

Yvan GRU<sup>1,2</sup>, Ronan COLIN<sup>1</sup>, Pierre LE CLOIREC<sup>2</sup>

## Identification et confirmation de molécules organiques par SPE en ligne couplée à la spectrométrie de masse hybride de type triple quadripôle-trappe ionique linéaire. Utilisation de l'acquisition combinée MRM-Full scan MS/MS en analyse environnementale

### RÉSUMÉ

De nombreux composés d'origine anthropique sont détectés dans l'environnement, particulièrement dans les eaux de surface utilisées comme ressource. Parmi ces molécules, les pesticides, bien qu'ils soient parfois présents à de très faibles concentrations, peuvent causer des dommages sanitaires ou environnementaux. La préparation de l'échantillon et la méthode analytique sont les deux points critiques de la qualité d'un dosage. L'extraction demeure notamment une étape fastidieuse qui génère des problèmes de récupération. Pour les réduire, une technique de chromatographie liquide avec préconcentration en ligne (SPE-LC) couplée à un spectromètre de masse de type trappe ionique linéaire (LIT) a été développée et validée en matrice eau propre (type eau d'Evian) et en eau de rivière (type rivière Loire – Nantes). Les critères de performances retenus étaient les suivants : exactitude, reproductibilité, sélectivité et sensibilité afin d'atteindre aisément des limites de quantification (LQ) au niveau 10 ng/L, pour un grand nombre de molécules. Près de 150 pesticides sont analysés dans le même run chromatographique en mode ElectroSpray positif. Deux mL d'échantillon d'eau sont percolés à travers une cartouche appropriée. Les LQ atteintes dans les deux matrices sont, pour la plupart des molécules inférieures ou égales à 10 ng/L. Les résultats montrent que la SPE-LC couplée à la spectrométrie de masse à trappe ionique linéaire est une technique adaptée, entièrement automatisable, pour réaliser une analyse multi-résidus de routine dans ces types d'eaux. L'étude a ensuite été focalisée sur la qualité d'identification des composés par l'utilisation du mode d'acquisition MRM-EPI (Full Scan MS/MS) disponible sur ce type de spectromètre. Ce mode de balayage se révèle comme un outil de choix pour assurer l'identification en dosage multi-résidus.

### MOTS-CLÉS

Analyse des eaux, préconcentration en ligne, LC-MS/MS, pesticides, MRM-EPI

## Organic compounds identification and confirmation by on-line SPE coupled to hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. Use of MRM-Full scan MS/MS in environmental analysis

### SUMMARY

To analyse swiftly and reliably numerous pesticides in waters, an on-line solid phase extraction liquid chromatography technique (on-line SPE-HPLC) coupled with triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry (Q-Trap MS/MS) procedure was developed for a large range of chemical families with detection limits at the 10 ng/L level. In this study, triazines, phenylureas, organophosphorus compounds and others (more than 150 compounds) were tested in the same ESI positive chromatographic run (less than 25 min). 2 mL of water sample (filtered if necessary) were injected into the SPE-HPLC system through a preconcentration cartridge. Analytes were eluted by a suitable mobile phase towards an analytical column (monolithic stationary phase), then detected and quantified by the mass spectrometer (MS/MS). The LOQ were achieved under the 10 ng/L level for the most of compounds in the both matrices (tap water and river water). The study was then focused on the identification by using the MRM-EPI scan mode (full-scan MS-MS), available on this kind of mass spectrometer. Results show that on-line-SPE-LC technique, coupled with hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry is a suitable way to determine multiple organic residues in waters.

### KEYWORDS

Water analysis, on-Line solid phase extraction, LC-MS/MS, pesticides, MRM-EPI

<sup>1</sup> IDAC – Institut Départemental d'Analyse et de Conseil – Route de Gâchet – BP 52703 – 44327 Nantes cedex 3

<sup>2</sup> Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes – Campus de Beaulieu – 263, Avenue du général Leclerc – 35000 Rennes

Identification et confirmation de molécules organiques par SPE en ligne couplée à la spectrométrie de masse hybride de type triple quadripôle-trappe ionique linéaire. Utilisation de l'acquisition combinée MRM-Full scan MS/MS en analyse environnementale

## I - Introduction

La chimie analytique est une science d'intérêt majeur pour la préservation de l'environnement et la sécurité alimentaire. En association avec d'autres disciplines, elle permet d'évaluer les risques encourus par l'homme au regard de la présence de substances dangereuses dans l'environnement et les aliments. Il s'agit, parmi les substances dangereuses, d'une majorité de micropolluants organiques, pour lesquels les méthodes d'analyses ne sont pas développées ou sont inadaptées aux exigences d'identification et de quantification. On comprend alors bien tout l'enjeu, pour le laboratoire d'analyse, de se préparer à ces nouveaux défis.

Depuis quelques années, la technique d'extraction (SPE) couplée en ligne à la chromatographie liquide (1-7) est venue compléter toute la panoplie de méthodes d'extraction des micropolluants organiques dans les eaux (8-14). Elle apparaît judicieuse pour réduire les temps de préparation d'échantillonnage et augmenter la cadence analytique. La tendance est également de rendre les méthodes les plus automatisables possibles à des fins stratégiques, économiques et pratiques.

C'est pourquoi un système de préconcentration en ligne couplée à un système HPLC-MS/MS a été envisagé pour l'analyse de pesticides à l'état de traces dans les eaux douces et naturelles.

Malgré une mise en œuvre simple en première approche, le paramétrage de tous les facteurs influençant la quantification et la détection se révèle critique quand il s'agit de doser plus d'une centaine de composés ayant des comportements physico-chimiques différents voire contradictoires. Notons, par exemple, que les effets matrice sont souvent négligés lors de la quantification d'un composé ; pourtant certains auteurs donnent une évaluation juste de ces effets (15-16). La sûreté d'identification apparaît également un élément à prendre en considération au regard du nombre de molécules à doser. C'est ce point que nous avons ici développé.

L'utilisation du triple quadripôle comme analyseur de masse offre la possibilité d'enregistrer un grand nombre de transitions MRM (Multiple Reaction Monitoring : au moins deux transitions par molécule cible).

