

Recherche & Développement news

R&D-09-01

R&D News aborde deux thèmes :

- Quantification de composés organiques dissous par Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) couplée à une analyse GC/MS
- DISCOBIOL (**D**ispersants et techniques de lutte en milieux **c**ôtiers : effets **b**iologiques et apports à la réglementation)

Quantification de composés organiques dissous par Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) couplée à une analyse GC/MS

Introduction

Compte tenu du besoin affirmé de suivi des concentrations dans l'environnement (notamment la Directive Cadre sur l'Eau ou dans le cadre de pollutions accidentelles des eaux), l'analyse des composés semi-volatils dissous présente un intérêt croissant. Cependant, l'analyse de ces composés à l'état de traces nécessite généralement des étapes de concentration/extraction fastidieuses et longues. Dans ce contexte, une nouvelle technique d'extraction dite par SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) et couplée à un système d'analyse par chromatographie en phase gazeuse et détection par spectrométrie de masse (GC/MS), a semblé prometteuse, de par son potentiel analytique, sa sensibilité et la simplicité du protocole de préparation des échantillons mis en oeuvre. Les molécules cibles envisagées sont les 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) identifiés par l'agence américaine pour la protection environnementale (US EPA : United States Environmental Protection Agency) ainsi que divers pesticides caractéristiques de plusieurs familles chimiques (organochlorés, PolyChloroBiphényles (PCBs), ...). Ces composés représentent la majorité des 33 substances répertoriées dans les listes établies à l'échelle européenne (liste I directive 76/464/CEE et Substances Prioritaires ou Dangereuses Prioritaires de la DCE 2000/60/CE).

Principe et théorie de la SBSE

La SBSE est basée sur l'extraction par sorption de molécules dissoutes, en phase aqueuse le plus souvent, par un barreau magnétique recouvert d'un polymère (PDMS : PolyDiMéthylSiloxane) et plongé directement dans le milieu à analyser. Les composés de faible polarité, qui ont plus d'affinité pour le PDMS que pour l'eau, se concentrent alors sur le barreau. Les molécules ciblées par cette technique sont dites apolaires, notion exprimée par le coefficient de partage octanol/eau, ou $K_{o/w}$, qui est alors généralement supérieur ou égal à 1000 (ce qui correspond à un $\log K_{o/w}$ supérieur ou égal à 3).

Les détails théoriques de cette technique sont présentés en *annexe 1*.

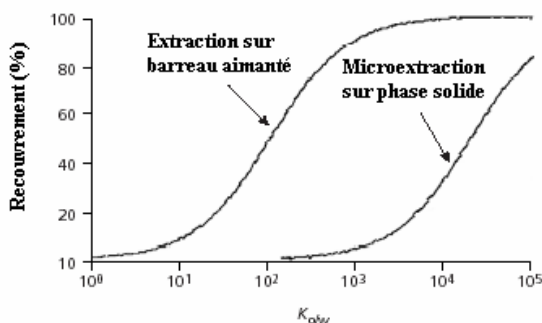


Figure 1 recouvrement des solutés en fonction du coefficient de partage $K_{o/w}$ en SPME (échantillon de 10mL, fibre de PDMS de 100 μ m) et en SBSE (échantillon de 10mL, barreau aimanté de PDMS de 10mm x 0.5mm)

1. Extraction et concentration des composés

Dans un flacon en verre de 125mL sont versés 100mL d'eau de mer à analyser ainsi que les étalons internes solubilisés dans du méthanol. Le barreau SBSE (ou twister, cf. *figure 2*) est introduit dans le flacon à l'aide de pince pour éviter toute contamination.

Pour éviter les phénomènes de photo-oxydation (dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques notamment), le flacon est enveloppé d'aluminium ou placé à l'abri de la lumière. Enfin, le barreau est agité pendant une durée déterminée en fonction des composés cibles à la vitesse de 500 tr/min. Une fois la période d'agitation achevée, le twister est récupéré à l'aide d'une pince, rincé avec de l'eau osmosée avant d'être déposé et séché sur du papier absorbant pour être finalement placé dans un tube de désorption thermique situé sur le passeur automatique d'échantillons.

