
25	26	106
25	26	105
25	25	101
25	25	100
25	25	101
25	25	102
25	25	100
25	25	100
Moyenne	26	103
Ecart type	1	3
CVr	3%	

$$\left| \frac{LQ - \bar{u}_{LQ}}{\frac{SLQ}{\sqrt{n}}} \right| = 4 < 10$$

$$CV_r = 3 \% < 20 \%$$

Avec :

- LQ : Limite de Quantification
- $u_{LQ}$  : Moyenne des  $n$  analyses réalisées à la LQ
- SLQ : Ecart-type des  $n$  analyses réalisées à la LQ
- $n$  : nombre d'analyses réalisées à la LQ
- $CV_r$  : Coefficient de variation