L'obtention d'au moins deux transitions par analyte est rendue quasiment obligatoire pour atteindre le nombre de points d'identification suffisants à la confirmation d'un résultat (décision 2002/657/CE de la Commission Européenne (17)). Cependant certaines limites sont inhérentes à ce système de confirmation de résultat ; citons notamment l'absence ou la très faible intensité de la deuxième transition, rapport signal deuxième transition/signal première transition non stable.

La technologie QTrap permet d'utiliser un autre mode de confirmation de résultat : l'acquisition

MRM-EPI (Multiple Reaction Monitoring - Enhanced Product Ion scan). Il s'agit de quantifier un composé par sa transition MRM et de confirmer sa présence par un spectre complet Full Scan MS/MS (=EPI) par la trappe d'ions linéaire.

## II - Matériels et méthodes

### 1. Réactifs et composés analysés

Tous les solvants utilisés sont de qualité analytique. L'acétonitrile (AcN) et l'eau HPLC sont fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne) ; le méthanol (MeOH) et l'acétone par Carlo Erba-SDS (Val de Reuil, France). Le formiate d'ammonium (99 % pur, qualité MS) et l'acide formique (99 % pur, qualité Normapur) ajoutés aux solvants chromatographiques proviennent respectivement de Fluka (Buchs, Suisse) et VWR International (Fontenay/Bois, France).

Les filtres de porosité 0,45 µm sont fournis par Whatman (Mantes La Jolie, France).

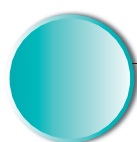
Les standards analytiques et les produits de dégradation (voir tableau I, voir pages 24 à 27) proviennent de deux sources différentes : ACSD (Voisins-le-Bretonneux, France), et Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Allemagne). Les solutions stock pour chaque analyte sont à une concentration de 10 mg/L dans AcN, MeOH ou acétone. Les étalons internes (en italique dans le tableau I) proviennent de ACSD (Voisins-le-Bretonneux, France).

La solution de travail contenant tous les pesticides est préparée chaque jour par dilutions successives de la solution stock dans de l'eau HPLC à une concentration de 4 µg/L. Cette solution de travail sert ensuite pour doper la matrice référence (Evian) à différents niveaux de concentrations (de 10 à 200 ng/L), ceci constituera la gamme d'étalonnage. L'ajout d'étalons internes se fait pour chaque échantillon (Evian ou autre matrice aqueuse) à partir d'une solution en mélange à 10 µg/L, la concentration retrouvée pour chaque étalon interne est alors de 100 ng/L dans l'échantillon.

### 2. Le couplage SPE en ligne - LC-MS/MS

#### 2.1 - La chromatographie liquide haute performance

Le système Ultimate 3000® Dual Gradient HPLC (Dionex, France) a été utilisé dans le cadre de cette étude. Il comprend un passeur d'échantillons avec une boucle d'injection de 2500 µL (les échantillons sont thermostatés à 15 °C), un système de pompage (dégazeur en ligne intégré) qui gère deux pompes (la « Loading Pump » pour l'étape de préconcentration et la « Micro Pump » pour l'étape d'élution vers la colonne analytique), et un four colonne (thermostaté à 30 °C). L'étape de préconcentration est réalisée avec une cartouche de type polymérique Strata X,



**Tableau I (partie 1/4)**

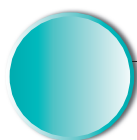
Liste des molécules analysées avec les conditions MS/MS. <sup>a</sup>LQ estimée (S/N=10) par rapport à un échantillon d'eau d'Evian dopé à 50 ng/L. <sup>b</sup>selon la norme NF T90-210 (AFNOR, Mai 2009) (18).

Composé	Famille Chimique	Ion parent [M+H] <sup>+</sup>	Ion produit pour la quantification	Énergie de Collision (V)	LQ (ng/L) Matrice Evian <sup>a</sup>	LQ statistique (ng/L) <sup>b</sup>
1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-méthylurée (DCPMU)	Urée	219	127,1	35	0,9	10
1-(3,4-Dichlorophenyl)urée (DCPU)	Urée	205	127,1	35	3,3	10
1-(4-Isopropylphenyl)urée (IPPU)	Urée	179,1	94,1	30	1	10
2,6-Dichlorobenzamide	Amide	190,1	173,1	25	10,9	20
2-Hydroxyatrazine (20H-A)	Triazine	198,1	156,1	25	1,8	10
2-Hydroxyatrazine-D5	Triazine deutéré	203,1	161,1	25	/	/
2-Hydroxysimazine (20H-S)	Triazine	184,1	114,1	25	0,7	10
2-Hydroxyterbutylazine (20H-T)	Triazine	212,1	156,1	25	0,3	10
Acetamiprid	Néonicotinoïde	223,1	126,1	25	0,1	10
Ametryne	Triazine	228,1	186,1	25	0,2	10
Amidosulfuron	Sulfonylurée	370,1	261,1	20	2,2	20
Atrazine	Triazine	216,1	174,1	25	2,3	10
Atrazine-D5	Triazine deutéré	221,1	179,1	25	/	/
Atrazine Deisopropyl (DIA)	Triazine	174,1	104,1	30	5,3	20
Atrazine Desethyl (DEA)	Triazine	188,1	146,1	25	2,4	10
Atrazine Desethyl-D6	Triazine deutéré	194,1	147,1	25	/	/
Azaconazole	Triazole	300,2	159	40	1,4	10
Azamethipos	Organophosphoré	325	183	20	0,4	10
Azoxystrobine	Strobilurine	404,1	372,1	20	0,2	10
Benalaxyl	Acylalanine	326,2	148,1	30	0,1	10
Boscalid	Carboxamide	343,1	307,1	40	7,2	20
Bromuconazole	Triazole	376,1	159	25	4,1	20
Bupirimate	Aminopyrimidinole	317,1	166,1	35	0,2	10
Buturon	Urée	237,1	84,1	20	1,7	10
Carbendazim	Carbamate	192,1	160,1	30	0,1	10
Carbendazim-D3	Carbamate deutéré	195,1	160,1	25	/	/
Carbetamide	Carbamate	237,1	118,1	15	3,5	10
Carbofuran	Carbamate	222,1	123,1	30	0,4	10
Carbofuran-D3	Carbamate deutéré	225,1	123,1	30	/	/
Chloridazone	Pyridazinone	222	104,1	30	0,9	20
Chlorotoluron	Urée	213,1	72,1	35	0,2	10
Chloroxuron	Urée	291	72,1	45	0,3	10
Chlorsulfuron	Sulfonylurée	358,1	167,1	25	8,2	20
Clomazone	Isoxazolidinone	240,1	125,1	30	5,1	10
Coumaphos	Organophosphoré	363	227	35	2,6	10
Cyanazine	Triazine	241,1	214,1	20	1,5	20
Cycluron	Urée	199,1	89,1	20	0,9	10
Cyproconazole	Triazole	292,2	70,1	40	1,8	10
Cyprodinil	Pyrimidine	226,2	93,2	50	2,5	20
Cyromazine	Triazine	167,1	125,1	25	1,7	10

