

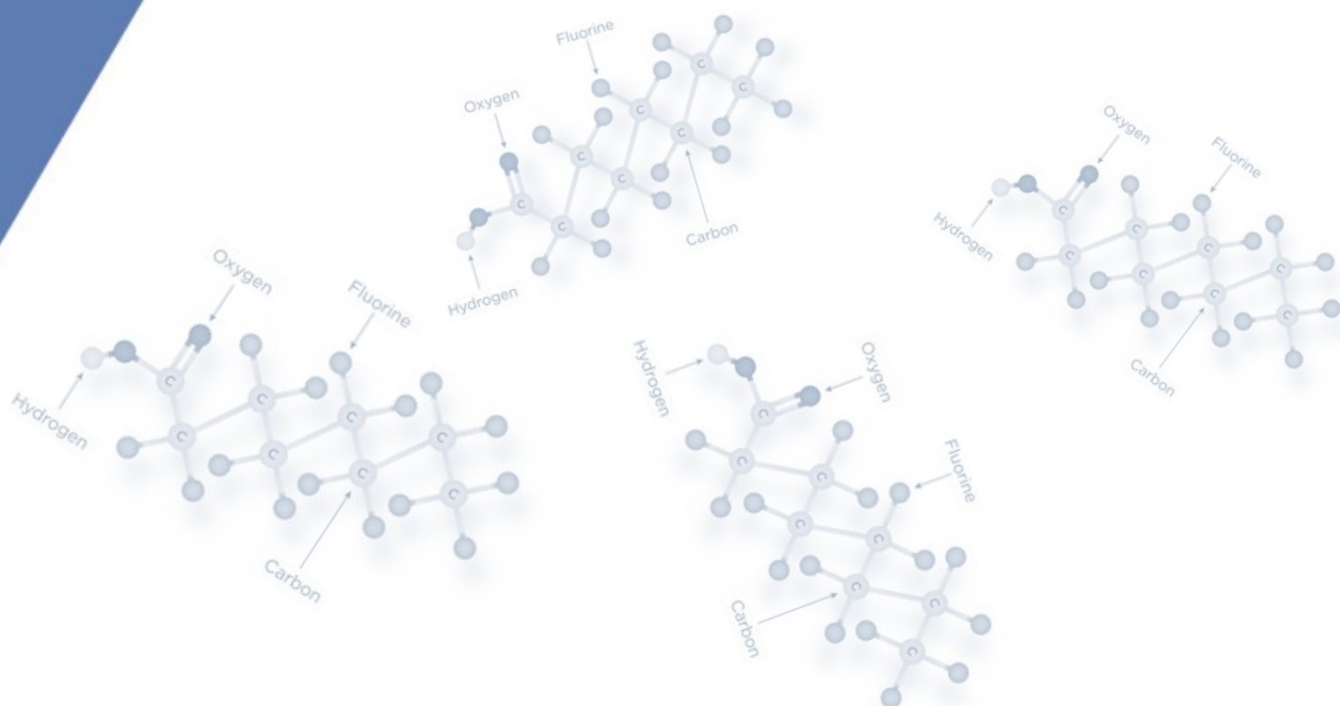


Plan mondial de surveillance des polluants organiques persistants

Protocole 1

Analyse de l'Acide Perfluorooctane Sulfonique (PFOS) dans l'Eau et du Perfluorooctane Sulfonamide (FOSA) dans le Lait maternel, l'Air et le Sérum Humain, et Analyse de quelques Sulfonamides d'Alkyl-Perfluorés (FOSAS) et de Perfluorooctane Sulfonamido Ethanols (FOSES) dans l'Air

Avril 2015



**Procédure d'Analyse des Polluants Organiques Persistants
dans les Matrices Environnementales et Humaines pour la
mise en œuvre du Plan Mondial de Suivi dans le cadre de la
Convention de Stockholm**

Protocole 1:

**Analyse de l'Acide Perfluorooctanesulfonique (PFOS) dans l'Eau et
du Perfluorooctanesulfonamide (FOSA) dans le Lait Maternel, l'Air et le
Sérum Humain, et Analyse de quelques Sulfonamides d'Alkyl-
Perfluorés (FOSAS) et de Perfluorooctanesulfonamidoéthanol (FOSES)
dans l'Air**

Service Substances Chimiques
Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE)
Economie Division

Genève

Avril 2015

Le présent document a été élaboré par:

Institut pour les Etudes Environnementales
Université VU
De Boelelaan 1087
NL-1081HV Amsterdam
Pays-Bas

Pour:

Service Substances Chimiques
Economie Division
Programme des Nations Unies pour l'environnement

Dans le cadre du projet "Mise en place d'Outils et Méthodes pour Inclure les Neufs Nouveaux Polluants Organiques Persistants (POP) dans le Plan Mondial de Suivi" Projet ID GFL 2328-2760-4B97 avec le soutien financier du Fond pour l'Environnement Mondial.

Protocole 1: Analyse de l'Acide Perfluorooctanesulfonique (PFOS) dans l'Eau et du Perfluorooctanesulfonamide (FOSA) dans le Lait Maternel, l'Air et le Sérum Humain, et Analyse de quelques Sulfonamides d'Alkyl-Perfluorés (FOSAS) et de Perfluorooctanesulfonamidoéthanol (FOSES) dans l'Air

1 CHAMP D'APPLICATION

Le Plan Mondial de Suivi de la Convention de Stockholm fixe un cadre pour l'analyse des polluants organiques persistants (POP); à cet égard, les congénères recommandés pour l'analyse dans les matrices-clé sont répertoriés (voir chapitre 2 des "Directives pour le Plan Mondial de Suivi des polluants organiques persistants, PNUE 2013). Un protocole est nécessaire pour s'assurer que ces composés sont toujours correctement analysés par les différents laboratoires et toujours de la même façon. Pour favoriser l'analyse des POP dans les laboratoires dédiés, le Service Substances Chimiques de la Division de la Technologie, de l'Industrie et de l'Economie (DTIE) du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) développe des procédures standard pour l'analyse des POP, initiales et nouvelles.

Cette procédure est axée sur l'analyse de l'acide perfluorooctanesulfonique (PFOS) et du perfluorooctanesulfonamide (FOSA) dans l'eau, le lait maternel, le sérum humain et l'air, ainsi que sur l'analyse du méthyl-perfluorooctanesulfonamide (MeFOSA), de l'éthyl-perfluorooctanesulfonamide (EtFOSA), du méthyl-perfluorooctanesulfonamidoéthanol (MeFOSE), et de l'éthyl-perfluorooctanesulfonamidoéthanol (EtFOSE) dans l'air. Le protocole suivant décrit la méthode de préparation des échantillons, d'extraction, de purification et d'analyse des substances perfluoroalkylées susmentionnées (PFASs) dans l'eau, le lait maternel, le sérum humain et l'air.

2 PRINCIPE

Tous les PFASs doivent être extraits de leurs matrices, car la plupart des composants matriciels interfèrent dans le résultat final. L'extraction à partir d'échantillons d'eau, de lait maternel et de sérum humain peut être effectuée par extraction en phase solide (SPE sigle anglais) sur colonne WAX. Pour les échantillons d'air (sur mousse de polyuréthane), procéder en premier lieu à une extraction Soxhlet puis procéder à une purification. L'analyse instrumentale des extraits purifiés de tous les échantillons s'effectue par chromatographie en phase liquide associée à une spectrométrie de masse (LC-MS/MS sigle anglais). Tous les composés-cibles pourront par la suite être identifiés et quantifiés.

3 PRÉCAUTIONS

Avant de procéder à l'analyse et à la préparation des substances nécessaires, il est indispensable de prendre deux précautions.