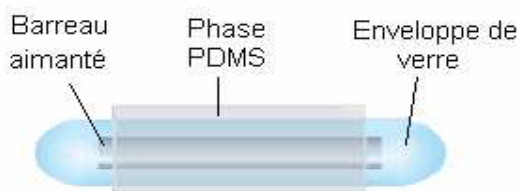


Figure 2 barreau d'analyse SBSE (également appelé TWISTER), recouvert d'une phase de PDMS (PolyDiméthylSiloxane)

2. Analyse par le couplage TDU/CIS – GC/MS

2.1. Désorption thermique des barreaux

La désorption thermique des composés concentrés par la phase de PDMS (cf. *figure 2*) permet d'introduire les analytes dans le couplage GC-MS. Cette étape est réalisée par un désorbeur thermique (TDU : Thermal Desorption Unit) monté en série avec un injecteur à programmation de température (CIS : Cooled Injection System) (cf. *figure 3*). Pour ce faire, le barreau est placé dans un tube étanche à l'air situé sur le passeur d'échantillon puis introduit dans le TDU maintenu à la température de 50°C tandis que le CIS est refroidi à -50°C par de l'azote liquide. Le TDU est alors chauffé jusqu'à 300°C et la durée de désorption est fixée à 10 minutes. Les molécules ainsi libérées sont condensées dans le CIS (cf. *figure 3*), avant d'être injectées dans le couplage GC-MS par une montée en température rapide (de -50°C à 300°C à 10°C/s).

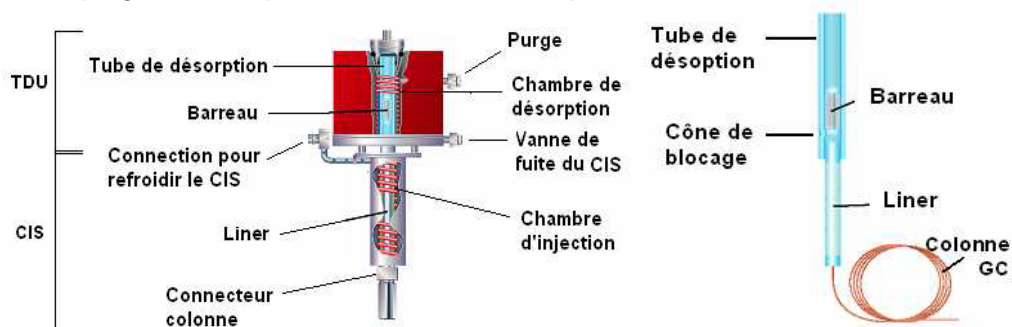


Figure 3 schémas de l'unité de désorption thermique (TDU) montée en série avec l'injecteur à programmation de température (CIS) (à gauche) relié au dispositif d'introduction des composés dans la colonne capillaire (à droite)

2.2. Conditions d'analyse par GC/MS

L'analyse est effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC/MS). L'analyse qualitative des différents composés est effectuée en mode SCAN (ce mode permet d'identifier les molécules) puis, pour le quantitatif, en mode SIM (Single Ion Monitoring : analyse ciblée des fragments caractéristiques de chaque composé étudié).

Validation de la méthode d'analyse

1. Préparation des analyses et des échantillons

Les solutions sont préparées à l'aide de deux solutions standard fournies par Ultra Scientific (North Kingstown, USA), l'une contenant, en solution dans un mélange acétonitrile/acétone, 21 hydrocarbures aromatiques polycycliques dont 16 identifiés comme polluants prioritaires par l'US EPA; l'autre contenant, en solution dans du méthanol, des pesticides organochlorés ainsi que des polychlorobiphényles.