Identification et confirmation de molécules organiques par SPE en ligne couplée à la spectrométrie de masse hybride de type triple quadripôle-trappe ionique linéaire. Utilisation de l'acquisition combinée MRM-Full scan MS/MS en analyse environnementale

**Tableau I (partie2/4)** - Liste des molécules analysées avec les conditions MS/MS. \*LQ estimée (S/N=10) par rapport à un échantillon deau d'Evian dopé à 50 ng/L. <sup>b</sup>selon la norme NF T90-210 (AFNOR, Mai 2009) (18).

Composé	Famille Chimique	Ion parent [M+H] <sup>+</sup>	Ion produit pour la quantification	Énergie de Collision (V)	LQ (ng/L) Matrice Evian <sup>a</sup>	LQ statistique (ng/L) <sup>b</sup>
Demeton-S-methylsulfone	Organophosphoré	263,1	169,1	20	0,5	10
Demeton-S-methylsulfoxyde	Organophosphoré	247,1	169,1	20	0,3	10
Desmethyl Isoproturon (IPPMU)	Urée	193,1	94,1	30	0,3	10
Desmetryne	Triazine	214,1	172,1	25	0,2	10
Diazinon	Organophosphoré	305,1	169,1	25	0,2	10
Diclobutrazole	Triazole	328,1	70,1	40	6,8	10
Difenoconazole	Triazole	406,1	251,1	35	0,4	10
Diiflufenicanil	Carboxamide	395	266	35	0,8	10
Dimefuron	Urée	339,1	72,1	50	3,6	10
Dimethachlor	Chloroacétamide	256,1	224,1	20	0,7	10
Dimethenamide	Chloroacétamide	276,1	244,1	20	0,4	10
Dimethoate	Organophosphoré	230	199	15	0,2	10
<i>Dimethoate-D6</i>	<i>Organophosphoré Deutééré</i>	236	205	15	/	/
Dimethomorph	Morpholine	388,1	301,1	25	0,9	10
Dimetilan	Carbamate	241,1	72,1	30	0,2	10
Dininconazole	Triazole	326,1	70,1	50	1,5	20
Diuron	Urée	233	72,1	40	2,9	10
Epoxiconazole	Triazole	330,1	121,1	30	0,6	10
Ethidimuron	Urée	265	208	20	0,5	10
Ethoprophos	Organophosphoré	243,1	97	40	2,1	10
Fenamidone	Imidazolinone	312,1	92,1	35	0,8	10
Fenbuconazole	Triazole	337,1	125,1	40	2,5	10
Fenoxycarb	Carbamate	302,1	88,1	30	5,7	10
Fenuron	Urée	165,1	72,1	30	0,1	10
Flazasulfuron	Sulfonylurée	408,1	182,1	25	0,6	10
Fluazifop-p-buthyl	Aryloxyacide	384,1	282,1	25	0,3	10
Fluometuron	Urée	233,1	72,1	40	0,2	10
Flurtamone	Furanone	334,1	247,1	35	0,2	10
Flusilazole	Triazole	316,1	165,1	35	1	10
Fluthiamide	Oxyacétamide	364	152	25	1,2	20
Flutriafole	Triazole	302,1	70,1	35	4,5	10
Furalaxyl	Acyalanine	302,1	242,1	20	0,7	10
Furathiocarb	Carbamate	383,2	195,1	25	0,2	10
Haloxypop-methyl	Aryloxyacide	376,1	316,1	20	0,6	10
Hexaconazole	Triazole	314,1	70,1	45	1,7	10
Hexazinone	Triazinone	253,2	171,2	20	0,5	10
Imazamethabenz-methyl	Imidazolinone	289,1	144,1	50	0,1	10
Imidacloprid	Imidazolidinimine	256,1	209,1	25	1	10
Isoproturon	Urée	207,1	72,1	35	0,1	10
Isoxaben	Amide	333,2	165,1	25	0,1	10



**Tableau I (partie 3/4)** - Liste des molécules analysées avec les conditions MS/MS. <sup>a</sup>LQ estimée (S/N=10) par rapport à un échantillon d'eau d'Evian dopé à 50 ng/L. <sup>b</sup>selon la norme NF T90-210 (AFNOR, Mai 2009) (18). <sup>c</sup>correspondant aux deux isomères (Z) et (E).