1. De nombreux instruments tels que le système de chromatographie liquide/spectromètre de masse (LC/MS) ainsi que les dispositifs d'eau ultra-pure contiennent souvent du Téflon. Or, le Téflon contient des PFASs, provoquant un niveau de concentration de base élevé, qui perturbe la détermination des PFASs dans les échantillons. Par conséquent, remplacer la tubulure Téflon du système LC et les éléments Téflon du dispositif d'eau ultra-pure ou utiliser une eau pour procédure analytique CLHP (HPLC sigle anglais) pour toutes les solutions dans l'eau. La

non-contamination des solvants et substances utilisées pendant l'analyse doit être vérifiée afin de prouver l'absence de tout PFAS concerné par l'expérience.

2. Le présent protocole décrit l'analyse des PFASs. Cependant, certains paramètres et conditions analytiques décrits par le protocole peuvent être modifiés, tout en obtenant les mêmes résultats. Dans le cas d'une modification du protocole, la méthode devra être intégralement optimisée et validée pour garantir la compatibilité des données.

4 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

4.1 Matériel

Bouteille en Polyéthylène haute densité (100 et 500 ml)
Pipettes en plastique
Tubes en polypropylène (15 ml)
Micro tubes (1.5 ml)
Fiole polypropylène capsule sertie (700 µL)
Joint-Scellé, aluminium argenté 11 mm, PTFE/ garniture caoutchouc
Boucheuse/Déboucheuse
Bain à ultrasons
Dessiccateur à Vide
Echantillonneur passif
Balance (précision 0.01 g)
Pipettes (50, 100 et 200 µL)
Centrifugeuse
Four (37 °C)
Dispositif SPE (Rincer au méthanol et à l'eau avant usage)
pH-mètre
Pompe à vide
Bain-marie (50 °C)
Agitateur Vortex
LC-MS/MS (LC-QQQ). Dispositif d'ionisation par électronébuliseur(ESI) à polarité négative
Colonne FluoroSEP-RP Octyl, 15 cm x 2.1 mm, taille des particules 5 µm, ES Industries (132211-FO)
2 x Colonnes Symmetry C₁₈, 20 mm x 3.9 mm, taille des particules 5 µm, Waters (WAT054225)
Colonne Symmetry C₁₈, 50 mm x 2.1 mm, taille des particules 5 µm, Waters (18600206)

4.2 Réactifs

Disque de mousse de polyuréthane (PUF), 14 cm x 1.35 cm, surface 365 cm², masse 4.40 g, volume 207 cm³, TischEnvironmental, Cleves, OH
Acétone, Ultraresi, J.T.Baker (9254)
Ether de pétrole, J.T.Baker
Méthanol, qualité CLHP, J.T.Baker (8402)
Etalon interne (¹³C₄ PFOS + ¹⁸O₂ FOSA + ²H₃MeFOSA + ²H₅EtFOSA + ²H₇MeFOSE + ²H₉EtFOSE) en méthanol (100 ng/ml)
Etalon interne(¹³C₄ PFOS + ¹⁸O₂ FOSA) en méthanol(100 ng/ml)
Acide formique à 50% en eau
Cartouche SPE, Oasis WAX 6cc, Waters 186002493
Ammoniaque à 25% niveau "purity"
NH₄OH à 0.1% en méthanol; ajouter 400 µL d'ammoniaque à 100 ml de méthanol