Afin de quantifier les hydrocarbures et les pesticides dissous dans l'eau de mer, la technique de l'étalonnage interne a été appliquée en utilisant au minimum un étalon par famille de composés à analyser. Des HAPs deutérés sont ainsi ajoutés avant analyse à l'eau de mer : Naphtalène-d₈, Biphényl-d₁₀, Phénanthrène-d₁₀, Chrysène-d₁₂ et Benzo[a]pyrène-d₁₂, ainsi qu'un étalon interne appartenant à la famille des chlorobenzènes : le pentachloronitrobenzène, encore appelé quintozone.

Le mélange d'hydrocarbures et de pesticides ainsi que les étalons sont ajoutés en solution dans du méthanol afin d'augmenter la solubilité de ces composés et d'éviter leur adsorption sur les parois du flacon en verre (teneur finale de l'ordre de 10% de méthanol ultra pur).

2. Identification des composés

L'identification en mode SIM des différents composés est représentée par le chromatogramme *figure 5* obtenu avec des concentrations de 100 ng/L et un temps d'extraction de 24 heures. Ceux-ci montrent une bonne séparation pour les hydrocarbures, les PCBs et les organochlorés. On peut cependant remarquer que les organochlorés, composés les plus polaires (log K_{ow} faibles), présentent des intensités inférieures aux autres composés étudiés.

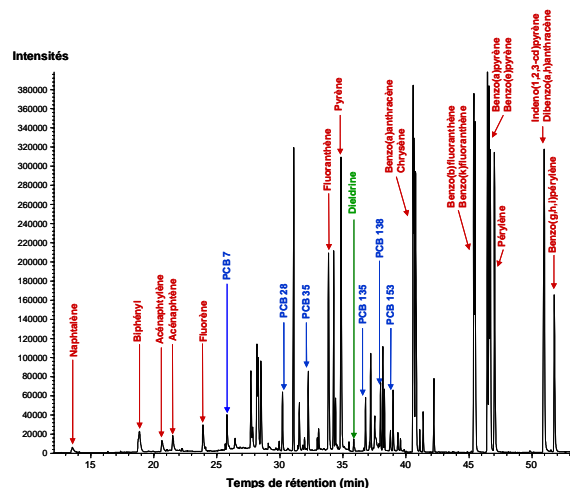


Figure 5 chromatogramme obtenu en mode SIM montrant l'abondance de pics représentatifs de certains composés en fonction de leurs temps de rétention

3. Définition des paramètres d'extraction

La technique SBSE, étant essentiellement contrôlée par des phénomènes de diffusion, les paramètres susceptibles d'affecter le processus d'extraction ont été étudiés : le temps d'agitation du barreau aimanté au sein de l'échantillon et les phénomènes de compétition entre les molécules de différents poids moléculaires (et donc ayant des K_{ow} différents).

Plusieurs expériences ont été menées avec des temps d'extraction allant de 1 heure à 24 heures. L'étude a été réalisée avec des solutions de concentrations en pesticides et en HAPs d'environ 100 ng/L pour un volume de 100 mL. Il est à noter qu'une extraction de 16 heures semble correspondre à un optimum, les évolutions entre 2 et 16 heures étant importantes alors que le gain après 16 heures est faible.

De plus, il apparaît que les cinétiques de sorption des pesticides sont plus lentes en comparaison des HAPs. Ainsi, une durée de 16 heures permettant d'atteindre l'équilibre a été définie pour la suite des expérimentations comme temps de référence d'extraction. L'abondance relative des composés caractéristiques présentés *figure 6* est normée par rapport aux intensités obtenues à 24 heures, celles-ci étant alors maximales pour la majorité des₃ composés.