Composé	Famille Chimique	Ion parent [M+H] <sup>+</sup>	Ion produit pour la quantification	Énergie de Collision (V)	LQ (ng/L) Matrice Evian <sup>a</sup>	LQ statistique (ng/L) <sup>b</sup>
Lenacil	Uracile	235,1	153,1	20	4,2	10
Linuron	Urée	249,1	160,1	25	3,6	10
Mefenacet	Oxyacétamide	299,1	148,1	20	0,3	10
Mepanipyrim	Anilinopyrimidine	224,1	106,1	35	1	10
Mepronil	Carboxamide	270,1	119,1	30	0,2	10
Metalaxyl	Acylalanine	280,1	220,1	15	0,5	10
Metamitron	Triazinone	203,1	104,1	35	2,9	20
Metazachlore	Chloroacétamide	278,1	134,1	30	0,1	10
Metconazole	Triazole	320,1	70,1	40	2,1	10
Methabenzthiazuron	Urée	222,1	150,1	45	1,4	10
Methomyl	Carbamate	163,1	88	15	0,7	20
Metobromuron	Urée	259,1	170,1	25	3,1	10
Metolachlore	Chloroacétamide	284,1	252,1	20	0,2	10
Metosulam	Triazole	418,1	175,1	35	1	10
Metoxuron	Urée	229,1	72,1	30	0,6	10
Metribuzin	Triazine	215,1	84,1	30	6,1	20
Metsulfuron-methyl	Sulfonylurée	382,1	167,1	25	1,1	10
Mevinphos (deux pics séparés) <sup>c</sup>	Organophosphoré	225,2	193,2	10	1,6/3,1	10/10
Monolinuron	Urée	215,1	126,1	25	3	10
Monuron	Urée	199,1	72,1	35	1,5	10
Myclobutanil	Triazole	289,1	70,1	35	9,8	20
Napropamid	Alkanamide	272,2	129,2	20	0,2	10
Neburon	Urée	275,1	88,1	20	2,6	10
Nicosulfuron	Sulfonylurée	411,1	182,1	25	1,3	10
Norflurazon	Pyridazinone	304	284	30	0,5	10
Ofurace	Butyrolactone	282,1	160,1	30	1,8	10
Oxadixyl	Oxazolidinone	279,1	132,1	40	1,7	10
Penconazole	Triazole	284,2	159,1	40	1,2	10
Pencycuron	Urée	329,1	125,1	40	0,2	10
Phosphamidon	Organophosphorée	300,1	127,1	30	0,4	10
Pirimicarb	Carbamate	239,1	72,1	35	0,2	10
Pirimiphos-ethyl	Organophosphorée	334,1	198,1	30	0,03	10
Pirimiphos-methyl	Organophosphoré	306,1	108,1	40	0,2	10
Prometon	Triazine	226,2	184,1	25	0,3	10
Prometryne	Triazine	242,1	200,1	25	0,2	10
Propachlore	Chloroacétamide	212,1	170,1	20	1,1	10
Propanil	Anilide	218	127,1	40	2,4	10
Propazine	Triazine	230,1	188,1	25	2,4	10
Propiconazole	Triazole	342,1	159	40	2,4	10
Propyzamide	Benzamide	256,1	190,1	20	1,8	10

Identification et confirmation de molécules organiques par SPE en ligne couplée à la spectrométrie de masse hybride de type triple quadripôle-trappe ionique linéaire. Utilisation de l'acquisition combinée MRM-Full scan MS/MS en analyse environnementale

**Tableau I (partie 4/4)** - Liste des molécules analysées avec les conditions MS/MS. <sup>a</sup>LQ estimée (S/N=10) par rapport à un échantillon de eau d'Evian dopé à 50 ng/L. <sup>b</sup>selon la norme NFT90-210 (AFNOR, Mai 2009) (18).

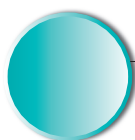
Composé	Famille Chimique	Ion parent [M+H] <sup>+</sup>	Ion produit pour la quantification	Énergie de Collision (V)	LQ (ng/L) Matrice Evian <sup>a</sup>	LQ statistique (ng/L) <sup>b</sup>
Prosulfocarb	Carbamate	252,1	91,1	20	0,1	10
Pymetrozine	Triazinone	218,1	105,1	30	0,6	10
Pyraclostrobin	Strobilurine	388,1	194,1	15	0,1	10
Pyrazophos	Organophosphoré	374,1	222,1	30	0,3	10
Pyrifénox	Pyridine	295	93,1	40	0,7	10
Pyriméthanyl	Pyrimidine	200,1	107,1	35	1,8	10
Quinalphos	Organophosphoré	299,1	163,1	30	1,4	10
Quizalofop-ethyl	Aryloxyacide	373,1	299,1	25	1	10
Sebuthylazine	Triazine	230,1	174,1	25	1,6	10
Secbumeton	Triazine	226,2	170,1	25	0,1	10
Siduron	Urée	233,1	137,1	30	1,3	10
Simazine	Triazine	202,1	132,1	25	1,7	10
Simazine-D5	Triazine Deutééré	207,1	129,1	25	/	/
Simetryne	Triazine	214,1	68,1	55	0,1	10
Sulfosulfuron	Sulfonylurée	471,1	211,1	20	4,2	10
Sulfotep	Organophosphoré	323	115,1	40	0,3	10
Tebuconazole	Triazole	308,2	70,1	40	1	10
Tebutame	Amide	234,2	91,1	30	0,1	10
Tebuthiuron	Urée	229,1	172,1	25	0,4	10
Terbumeton	Triazine	226,2	170,1	25	0,2	10
Terbumeton Desethyl	Triazine	198,1	142,1	20	0,7	10
Terbuthylazine	Triazine	230,1	174,1	25	1	10
Terbuthylazine Desethyl (DETA)	Triazine	202,1	146,1	20	5	10
Terbutryne	Triazine	242,1	186,1	25	0,1	10
Tetraconazole	Triazole	372	159,1	45	2,7	10
Thiabendazole	Benzimidazole	202,1	175,1	35	0,1	10
Thiabendazole-D6	Benzimidazole Deutééré	208,1	180,1	35	/	/
Thifensulfuron-methyl	Sulfonylurée	388,1	167,1	20	2,3	10
Triadimefon	Triazole	294	197,1	20	2,5	10
Triasulfuron	Sulfonylurée	402,1	167,1	25	5,9	20
Trifloxystrobin	Strobilurine	409,1	186,1	25	0,1	10
Triflusaluron-Methyl	Sulfonylurée	493,1	264,1	30	0,6	10
Vamidotion	Organophosphoré	288,1	146,1	15	0,1	10

20 × 2,0 mm, 25 µm, Phenomenex (Californie, Etats-Unis). Pour la séparation chromatographique, une colonne monolithique provenant de la société Merck (Darmstadt, Allemagne) est utilisée. Il s'agit de la Chromolith® Performance RP-18e 100 × 3 mm.