NH₄OH à 2 % en méthanol; ajouter 8 ml d'ammoniaque à 92 ml de méthanol
Eau CLHP (HPLC sigle anglais), qualité CLHP certifiée, J.T. Baker (4218), ou MilliQ "purity"
Acide acétique 100 % pro analysis, niveau "purity"
Acétate d'ammonium niveau "purity"
Acétate d'ammonium 25 mM; ajouter 190 mg d'acétate d'ammonium à 100 ml d'eau puis ajuster à l'acide acétique le pH jusqu'à pH=4
Azote (gaz). Pureté 5.0
Injection standard (1) (¹³C₈ PFOS) en méthanol/eau (1:1, v/v) (150 ng/ml)
Injection standard (2) (¹³C₈ PFOS) en méthanol/eau (1:1, v/v) (50 ng/ml)
Injection standard (3) (¹³C₈ PFOS) en méthanol/eau (1:1, v/v) (25 ng/ml)
Formiate d'ammonium, (>99%), Fluka (09735)
Formiate d'ammonium tampon 5 mM: Dissoudre 315 mg de formiate d'ammonium dans 1 L d'eau CLHP (HPLC sigle anglais). Filtrer avant usage.
Solution de calibration PFAS (0.05, 0.25, 0.5, 5, 50, 100 ng/ml) en méthanol/eau (1:1, v/v)

5 MÉTHODE

5.1 Préparation des échantillons

5.1.1 Air

Pour les échantillons d'air, des disques PUF sont utilisés.

5.1.1.1 Préparation du PUF

- Nettoyage d'un PUF:
 - Si nécessaire, nettoyer le PUF à l'eau;
 - Procéder à une extraction Soxhlet sur PUF à l'acétone (24 h), suivie d'une extraction à l'éther de pétrole (24 h)
 - Sécher le PUF dans un dessiccateur (24 h).

5.1.1.2 Échantillonnage de l'air

Placer un PUF dans un échantillonneur passif pendant trois mois sur un site d'échantillonnage en extérieur.

5.1.1.3 Préparation des échantillons

- Extraire le PUF de l'échantillonneur;
- Ajouter 150 µL d'étalon interne (I.S. sigle anglais) sur le PUF.

5.1.1.4 Blanc de Procédure

Préparer un PUF, comme décrit précédemment, sans la durée d'exposition d'échantillonnage.

5.1.2 Eau

5.1.2.1 *Echantillonnage de l'eau*

Les détails de l'échantillonnage de l'eau sont décrits dans "Analyse des PFAS dans l'eau dans le cadre du Plan Mondial de Suivi de la Convention de Stockholm" du groupe de travail PNUE-GMP (sigle Anglais) (PNUE 2015b).

5.1.2.2 *Préparation des échantillons*

- Dès que l'échantillon arrive au laboratoire d'analyse, des étalons internes (IS sigle anglais) doivent être ajoutés pour compenser les pertes par absorption du matériel de laboratoire. Voir la section 4.2 par la suite concernant l'ajout des étalons internes aux échantillons. Il faut laisser à l'échantillon (incl. IS) le temps de s'équilibrer avant l'analyse.
- Conserver les échantillons d'eau (500 ml) dans un contenant en polyéthylène haute densité (HDPE) au réfrigérateur ou au congélateur (-20 °C) et décongeler la veille de l'analyse ;
- Agiter vigoureusement l'eau avant le prélèvement des sous-échantillons;
- Peser 100 ml d'échantillon d'eau dans une bouteille en HDPE (100 ml);

5.1.2.3 *Blanc de procédure*

Préparer un échantillon de procédure à blanc comme décrit précédemment, mais en utilisant de l'eau ultra-pure (MilliQ) à la place de l'eau de prélèvement.

5.1.3 Lait maternel et sérum humain

5.1.3.1 *Echantillonnage pour matrices humaines*

Suivre le protocole PNUE/WHO pour l'échantillonnage de lait humain 'PNUE-Etude Coordonnée sur les Polluants Organiques Persistants dans le lait maternel'

(<http://www.unep.org/chemicalsandwaste/portals/9/POPs/docs/Mothers%20milk%20guide%20POPs.pdf>)

5.1.3.2 *Préparation des échantillons*

- Homogénéiser les échantillons (50 ml) en agitant manuellement pendant 1 min;
- Peser 1 ml d'échantillon de lait, ou 0.5 ml d'échantillon de sérum dans un tube de PP (15 ml);
- Ajouter 50 µL d'étalon interne (I.S.) (4.2);
- Ajouter 2 ml d'acide formique à 50% et agiter manuellement;
- Placer l'échantillon dans un bain à ultrasons pendant 15 min;
- Centrifuger pendant 15 min à 3,000 tr/min;
- Placer les échantillons au four à 37 °C pendant 30 min.