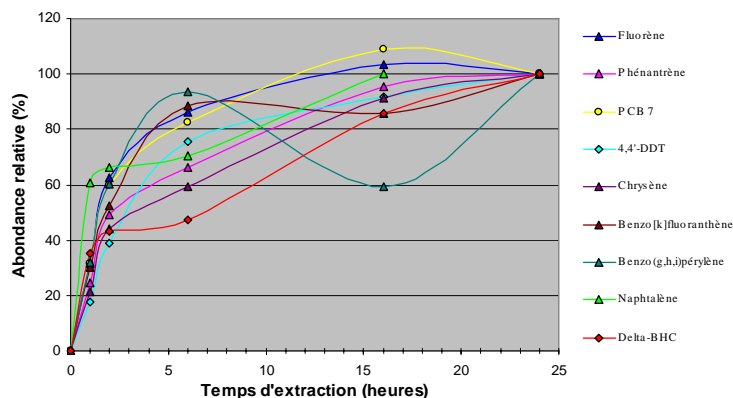


Figure 6 cinétiques d'extraction de quelques composés

Ces conditions constituent un bon compromis entre de bonnes performances en terme de sensibilité pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques les plus lourds (ainsi que pour certains des organochlorés comme le 4,4'-DDT ou le delta-BHC) et un temps d'extraction raisonnable compte-tenu des contraintes pratiques de manipulations et du dispositif. Par ailleurs, les rendements plus faibles acceptés pour les composés les plus légers sont compensés par des teneurs en général plus élevées dans l'environnement, en particulier pour le naphtalène.

Ainsi, il apparaît que des phénomènes cinétiques (diffusion des solutés au sein de la phase de polydiméthylsiloxane) coexistent avec des phénomènes thermodynamiques (compétition entre molécules au sein de la phase de polydiméthylsiloxane), l'affinité des composés lourds avec la phase semblant plus importante que celle des composés les plus légers.

4. Etalonnage et validation de la méthode SBSE

4.1. Calibration par la méthode de l'étalonnage interne

Afin de quantifier les composés dissous dans l'eau de mer, le choix d'un étalonnage interne a été retenu en utilisant un étalon au moins par famille de composés analysés. Le choix des étalons internes a été réalisé en fonction du temps de rétention et de la cinétique d'extraction les plus similaires au composé étudié.

Le PCB 35 est pris comme exemple pour illustrer cette étude. Le rapport d'aire pour ce composé est calculé relativement à son étalon interne, le phénanthrène- d_{10} .

Un modèle linéaire, présentant une bonne linéarité, a été obtenu pour l'ensemble des courbes de calibration comme le montre la droite d'étalonnage du PCB 35 (figure 7) ($R^2 > 0,99$).

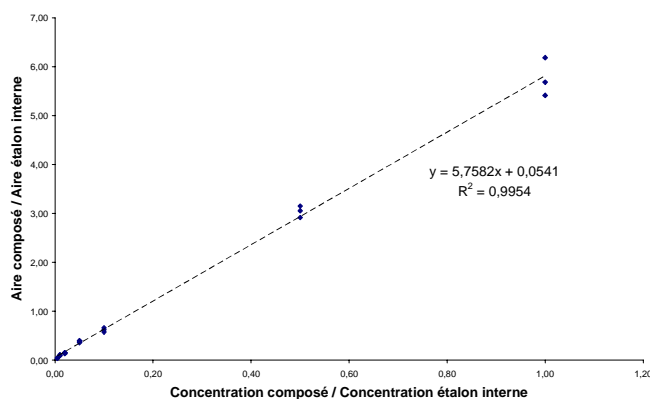


Figure 7 droite d'étalonnage du PCB 35

4.2. Limites de quantification

La synthèse des résultats figurant en *annexe 2* présente les limites de détection et de quantification pour l'ensemble des composés. Il apparaît que les limites de quantification sont de l'ordre ou inférieures à 1 ng/L pour l'ensemble des molécules cibles.

CONCLUSION

La pollution chimique de l'environnement n'a cessé d'augmenter avec l'industrialisation et l'urbanisation croissantes. Parmi les polluants organiques majeurs de notre environnement, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les polychlorobiphényles (PCBs) ainsi que les pesticides font l'objet d'une attention particulière, notamment dans le contexte de l'application de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) du fait de leur toxicité et de leur lien étroit avec les activités humaines. Dans ce contexte, la technique SBSE présentée dans cette étude a semblé prometteuse par sa simplicité de mise en œuvre et sa sensibilité.