## 2.2 - Le spectromètre de masse hybride

Le spectromètre de masse utilisé est un API

3200 QTrap™ hybride triple quadripôle trappe d'ions linéaire (Applied Biosystems/MDS-Sciex, Toronto, Canada). Il est équipé des deux sources ESI (Turboionspray®) et APCI (Heated Nebulizer®). Seule la source ESI a été testée pour cette étude. L'azote est utilisé comme gaz de nébulisation, gaz de désolvatation et gaz rideau pour la partie source. Pour la partie analyseur, le gaz de collision en mode MRM est également



Paramètre Source	Valeur TurboSpray
TIS voltage (V)	1750
Température (°C)	650
Gas 1 (psi) (gaz de nébulisation)	35
Gas 2 (psi) (gaz de désolvatation)	60
Curtain Gas (psi) (gaz rideau)	25

**Tableau II**  
Conditions optimisées pour la source ElectroSpray (ESI).

de l'azote. Les conditions source sont présentées dans le Tableau II, elles ont été optimisées après injection de plusieurs composés en mode SPE en ligne. Un compromis a été trouvé pour avoir la meilleure ionisation possible.

Les transitions MRM de quantification (ion parent > ion produit) ont été déterminées en mode infusion pour chaque molécule après optimisation de paramètres de tensions d'accélération et de collision (tension de déclustering (DP), potentiel d'entrée en Q0 (EP), énergie de collision (CE), pression de collision (CAD), potentiel de sortie de la cellule de collision (CXP),...). Les transitions MRM sont recensées dans le Tableau I (voir pages 24 à 27), les valeurs de DP, EP, CXP ont été fixés respectivement à 40V, 4V et 3V ; de même le gaz de collision est fixé à une valeur arbitraire « High » (environ  $4.10^{-5}$  Torr).

### 2.3 - Principe et montage de la SPE en ligne couplée au spectromètre de masse

Deux étapes sont nécessaires pour extraire en ligne un échantillon d'eau à analyser : le chargement de l'échantillon sur colonne SPE avec un temps de percolation, et l'élution des composés du support vers la colonne analytique, qui sont ensuite dirigés vers la source du spectromètre de masse.

La préconcentration en ligne s'effectue au

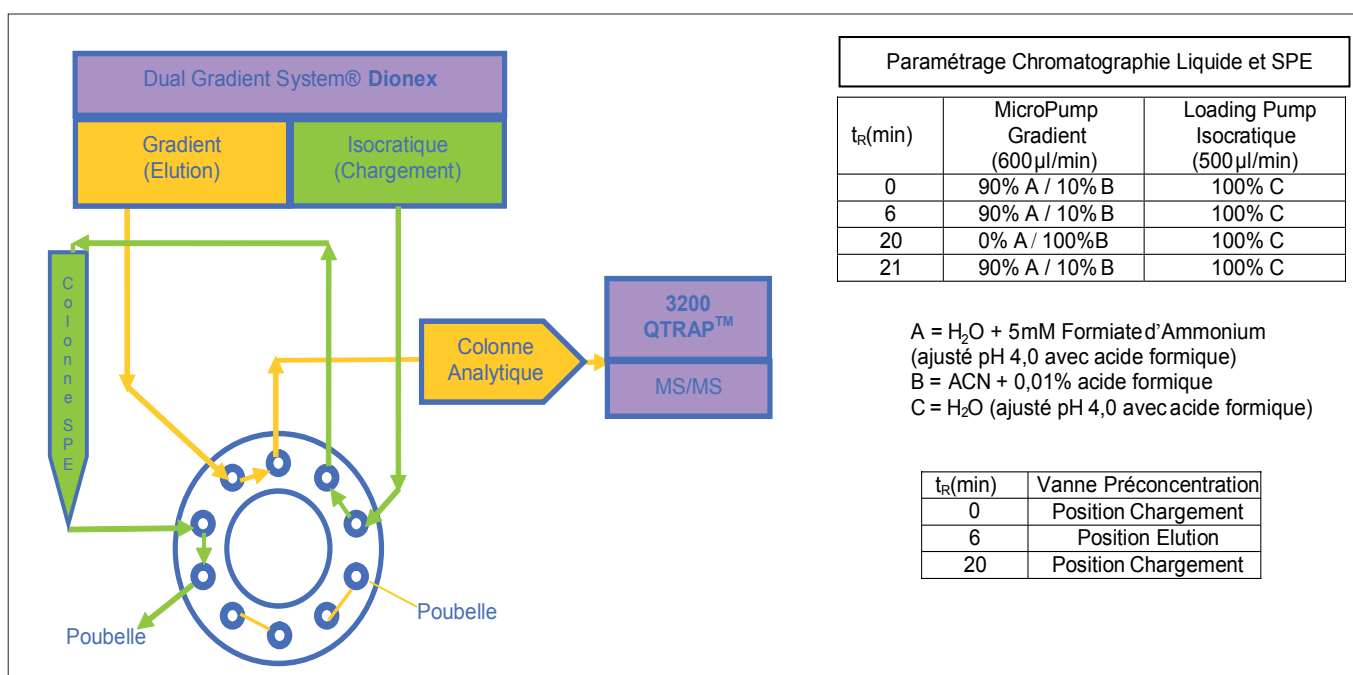
niveau du compartiment four colonne de la chaîne HPLC Dionex. Les deux pompes assurent les deux étapes précitées : la « Loading Pump » sert à charger l'échantillon vers la colonne de préconcentration, et la « Micro-Pump » est utilisée pour éluer les composés vers la colonne analytique.

Le principe en mode chargement échantillon est illustré par la Figure 1 : après filtration de l'échantillon si nécessaire (présence de matières en suspension), 2 mL sont préconcentrés dans la colonne SPE à un débit de 500 µL/min par la « Loading Pump ». Après six minutes de percolation, le mode élution est enclenché. Les composés fixés au support SPE sont élués en mode « BackFlush » (sens inverse de la percolation) par la « MicroPump » à un débit de 600 µL/min. Les composés sont alors entraînés vers la colonne analytique puis vers le spectromètre de masse pour être détectés en mode MRM. La détection nous donne donc le résultat « en direct » de la réponse de l'échantillon extrait en ligne. Le temps global de la méthode pour un échantillon est donc avantageux puisqu'il atteint seulement 23 min pour une acquisition en mode ESI positif (3 min d'injection, 6 min d'extraction, 14 min d'analyse chromatographique).