5.1.3.3 Blanc de Procédure

Préparer un échantillon de procédure à blanc comme décrit précédemment, mais en utilisant de l'eau ultra-pure (MilliQ) à la place de l'eau de prélèvement.

5.2 Extraction des échantillons

5.2.1 Air

- Procéder à une extraction Soxhlet au méthanol (12 h);
- Concentrer l'extrait à 1 ml en utilisant un évaporateur rotatif ou un dispositif Kuderna-Danish;
- Filtrer l'extrait à travers une membrane de polypropylène hydrophile de 0.2 µm (GHP) dans un flacon de polypropylène pour chromatographie en phase liquide (LC sigle anglais);
- Concentrer à 200 µL sous léger courant d'azote;
- Ajouter 100 µL d'injection standard 1 (voir section 4.2);
- Ajouter 300 µL d'acétate d'ammonium à 2mM et agiter manuellement ;
- Analyser avec LC-MS/MS (Voir chapitre6).

5.2.2 Eau, lait maternel et sérum humain

- L'extraction en phase solide (SPE) est utilisée pour l'extraction dans l'eau, le lait maternel et le sérum humain. Installer une cartouche SPE dans le dispositif SPE.
- Préparer la cartouche SPE en ajoutant les solutions du Tableau1 à la cartouche l'une après l'autre. L'ajout se fait dès que la solution précédente a été absorbée par la cartouche (ne pas utiliser la pompe à vide à cette étape);

Tableau1: Solutions utilisées pour la préparation de la cartouche SPE

	Eau		Lait et sérum	
	Quantité(ml)	Concentration (%)	Quantité(ml)	Concentration (%)
NH ₄ OH en méthanol	4	0.1	2	2
Méthanol	4		2	
Milli-Q H ₂ O	4		2	

- Ajouter l'extrait d'échantillon à la colonne SPE (débit max. 1 goutte/seconde);
- Laver la cartouche SPE en ajoutant les solutions du Tableau2.

Tableau2: Solutions utilisées pour laver la cartouche SPE

	Eau Quantité (ml)	Lait et sérum Quantité (ml)
Acétate d'ammonium 25 mM (ajusté à pH=4 avec acide acétique)	4	2
méthanol à 40% en eau		2

- Sécher la cartouche en basculant dans la pompe à vide. Eluer les PFAS de la cartouche SPE en ajoutant les solutions du Tableau3.

Tableau 3: Solutions utilisées pour l'extraction des PFAS de la cartouche SPE

	Eau		Lait et serum	
	Quantité (ml)	Concentration (%)	Quantité (ml)	Concentration (%)
Méthanol	4			
NH ₄ OH en méthanol	4	0.1	1	2

- Evaporer l'extrait jusqu'à dessiccation complète sur bain-marie à 50 °C, sous léger courant d'azote;
 - Reconstituer l'extrait de lait avec 100 µL de solution d'acétate d'ammonium et 100 µL d'injection standard 2 (Voir section 4.2);
 - Reconstituer l'extrait d'eau et celui de sérum avec 200 µL d'injection standard 3 (Voir section 4.2);
- Agiter manuellement l'extrait pendant 1 min;
- Centrifuger pendant 10 min à 3,000 tr/min;
- Transférer le surnageant dans un flacon pour LC en polypropylène LC et analyser avec LC-MS/MS (Voir section 7).

6 ANALYSES INSTRUMENTALES

Veillez noter que le gradient et les paramètres MS dépendent du système GC-MS et du type de colonne utilisés. Ces paramètres doivent être optimisés en interne pour chaque équipement et colonne. Les isomères linéaires et ramifiés de PFOS doivent être séparés et quantifiés un par un (Figure 1). Veillez noter que le ratio d'isomères linéaires et ramifiés varie significativement d'un échantillon à l'autre et que la Figure 1 ne représente qu'un exemple.

- Installer la colonne d'analyse (voir section 4.1) et la colonne de garde (voir section 4.1) dans le CLHP (HPLC sigle anglais);
- Installer une colonne supplémentaire (50 mm) (voir section 4.1) et une colonne de garde (voir section 4.1) entre la pompe et l'injecteur LC, pour éviter les interférences de PFAS provenant du dispositif LC, avec les composés-cible;

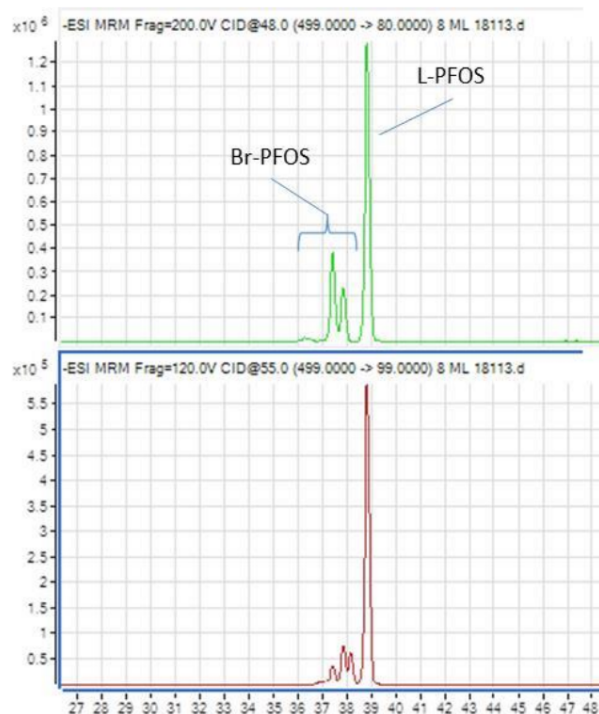


Figure 1: Chromatogramme montrant la séparation de PFOS linéaire et ramifié dans l'eau (échantillon d'eau de surface en provenance des Pays-Bas)

- Table 4);
- Démarrer la pompe avec 65% de formiate d'ammonium et 35% de méthanol;
- Placer tous les extraits, les blancs de procédure, et les solutions de calibration sur le plateau de l'échantillonneur automatique;
- Définir une séquence sur ordinateur (les paramètres de masse pour la détection et la quantification du PFAS sont donnés Tableau 5). Analyser les échantillons, les solutions de calibrations, les blancs et les substances de référence dans un ordre aléatoire;
- Injecter une solution de calibration après que la pompe ait fonctionné pendant au moins 30 min;
- Contrôler le fonctionnement du dispositif LC-MS/MS en comparant les résultats (temps de rétention et intensité des pics) de la solution de calibration injectée avec ceux obtenus plus tôt;
- Démarrer la séquence.

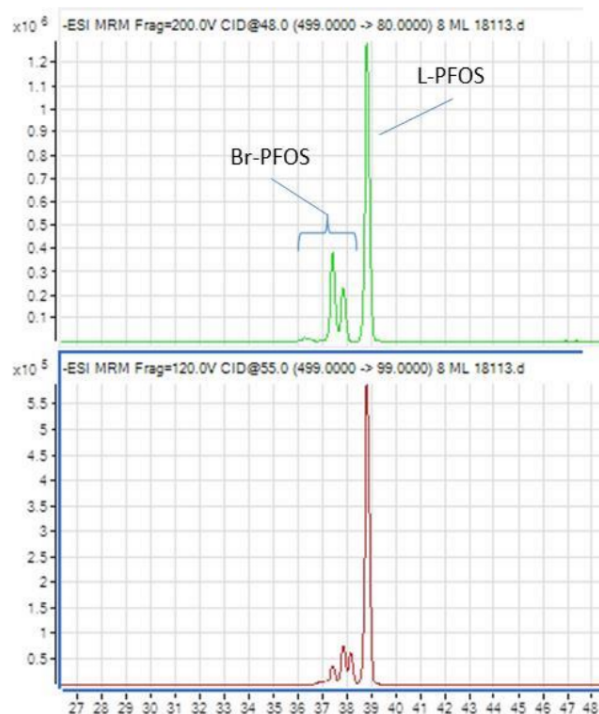


Figure 1: Chromatogramme montrant la séparation de PFOS linéaire et ramifié dans l'eau (échantillon d'eau de surface en provenance des Pays-Bas)

Table 4: Gradient pour la séparation de PFAS

Temps (min)	Débit ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Formiate d'ammonium (5mM) (%)	Méthanol (%)
0	300	65	35
2	300	65	35
35	300	25	75
45	300	5	95
55	300	5	95
55.5	300	65	35
65	300	65	35

7 QUANTIFICATION

Identifier les pics-cible du chromatogramme LC/MS basé sur le temps de rétention et à la transition m/z . Utiliser l'aire des pics associés aux solutions d'étalonnage pour tracer une courbe d'étalonnage de chaque composé ciblé. Comparer l'aire associée à chaque pic de solution d'étalonnage avec ceux des échantillons et calculer les concentrations en PFASs.

Note: Les concentrations en PFAS doivent être présentés sur une base de poids humide. Cependant, il arrive souvent que les résultats soient présentés sur la base de l'anion sulfonate, *i.e.*, corrigés pour la masse moléculaire du sel de PFOS. Par exemple, la masse moléculaire du sel PFOS de sodium (PFOS-Na) est de 522.11 g/mol et celle de Sel-M est de 499.12. Ainsi, un facteur de correction de 0.96 doit être appliqué quand les solutions standards sont pesées et diluées.

8 QA/QC

A des fins de contrôle de qualité, inclure un blanc et un prélèvement de matériau de référence dans chaque série de 12 échantillons maximum. Noter que ces paramètres sont à appliquer aussi bien pour les isomères linéaires que pour les isomères ramifiés.

Tableau5: Paramètres de masse pour la séparation dePFAS

Composé		Ion Précurseur (m/z)	Production (m/z)	Commentaire
PFOS	Composécible	499	80	Quantifiant
			99	Qualifiant
¹³ C ₄ PFOS	Etalon interne	503	80	Quantifiant
			99	Qualifiant
¹³ C ₈ PFOS	Injection standard	507	80	Quantifiant
			99	Qualifiant
FOSA	Composécible	498	78	Quantifiant
			169	Qualifiant
¹⁸ O ₂ FOSA	Etalon interne	502	82	Quantifiant
			169	Qualifiant
MeFOSA	Composécible	512	169	Quantifiant
			219	Qualifiant
² H ₃ MeFOSA	Etalon interne	515*	169*	Quantifiant
			219*	Qualifiant
EtFOSA	Composécible	526	169	Quantifiant
² H ₅ EtFOSA	Etalon interne	531*	169*	Quantifiant
MeFOSE	Composécible	602	45	Quantifiant
² H ₇ MeFOSE	Etalon interne	609*	45*	Quantifiant
EtFOSE	Composécible	616	45	Quantifiant
² H ₉ EtFOSE	Etalon interne	625*	45*	Quantifiant

* Calculé, nonoptimisé

9 RÉFÉRENCES

PNUE (2015a): Directives sur le Plan Mondial de Suivi pour les polluants organiques persistants.

PNUEP/POPS/COP.7/INF/39, 26 Février 2015, accessible

depuis <http://synergies.pops.int/2015COPs/MeetingDocuments/tabid/4243/language/en-US/Default.aspx>

PNUE (2015b): Analyse des PFAS dans l'eau dans le cadre du Plan Mondial de Suivi de la Convention de Stockholm, Mai 2015; accessible depuis www.unep.org/chemicalsandwaste/