Les limites de quantification propres à chaque composé ont été déterminées et elles sont de l'ordre ou inférieures à 1 ng/L pour l'ensemble des composés étudiés. Compte tenu des performances de la méthode d'analyse par SBSE, il apparaît que cette technique peut s'appliquer à des suivis environnementaux notamment dans le cadre de la DCE. Cette technique permet aussi dans le cadre des pollutions accidentelles de conduire des campagnes de mesure n'importe où, sans logistique lourde, et sans avoir à rapatrier vers le laboratoire de mesures, des volumes importants d'eau échantillonnée : il est maintenant facile de préparer des petits barreaux qui peuvent être aisément expédiés vers le laboratoire de mesure équipé du spectrographe de masse.

Par la suite, ce travail pourra se poursuivre en étendant le domaine des composés cibles à des structures similaires à celles des 21 HAPs étudiés, notamment en y associant leurs dérivés ramifiés. Le domaine d'étude peut également être étendu à d'autres sous-familles chimiques légèrement plus polaires telles que les atrazines, les urées ou les organophosphorés. Enfin, des molécules plus polaires comme les phénols, difficiles à extraire directement, peuvent être analysées après dérivation *in-situ*.

ANNEXE 1

Validation de la méthode d'analyse et limite de détection et quantification

La technique d'équilibre est basée sur le partage des solutés entre les phases, et défini par le log $K_{O/W}$ selon la formule à l'équilibre (1) :

$$K_{PDMS/W} \approx K_{O/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \left(\frac{m_{PDMS}}{m_W} \right) \left(\frac{V_W}{V_{PDMS}} \right) = \beta \left(\frac{m_{PDMS}}{m_W} \right) \quad (1)$$

où C_{PDMS} est la concentration des analytes dans le PDMS, C_W la concentration des analytes dans l'eau, m_{PDMS} et m_W respectivement la masse des analytes dans le PDMS et dans l'eau, V_W est le volume d'eau et V_{PDMS} le volume de PDMS utilisé, et avec le rapport de phase $\beta = V_W / V_{PDMS}$.

Le recouvrement R , qui est défini par le rapport de la quantité extraite de soluté (m_{PDMS}) sur la quantité initiale de soluté présente dans l'eau ($m_0 = m_W + m_{PDMS}$), est donc dépendant du coefficient de distribution $K_{PDMS/W}$ et du rapport de phase β , comme l'indique l'équation (2) :

$$R = \frac{m_{PDMS}}{m_0} = \frac{\frac{K_{PDMS/W}}{\beta}}{1 + \frac{K_{PDMS/W}}{\beta}} \quad (2)$$

Cette équation montre que l'efficacité de l'extraction augmente avec le coefficient $K_{PDMS/W}$ et donc avec $K_{O/W}$ (figure 1).

ANNEXE 2

Validation de la méthode d'analyse et limite de détection et quantification

La régression est testée sur 7 niveaux de concentration : 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 50 et 100 ng/L, et 3 répétitions par niveau sont effectuées. La concentration en étalon interne est constante et égale à 100 ng/L pour chaque niveau de concentration.

Ainsi, les chromatogrammes obtenus à partir des solutions de calibration sont retraités afin de tracer les courbes de calibration selon l'équation :

$$\frac{Aire_{HAP}}{Aire_{HAPd}} = f\left(\frac{C_{HAP}}{C_{HAPd}}\right) \quad \text{C exprimant la concentration}$$

Le modèle linéaire étant validé dans le cas du PCB 35, la méthode de la courbe d'étalonnage est appliquée à ce composé à titre d'exemple.