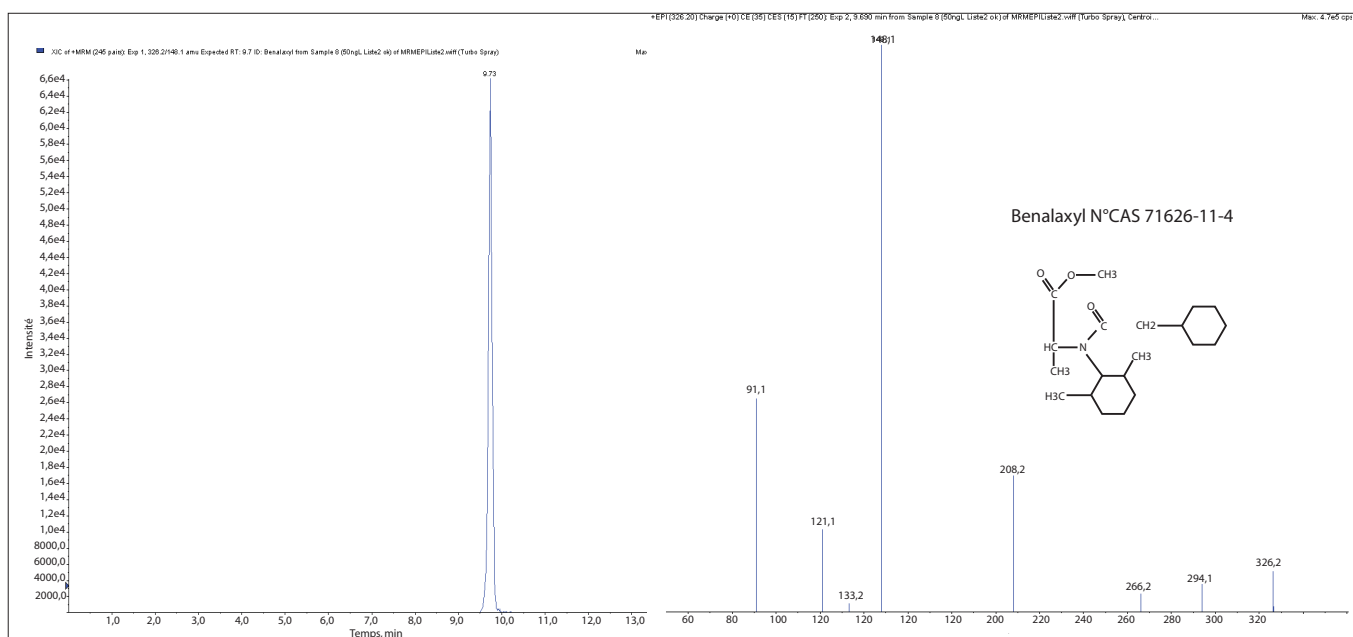
### 3. L'acquisition en mode MRM-EPI

Le mode MRM-EPI est la combinaison de deux acquisitions successives : l'acquisition en trappe d'ions linéaire s'effectue seulement si l'intensité de la transition MRM dépasse un seuil de signal fixé par l'opérateur. L'acquisition EPI d'un échantillon inconnu ainsi obtenue est riche en informations spectrales et peut alors être comparée à celle enregistrée dans une bibliothèque.

**Figure 1**  
Montage SPE en ligne en mode chargement d'échantillon.



Identification et confirmation de molécules organiques par SPE en ligne couplée à la spectrométrie de masse hybride de type triple quadripôle-trappe ionique linéaire. Utilisation de l'acquisition combinée MRM-Full scan MS/MS en analyse environnementale



Cette bibliothèque doit être de préférence élaborée au sein du laboratoire utilisateur selon ses propres réglages. A ce jour seul le BFR en Allemagne (17) a publié des spectres relatifs aux composés de type pesticides ; la qualité des spectres présentés n'est pas suffisante pour réaliser une comparaison pertinente. Différents réglages sont nécessaires pour obtenir une méthode donnant le plus d'informations possibles : on citera notamment le nombre de points par pic suffisant, le seuil de déclenchement de l'EPI à déterminer judicieusement, la vitesse de balayage de la trappe d'ions, l'exclusion en EPI de transitions MRM recherchées comme les étalons internes, une limite de quantification suffisante.

Comme l'illustre la Figure 2, le spectre EPI présente l'empreinte de la molécule (ici le Benalaxyl) pour une analyse en SPE en ligne-LC-MS/MS sur un échantillon d'Evian dopé en pesticides à 50 ng/L. Pour cet exemple, de nombreuses masses caractéristiques peuvent être utilisées pour discriminer un échantillon positif d'un négatif (91,1 ; 121,1 ; 148,1 ; 208,2 ; etc.).

Ce spectre sert alors de référence et est intégré à la bibliothèque de spectres EPI. Dans le cas d'un échantillon positif (détection de la transition MRM), ce spectre sera comparé à celui de l'échantillon inconnu dont la présence de l'analyte détectée est suspectée. Un calcul de recouvrement entre les deux spectres permet de nous indiquer la probabilité que la molécule soit bien présente dans l'échantillon. Il ne reste plus qu'à quantifier par MRM pour déterminer la concentration par correction avec un étalon interne si besoin (dans le cas des eaux de surface).

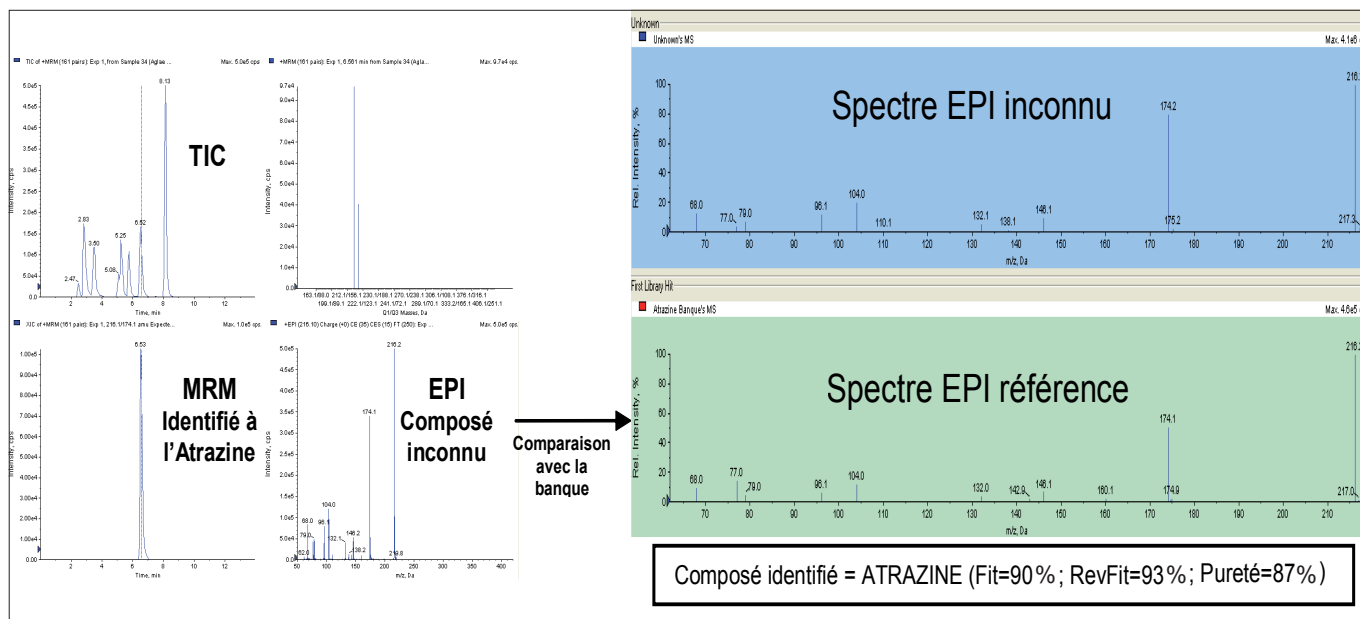
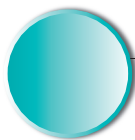
### III - Résultats et discussions

#### 1. Avantages d'une méthode MRM-EPI

L'application de la décision 2002/657/CE (17) (document imposé au domaine alimentaire mais largement applicable en analyse environnementale) stipule de déterminer deux transitions MRM par molécule en mode triple quadripôle afin d'obtenir un nombre de points d'identification suffisant pour la confirmation d'un résultat (au minimum 4 points d'identification, un ion parent (1 point) deux ions fils (2 fois 1,5 point)). Cependant, la stricte application est compromise quand la deuxième transition est inexistante ou pas assez sensible (ratio < 10 %). Par ailleurs, des questions sans réponse demeurent : des critères de tolérance ont été fixés, variables selon l'intensité relative entre les deux transitions ; doit-on calculer cette intensité sur un niveau de concentration et l'appliquer à tout le domaine de travail ? Doit-on obtenir un rapport signal/bruit  $\geq 10$  pour la deuxième transition ?

La possibilité offerte par l'analyseur QTrap nous permet de fournir une solution innovante dans l'interprétation des résultats avec la confirmation de l'identité de la molécule grâce à un spectre EPI (FullScan MS/MS). A noter que la décision 2002/657/CE n'a pas décrit ce mode d'acquisition car trop lié aux appareils d'un seul fabricant ; le nombre de points d'identification n'a donc pas été évalué. Mais il paraît évident que ce nombre sera d'autant plus important que le spectre EPI est riche en ions fragments. La comparaison du spectre inconnu et celui de référence et l'évaluation de leur concordance sont ainsi révélatrices de la présence ou non d'une molécule organique dans l'échantillon. La finalité est d'obtenir, pour chaque composé, une limite basse de quantification combinée à

**Figure 2**  
MRM-EPI pour le Benalaxyl (dans un échantillon d'eau Evian dopé à 50 ng/L, résultat après préconcentration en ligne).



**Figure 3**  
Exemple de confirmation de résultat pour un échantillon réel (essai interlaboratoire AGLAE).

un spectre EPI adapté à l'analyse environnementale. Pour la majorité des composés la limite de quantification associée à un spectre EPI suffisamment intense, en analyse multi-résidus (impliquant des compromis dans le réglage des paramètres analytiques), se situe de 10 ng/L à 20 ng/L pour les deux types de matrices testées ; le niveau à 50 ng/L est jugé plus confortable pour une minorité de composés.

## 2. Limites

L'association d'une transition et d'un spectre EPI pour tous les composés analysés (près de 150) lors d'une même acquisition MRM-EPI n'est pas techniquement envisageable car le balayage successif quadripôle/trappe n'est pas assez rapide pour enregistrer toutes les données. Cependant un échantillon ne contiendra en réalité qu'une dizaine voire au plus une vingtaine de composés, la qualité de la méthode n'en sera donc pas affectée.

Compte tenu de la quantité d'informations spectrales à enregistrer, il paraît quand même nécessaire de régler au mieux différents paramètres pour avoir un nombre suffisant de points par pic (15 minimum) pour bien définir le pic chromatographique. Le balayage MRM doit être rapide (5 ms par transition), et celui en trappe d'ions réglé à son maximum (4000 uma par seconde, optimum de la configuration 3200 QTrap). Le seuil de fixation de déclenchement de l'EPI ne doit pas être réglé trop bas ; il doit ainsi être supérieur si possible à l'intensité de la transition MRM la plus bruyante pour ne pas déclencher trop souvent l'acquisition EPI. Par ailleurs, pour obtenir le spectre le plus proche de l'intensité maximale du pic chromatographique il est très important de choisir judicieusement le nombre de spectres à enregistrer ; ce choix aura une

influence sur la sensibilité de la trappe d'ions. Enfin, dans le cas de composés coélus ou peu séparés, il faut s'assurer qu'un spectre EPI est réalisé pour chacune des substances ; en effet la compétition des signaux MRM fait courir le risque de privilégier la transition MRM d'un composé par rapport aux autres.

Pour obtenir un bon recouvrement lors de la comparaison, le spectre de référence enregistré en bibliothèque doit contenir les ions caractéristiques avec le minimum d'artefacts. Il doit être obtenu si possible en produit pur individuel. Il peut également être obtenu en mélange si la séparation des composés est suffisante ; ce n'est par exemple pas le cas du Metoxuron et du Tebuthiuron (ion parent 229 identique, même temps de rétention), composés pour lesquels un spectre individuel doit être réalisé.