Le modèle postulé étant sans constante, la limite de détection est déterminée à l'aide de la formule suivante (6 degrés de liberté) :

$$LD = 0,08 \text{ ng/L}$$

On en déduit ensuite la limite de quantification à l'aide de la formule :

$$LQ = 0,28 \text{ ng/L}$$

Le calcul des limites de quantification et de détection a été effectué pour tous les autres composés étudiés selon la même méthode (tableau 1).

Tableau 1 tableau récapitulatif des LD et LQ des composés étudiés

Composés	LD (ng/L)	LQ (ng/L)	Composés	LD (ng/L)	LQ (ng/L)
Naphtalène	0,16	0,54	PCB 7	0,13	0,44
Benzothiophène	0,07	0,22	PCB 28	0,06	0,21
Biphényl	0,06	0,20	PCB 35	0,06	0,21
Acénaphthylène	0,06	0,21	PCB 52	0,06	0,20
Acénaphène	0,06	0,20	PCB 101	0,09	0,31
Fluorène	0,06	0,19	PCB 105	0,13	0,44
Dibenzothiophène	0,08	0,27	PCB 118	0,14	0,48
Phénanthrène	0,08	0,28	PCB 135	0,14	0,48
Anthracène	0,06	0,21	PCB 138	0,20	0,66
Fluoranthène	0,07	0,24	PCB 153	0,21	0,72
Pyrène	0,07	0,23	PCB 156	0,27	0,91
Benzo[a]anthracène	0,06	0,21	PCB 169	0,31	1,05
Chrysène	0,06	0,21	PCB 180	0,35	1,17
Benzo[b+k]fluoranthène	0,36	1,22	Alpha-BHC	0,07	0,24
Benzo[e]pyrène	0,06	0,20	β+γ-BHC	0,07	0,22
Benzo[a]pyrène	0,06	0,19	Delta-BHC	0,15	0,51
Pérylène	0,06	0,19	Aldrine	0,07	0,24
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	0,17	0,57	Isodrine	0,07	0,22
Dibenzo(a,h)anthracène	0,20	0,67	Endosulan	0,11	0,37
Benzo(g,h,i)pérylène	0,16	0,52	Dieldrine	0,11	0,37
			Endrine	0,23	0,77
			4,4'-DDT	0,20	0,67

DISCOBIOL (Dispersants et techniques de lutte en milieux côtiers : effets biologiques et apports à la réglementation)

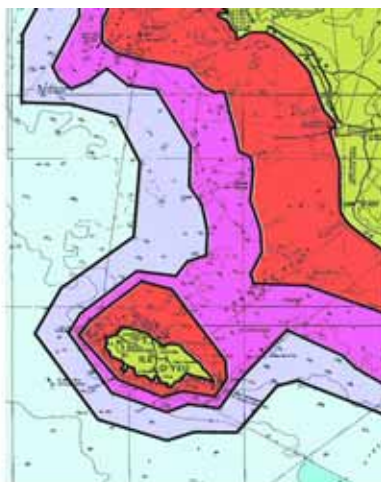
UN PROGRAMME DE 3 ANS POUR EVALUER L'IMPACT RESULTANT DE L'USAGE DES DISPERSANTS EN MILIEU COTIER OU ESTUARIEN.

Photos : source Cedre



Ce programme, originellement cofinancé par l'ANR, la **Marine Nationale** et le **MEEDDAT-DEB**, regroupe le **LIENSs** de l'**Université de la Rochelle**, l'**UBO-ISSTB Département ORPHY**, l'**AFSSA** site de Ploufragan-Plouzané, le **Cedre**, **Innospec Inc**, **TOTAL Fluides Spéciaux**, auxquels se sont joints le **Département Pêches et Océans canadien**, **ExxonMobil**, l'**ITOPF**, le **CRRC**, l'**OSR** et l'**IFREMER**.

Le recours aux produits dispersants pour traiter les nappes de pétrole est maintenant une des options de lutte couramment admises en pleine mer : la dispersion ou mise en suspension du pétrole dans la colonne d'eau permet de réduire la quantité de pétrole susceptible de venir s'échouer sur la côte et permet d'optimiser la dégradation du polluant par le milieu naturel. Toutefois, l'utilisation des dispersants près des côtes est plus restrictive car, en disséminant les hydrocarbures dans la colonne d'eau, et de ce fait en favorisant le contact entre ces derniers et la vie marine, la dispersion entraîne une augmentation locale et passagère de la toxicité des hydrocarbures, le temps que le nuage d'hydrocarbure « dispersé » se « dilue » assez pour devenir inoffensif. Il convient de disposer d'un volume d'eau suffisant et de rester à distance convenable des sites particulièrement sensibles (aquaculture, cantonnement, réserves..).



■ Zone terrestre
■ Zone côtière où la dispersion est a priori possible
■ Zone où il est possible de disperser jusqu'à 10 tonnes
■ Zone où il est possible de disperser jusqu'à 100 tonnes
■ Zone où il est possible de disperser jusqu'à 1 000 tonnes

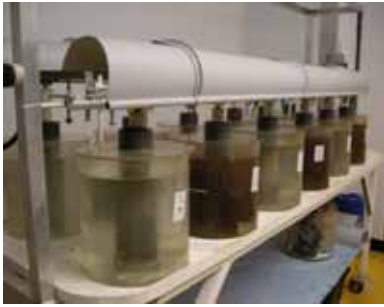
En ce sens, des limites d'utilisation ont été définies il y a presque 15 ans qui tiennent compte de la taille de la pollution à disperser, du volume d'eau (distance à la côte et profondeur) nécessaire à la « dilution » du pétrole dispersé (en termes de profondeur et de distance à la côte) et de la présence de ressources sensibles.

Ce travail général ne convient pas pour les estuaires et baies plus ou moins fermées pour lesquels le choix de la technique de lutte doit s'appuyer cette fois sur la comparaison des avantages et inconvénients, les bénéfiques et l'impact potentiel de l'usage de la technique vis-à-vis des différents éléments qui composent l'estuaire ou la baie.

Le programme de recherche DISCOBIOL, d'une durée de 3 ans et lancé en début 2008, cherche à comparer l'impact de la dispersion chimique et celui de la non dispersion vis-à-vis des différents milieux qui composent un estuaire en climat tempéré (organismes de pleine eau, vasière et marais) afin d'apporter les informations

nécessaires à la prise de décision quant au recours aux dispersants ou non.

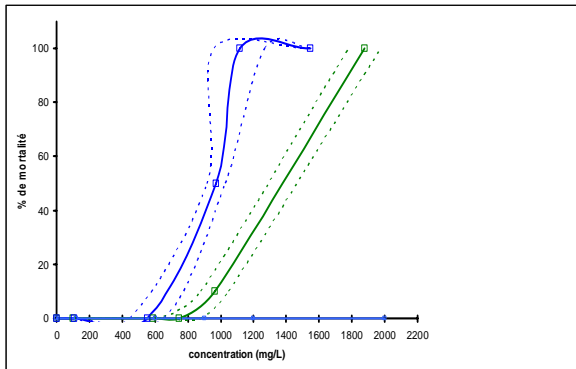
Globalement, il est prévu d'étudier la toxicité et l'impact d'un même pétrole avec et sans dispersant, successivement envers les organismes vivant dans la colonne d'eau (poissons, bivalves, crustacés) {phase 1}, envers les vasières {phase 2} et envers les marais {phase 3}. Afin de simuler au mieux des conditions réelles de pollution, les animaux sont ici exposés intégralement au pétrole dispersé (au pétrole en suspension dans la masse d'eau) et non uniquement à une fraction soluble du pétrole obtenue par filtration d'une dispersion, comme le font généralement les autres laboratoires et instituts : il s'agit de mesurer l'ensemble des effets résultant de la dispersion, la toxicité des composés dissous et l'impact lésionnel résultant du contact avec les gouttes de pétrole.



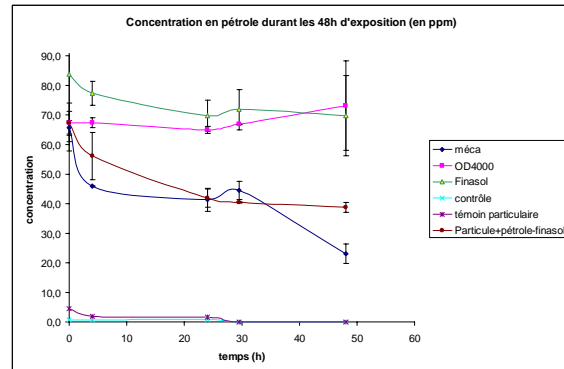
Dans un premier temps, on a cherché à évaluer la toxicité aiguë (concentration létale 50% - 24 heures) du pétrole dispersé et non dispersé sur les organismes vivants dans la colonne d'eau (poissons, crevettes, bivalves). Il apparaît que, dans les conditions de l'essai (notamment l'agitation), il n'était pas possible d'obtenir des

concentrations stables en pétrole dispersé mécaniquement supérieures à environ 600 ppm, alors qu'avec les dispersants, il est possible d'atteindre des concentrations stables élevées jusqu'à 2900 ppm.

Dans ces conditions, sur les poissons et les crevettes, les concentrations létales pour le pétrole dispersé mécaniquement n'ont jamais été atteintes alors qu'elles se sont étagées entre 300 et 1400 ppm pour la dispersion chimique.



Toxicité du pétrole dispersé avec le dispersant 1 (bleu), avec le dispersant 2 (vert foncé) sur le bar : CL_{50-24h} de l'ordre de 900 et 1300 ppm



Exemple d'évolution des concentrations en hydrocarbures totaux dans la colonne d'eau durant un essai « effets sublétaux » sur le bar

Les bivalves réagissent de façon particulière : au-delà de concentrations de l'ordre de 200 à 400 ppm, ils se protègent en se fermant afin de s'isoler du milieu.

Il n'en reste pas moins que les concentrations létales observées sont excessivement supérieures aux concentrations observées sur le terrain dans le cas de pollutions réelles, concentrations qui sont le plus souvent de l'ordre de quelques ppm à quelques dizaines de ppm.

Le travail se poursuit en étudiant maintenant les effets sublétaux provoqués par des expositions plus réalistes (quelques dizaines de ppm pendant 48 h). Le plan d'expérience compare les conditions suivantes : pétrole dispersé mécaniquement, pétrole dispersé chimiquement et, s'agissant d'étudier des conditions estuariennes, pétrole dispersé chimiquement dans une eau chargée en particules sédimentaires (argile) ; à cela s'ajoutent des bacs de contrôle sans pétrole, avec et sans argile.



Les toutes premières observations semblent montrer que la présence de particules argileuses réduit l'impact du pétrole qui doit se fixer sur ces dernières (réduction de la bio-disponibilité du pétrole). Bien sûr, il conviendra de confirmer ces observations au fur et à mesure que les résultats d'analyses seront connus avant d'en déduire les implications quant à l'usage des dispersants dans les estuaires....

Ce programme se déroule actuellement au *Cedre*, dans les nouvelles installations développées pour l'occasion, à savoir un banc d'exposition composé de 14 bacs de 300 L et une installation de stabulations d'un volume d'une dizaine de mètres cube sur 4 bacs, où les animaux sont réceptionnés puis conservés après l'essai à fins d'analyses.



Nouvelles installations d'essais écotoxicologiques

Les dispersions de pétrole n'étant pas stables (tendance à coalescer lorsque l'agitation est faible), tous les bacs d'exposition ont été équipés d'un système qui permet de remettre continuellement en suspension le pétrole : une petite pompe munie d'un écrémeur à seuil récupère en permanence le pétrole qui remonte à la surface de pompage pour le réinjecter en fond de bac.



Détail d'un bac d'exposition muni du système d'écémage destiné à remettre en continu le pétrole en suspension