L'acceptation des résultats doit être soumise à des critères de concordance fixés préalablement. Citons par exemple le nombre d'ions minimum requis pour confirmer la présence d'un composé. Par ailleurs, un critère relatif au seuil de sensibilité de la trappe d'ions doit être établi et vérifié régulièrement par calibration en masse afin d'évaluer l'adéquation des performances de l'appareil aux spécifications pré-établies.

## 3. Application de la méthode MRM-EPI sur des échantillons réels (eaux douces)

De nombreux essais en conditions d'analyses de routine ont été réalisés afin d'éprouver la méthode SPE-LC en ligne/MRM-EPI par comparaison avec une méthode validée (SPE hors ligne LC-MS/MS Triple Quadripôle MRM classique) ; les résultats obtenus étaient tout à fait comparables en termes de justesse et meilleurs en termes de reproductibilité. La participation à des essais interlaboratoires (exemple : essai

## Identification et confirmation de molécules organiques par SPE en ligne couplée à la spectrométrie de masse hybride de type triple quadripôle-trappe ionique linéaire. Utilisation de l'acquisition combinée MRM-Full scan MS/MS en analyse environnementale

multi-résidus AGLAE) a également permis de tester la méthode ; toutes les molécules présentes et enregistrées en bibliothèque, ont été quantifiées et confirmées par la méthode MRM-EPI. La Figure 3 montre l'exemple de la détection de l'atrazine pour l'un des échantillons testés ; le spectre EPI obtenu est en concordance avec celui enregistré en bibliothèque avec trois valeurs de concordance : Fit et ReverseFit (=RevFit) (concordance entre les pics présents/absents entre les deux spectres), et Pureté (probabilité de confirmation d'un composé). Ces valeurs sont supérieures à 85 %, et nous permettent de confirmer la présence d'atrazine.

### IV - Conclusion

La complexité des problématiques d'analyse environnementale s'accroît car elles sont liées à la diversité croissante des substances chimiques polluantes, à la multiplication des sources de

pollution et à la technicité toujours plus pointue des instruments d'analyse. Le développement de méthodes d'analyse adaptées et fiables pour identifier et quantifier les composés organiques représente un véritable challenge analytique pour les laboratoires environnementaux. Il est illusoire d'attendre une méthode multi-résidus universelle qui comporterait une seule étape d'extraction et une seule analyse chromatographique. Cependant, du point de vue technique et économique il nous paraît nécessaire d'automatiser au maximum l'analyse d'échantillon en minimisant les risques d'erreurs qualitatives et quantitatives. La méthode développée restitue des résultats quantitatifs en moins de 25 minutes (extraction incluse) avec une sûreté d'identification largement accrue par l'acquisition MRM-EPI. Le système de pré-concentration en ligne couplée à la spectrométrie de masse à trappe ionique linéaire nous apparaît ainsi une réponse adaptée à ces préoccupations.

### BIBLIOGRAPHIE

- (1) LOPEZ-ROLDAN P, LOPEZ DE ALDA MJ, BARCELO D, Simultaneous determination of selected endocrine disrupters (pesticides, phenols and phthalates) in water by in-field solid-phase extraction (SPE) using the prototype PROFEXS followed by on-line SPE (PROSPEKT) and analysis by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry, *Anal. Bio. Chem.*, 2004, 378, pp 599-609.
- (2) MASQUE N, MARCE RM, BORRULL F, Comparison of different sorbents for on-line solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from natural water followed by liquid chromatography, *J. Chrom. A*, 1998, 793, pp 257-263.
- (3) ASPERGER A, EFER J, KOAL T, ENGEWALD W, On the signal response of various pesticides in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization depending on the flow-rate of eluent applied in liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 2001, 937, pp 65-72.
- (4) STOOB K, SINGER HP, GOETZ CW, RUFF M, MUELLER SR, Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters, *J. Chrom. A*, 2005, 1097, pp 138-147.
- (5) RODRIGUEZ-MOZAZ S, LOPEZ DE ALDA MJ, BARCELO D, Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water, *Journal, J. Chrom. A*, 2007, 1152, pp 97-115.
- (6) GUENU S, HENNION MC, Evaluation of new polymeric sorbents with high specific surface areas using an on-line solid-phase extraction-liquid chromatographic system for the trace-level determination of polar pesticides, *J. Chrom. A*, 1996, 737, pp 15-24.
- (7) BARCELO D, HENNION MC, On-line sample handling strategies for the trace-level determination of pesticides and their degradation products in environmental waters, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 318, pp 1-41.
- (8) PICHON V, CHEN L, DURAND N, LE GOFFIC F, HENNION MC, Selective trace enrichment on immunosorbents for the multiresidue analysis of phenylurea and triazine pesticides, *J. Chrom. A*, 1996, 725, pp 107-119.
- (9) PICHON V, CAU DIT COUMES C., CHEN L, GUENU S, HENNION MC, Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides, *J. Chrom. A*, 1996, 737, pp 25-33.
- (10) VAN HOECK E, DAVID F, SANDRA P, Stir bar sorptive extraction for the determination of pyrethroids in water samples: A comparison between thermal desorption in a dedicated thermal desorber, in a split/splitless inlet and by liquid desorption, *J. Chrom. A*, 2007, 1157, pp 1-9.
- (11) RODIL R, POPP P, Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in soils, *J. Chrom. A*, 2006, 1124, pp 82-90.
- (12) IBANEZ M, POZO ÓJ, SANCHO JV, LOPEZ FJ, HERNANDEZ F, Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 2005, 1081, pp 145-155.
- (13) HERNANDEZ F, SANCHO JV, IBANEZ M, GUERRERO C, Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS, *TrAC*, 2007, 26(6), pp 466-485.
- (14) CHANG CM, CHOU CC, LEE MR, Determining leaching of bisphenol A from plastic containers by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 2005, 539, pp 41-47.
- (15) CHOI B.K, HERCULES DM, GUSEV AI, Postcolumn, *Anal. Chem.*, 1999, 71, pp 4107-4110.
- (16) CHOI B.K, HERCULES DM, GUSEV AI, Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression, *J. Chrom. A*, 2001, 907, pp 337-342.
- (17) 2002/657/CE: Décision de la Commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) (notifiée sous le numéro C(2002) 3044)
- (18) Norme AFNOR T90-210 (révisée Mai 2009): « Qualité de l'eau : Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire »