

N° d'ordre : 3933



THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Chloé DE PERRE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENT

ÉTUDE DES INTERACTIONS MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE – CONTAMINANTS ORGANIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE

Directrices de recherche : Édith PARLANTI et Hélène BUDZINSKI

Soutenue le : 16/12/2009

Devant la commission d'examen formée de :

M. BENOIT Pierre, Chargé de recherche INRA AgroParisTech, Thiverval-Grignon	<i>Rapporteur</i>
Mme BUDZINSKI Hélène, Directeur de recherche CNRS, Université Bordeaux 1	
Mme DERENNE Sylvie, Directeur de recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie	<i>Rapporteur</i>
Mme PARLANTI Édith, Chargée de recherche CNRS, Université Bordeaux 1	
Mme PATUREAU Dominique, Directeur de recherche INRA, Narbonne	<i>Examineur</i>
M. SCHMITTER Jean-Marie, Professeur, Université Bordeaux 1	<i>Examineur</i>

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'avoir lu les 300 pages de mon manuscrit. J'ai apprécié vos remarques justes et constructives.

Un très grand merci aussi à mes directrices de thèse pour m'avoir encouragée à faire cette thèse, pour m'avoir encadrée afin que j'arrive au bout de ces 3 ans avec des résultats à présenter et aussi pour m'avoir soutenue pour « l'après thèse ». Merci aussi pour m'avoir envoyée en congrès ici et là pour m'habituer à faire des oraux, sinon je crois que je ne serais vraiment pas venue à ma soutenance. Le problème, maintenant, c'est qu'après la gaufre de l'oral à Lyon, la crêpe de Saint Tropez et la gaufre géante caramel-Nutella (merci Marie-Ange et Édith) de la soutenance, les bonnes habitudes se sont installées et je ne pourrai pas faire d'oraux sans réconfort chocolaté !

Je voudrais aussi remercier Anne-Marie Dorthe du groupe NSysA pour son aide et ses précieux conseils concernant la pratique et la théorie des plans d'expériences. À ce propos, merci Hélène de m'avoir appris que ces outils bien utiles existaient et d'avoir eu l'idée de cette collaboration, c'était une bonne idée.

Je remercie également Christian Béchemin pour nous avoir accueillis à l'Ifremer de la Tremblade afin de récupérer les échantillons d'algues, pour les mesures de TOC du mois d'août dernier (d'ailleurs je ne remercie pas notre analyseur de TOC qui, malgré mes mots doux, m'a laissé tomber quand il ne fallait pas) et aussi pour sa contribution essentielle à la crêpe de Saint Tropez, finalement elle était bien tombée la tempête de janvier...

Ensuite, je remercie tous les membres du LPTC, permanents, doctorants et stagiaires, qui ont croisé ma route en licence, master ou thèse et qui ont contribué au bon déroulement de ces travaux, que ce soit pour les manip ou pour la vie de tous les jours ; ainsi que les membres de l'ISM qui nous simplifient parfois bien la vie (je pense surtout à Virginie, Fabrice...).

Je remercie plus particulièrement Karyn pour m'avoir appris tout ce que je sais sur la SPME-GC-MS et MS/MS et Hélène pour m'avoir fait confiance et laissée bidouiller ses « joujoux ». D'ailleurs, j'en profite aussi pour remercier tous les gens (Karyn, Fabienne, Marie-Ange...) qui se sont arrachés les cheveux avec moi pour essayer de comprendre pourquoi les machines, des fois, n'en font qu'à leur tête.

Merci aussi à Alexia, c'est génial de travailler avec toi, les journées de dur labeur auraient pu paraître interminables mais ta bonne humeur et nos fous rires ont fait des manip des moments très agréables et en plus, on a finalement réussi à les écrire ces publis ! Alors, voisine de Cayac, j'espère que t'oublieras pas ta cops de SPME et qu'un jour on pourra retravailler ensemble. Merci aussi de t'être roulée dans la vase pour moi (ainsi que Fred, Ninette, Nath, and Co...) et de m'avoir promenée

dans les ports du Bassin. En parlant de promenade, je remercie aussi Hélène et Karyn pour le tour de bateau pour mon anniversaire, c'est pas tout le monde qui a l'honneur de se lever à 4h du mat pour ses 24 ans... et le ponton à essence, c'était quelque chose !!

Je remercie aussi Julien pour son aide précieuse à la réalisation des dernières manips.

Je remercie aussi tous les thésards pour leur soutien moral, leur bonne humeur, leurs blagues pas toujours drôles et des fois leurs bons conseils qu'ils soient scientifiques ou non. Merci aussi à Ninette pour m'avoir fait goûter sa cuisine libanaise maison, Alexia pour sa soupe patates-chorizo et Fred pour m'avoir permis de faire de la raclette au camembert. Finalement, c'est des mauvaises langues ceux qui disent que j'aime rien !

Je remercie aussi Marie-Ange qui est arrivée pile poil au bon moment pour me reconforter à coup de chocolat et de piscine, faut bien ça pour survivre à la rédaction d'une thèse ! Et encore merci pour la méga gaufre, j'ai mis 5 jours à la manger mais j'ai relevé le défi !

Nearly last but not least at all, merci Caroline pour tout !! Sans toi, j'aurais sans doute abandonné avant la fin mais vu qu'on a réussi à finir, faut croire que nos thérapies de groupe du midi ont bien marché ! Maintenant, je sais pas comment on va faire pour la suite, mais va falloir qu'on trouve un boulot dans le même labo (ceci est bien un appel à toi lecteur de ces remerciements et potentiel recruteur...). Je ne vais pas m'étendre plus sur ce paragraphe, j'aurais encore 10 pages à écrire à ce sujet mais on m'a déjà fait remarquer que mon manuscrit était assez long... Donc pour conclure, désolée pour les miettes !!

Et enfin, je remercie toute ma famille qui m'ont toujours encouragée et soutenue et je pense que, maintenant que vous savez ce que c'est qu'une thèse, vous êtes bien contents de ne pas en avoir fait ! Mais comme chaque famille a son lot de fous, fallait bien que je me dévoue... Quoi qu'il en soit, je remercie mes parents de m'avoir permis de faire les études que je voulais et surtout de m'avoir fait rabâcher le charabia de mes cours de chimie orga, n'est-ce pas maman ?

Pour terminer, je remercie tous ceux que j'ai involontairement oubliés...

TABLES DES MATIERES

Liste des abréviations	9
Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
Introduction	15
Chapitre 1 : synthèse bibliographique	19
I. La contamination organique : comportement et devenir dans l'environnement	21
II. La matière organique	25
III. Les interactions matière organique - contaminants organiques	28
IV. Contexte et problématique de ces travaux de thèse	30
IV.1. Choix des composés et contexte de l'étude	30
IV.1.1. Les HAP dans l'environnement aquatique	30
IV.1.1.1. Sources, distribution et devenir des HAP	30
IV.1.1.1.1. Propriétés physico-chimiques des HAP	30
IV.1.1.1.2. Source des HAP et distribution dans l'environnement aquatique	31
IV.1.1.1.3. Dégradation des HAP dans l'environnement aquatique	32
IV.1.1.1.4. Toxicité des HAP	32
IV.1.1.2. Interactions des HAP avec la matière organique	33
IV.1.1.2.1. Effet de la composition de la MOD sur les interactions avec les HAP	33
IV.1.1.2.2. Effet de la structure de la MOD sur les interactions avec les HAP	34
IV.1.1.2.3. Effet des propriétés des contaminants organiques	35
IV.1.1.2.4. Effet des facteurs environnementaux	36
IV.1.1.2.4.1. Effet du pH	36
IV.1.1.2.4.2. Effet de la force ionique	38
IV.1.1.2.4.3. Effet de la concentration en COD	38
IV.1.1.2.4.4. Effet de la température	39
IV.1.1.2.4.5. Effet de la luminosité	39
IV.1.1.2.5. Nature des interactions HAP-MOD	39
IV.1.1.2.6. Linéarité des interactions HAP-MOD	40
IV.1.1.2.7. Cinétique des interactions HAP-MOD	41
IV.1.2. Les substances pharmaceutiques	42
IV.2. Techniques analytiques disponibles	45
IV.3. Objectifs de l'étude	47

Chapitre 2 : matériels et méthodes _____ **49**

I.	Techniques de dosage des contaminants organiques dans l'eau	51
I.1.	Techniques usuelles d'extraction	51
I.1.1.	L'extraction liquide-liquide (LLE)	51
I.1.2.	L'extraction sur phase solide (SPE)	52
I.1.3.	La micro-extraction sur phase solide (SPME)	52
I.1.3.1.	Analyse des contaminants organiques	53
I.1.3.1.1.	Principe et fonctionnement	53
I.1.3.1.2.	Choix de la fibre	54
I.1.3.1.3.	Nature du revêtement	55
I.1.3.1.4.	Dosage par SPME	57
I.1.3.2.	Étude des interactions avec la MOD	57
I.2.	Méthodes d'analyses chromatographiques	58
I.2.1.	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	58
I.2.2.	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	61
I.2.3.	Quantification par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse	62
II.	Techniques de caractérisation et de fractionnement de la MOD	62
II.1.	L'absorption UV-visible	63
II.1.1.	Principe de l'absorption UV-visible	63
II.1.2.	Présentation du spectrophotomètre	64
II.2.	La spectrofluorimétrie	65
II.2.1.	Présentation du spectrofluorimètre	65
II.2.2.	Caractérisation de la MOD	66
II.2.3.	Étude des interactions avec les contaminants	68
II.3.	Mesure du COD	72
II.4.	La dialyse	73
II.4.1.	Principe de la dialyse	73
II.4.2.	Matériel utilisé	74
III.	Calculs des coefficients de distribution eau-MOD (K_{DOC})	76
III.1.	Par SPME	76
III.2.	Par extinction de fluorescence	78
IV.	Les échantillons de matière organique dissoute (MOD)	80
IV.1.	L'acide humique Aldrich	80
IV.2.	Les MOD naturelles	81
IV.3.	La MOD issue de culture algale	84
V.	Plans d'expériences	85

Chapitre 3 : articles _____ **91**

Publication n°1	95
Publication n°2	109
Publication n°3	141
Publication n°4	167
Publication n°5	191
Publication n°6	211

Chapitre 4 : synthèse des résultats _____ **237**

I. Développement de la SPME-GC-MS et MS/MS pour l'analyse des HAP (publications n°1 et 2)	239
I.1. Développement de la SPME	239
I.2. Développement de la GC	240
I.3. Développement de la MS et MS/MS	240
I.4. Quantification par SPME-GC-MS et MS/MS	241
I.5. Comparaison SPME/LLE/SPE	243
I.6. Application de la SPME-GC-MS et MS/MS à des échantillons environnementaux	244
I.7. Développement de la SPME-GC-MS pour l'étude des interactions HAP-MOD	245
II. Étude des interactions HAP – acide humique Aldrich (publication n°3)	248
II.1. Interactions HAP – acide humique Aldrich étudiées par SPME-GC-MS	248
II.2. Interactions HAP – acide humique Aldrich étudiées par extinction de fluorescence	250
II.3. Effet de la température sur les interactions	251
II.4. Interactions HAP – acide humique Aldrich étudiées par dialyse	252
III. Effets des paramètres environnementaux sur les interactions HAP – MOD (publication n°4)	252
III.1. Effet de la nature de la MOD sur les interactions HAP-MOD	253
III.2. Effet de la salinité sur les interactions HAP-MOD	255
III.3. Effet de la concentration en HAP sur les interactions HAP-MOD	255
III.4. Effet du pH et de la concentration en COD sur les interactions HAP-MOD	256
III.5. Effet du pH et de la concentration en COD sur les propriétés optiques de la MOD	256
III.5.1. Acide humique Aldrich	256
III.5.2. MOD d'origine algale	257
III.5.3. MOD d'eau de rivière	258
IV. Étude des interactions HAP – MOD dans le milieu naturel (publication n°5)	258
IV.1. Développement des extractions d'eaux interstitielles	258
IV.2. Dosage des HAP dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon	261
IV.3. Caractérisation de la MOD des eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon	261

IV.4.	Étude des interactions HAP-MOD dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon	262
V.	Étude des interactions substances pharmaceutiques – MOD (publication n°6)	264
V.1.	Caractérisation des échantillons de MOD	265
V.2.	Développement de la SPME-GC-MS	265
V.3.	Étude des interactions benzodiazépines-MOD	267
V.3.1.	Par SPME-GC-MS	267
V.3.2.	Par extinction de fluorescence	268
	Conclusion et perspectives	279
	Bibliographie	285
	Annexes techniques	299

LISTE DES ABREVIATIONS

ΔH : variation d'enthalpie
2D : deux dimensions
3D : tridimensionnel
Abs₂₇₀ : absorbance spécifique à 270 nm
Ace : acénaphène
Acy : acénaphylène
An : anthracène
BaA : benzo[a]anthracène
BaP : benzo[a]pyrène
BbF : benzo[b]fluoranthène
BCF : bioconcentration factor
BeP : benzo[e]pyrène
BIX : biological index
BkF : benzo[k]fluoranthène
BNT : benzo[b]naphto[1,2-d]thiophène
BP : benzo[ghi]pérylène
Chrys : chrysène
COD : carbone organique dissous
D : debye
Da : dalton
DahA : dibenzo[ah]anthracène
DBT : dibenzothiophène
DVB : divinylbenzène
EEM : excitation-emission matrix
ESI : electrospray ionization
Flu : fluorène
Fluo : fluoranthène
FT-ICR-MS : fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
GC : gas chromatography
HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques
HIX : humification index
HPLC : high performance liquid chromatography
Ifremer : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IHSS : international humic substances society
IP : indéno[1,2,3-cd]pyrène
IS : internal standard
IUPAC : international union of pure and applied chemistry
K_D : coefficient de partage phase solide – phase liquide

K_{DOC} : coefficient de distribution eau – carbone organique dissous
 K_{OC} : coefficient de distribution eau – carbone organique
 K_{OW} : coefficient de partage octanol – eau
LC : liquid chromatography
LLE : extraction liquide - liquide
LOD : limit of detection
m/z : rapport masse sur charge
MOD : matière organique dissoute
MRM : multiple reaction monitoring
MS : mass Spectrometry
MS/MS : spectrométrie de masse en tandem
N : naphthalène
NPOC : non purgeable organic carbon
PA : polyacrylate
PCB : polychlorobiphényles
PDMS : polydiméthylsiloxane
PEG : polyéthylène glycol
Per : pérylène
Phe : phénanthrène
POCIS : polar organic chemical integrative sampler
ppb : partie par billion
PPSP : produits pharmaceutiques et de soins personnels
ppt : partie par trillion
PTFE : polytétrafluoroéthylène
Pyr : pyrène
REACH : enregistrement, évaluation et autorisation des substances chimiques
SIM : selected ion monitoring
SIR : selected ion recording
SPE : solid phase extraction
SPM : suspended particulate matter
SPMD : semi-permeable membrane device
SPME : solid phase microextraction
SUVA : specific UV absorption
uma : unité de masse atomique
US-EPA : United States – Environmental protection agency
UV : ultraviolet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste non exhaustive des grandes classes de contaminants organiques et leurs propriétés physico-chimiques. _____	23
Tableau 2. Principales constantes d'équilibres permettant de définir le comportement d'un composé. _____	24
Tableau 3. Paramètres physico-chimiques de quatre HAP. _____	31
Tableau 4. Propriétés physico-chimiques du diazépam et de la carbamazépine. _____	45
Tableau 5. Fluorophores majeurs de l'eau de mer. _____	67
Tableau 6. Composition élémentaire de l'acide humique commercial. _____	80
Tableau 7. Paramètres physico-chimiques des eaux naturelles concentrées. _____	82
Tableau 8. Caractéristiques des micro-algues <i>Isochrysis galbana</i> . _____	85
Tableau 9. Matrice des essais du plan factoriel complet 2^4 . _____	87
Tableau 10. Matrice des essais du plan factoriel complet 2^4 , seules les interactions d'ordre 2 sont représentées. _____	88
Tableau 11. Matrice des essais d'un plan fractionnaire 2^{4-1} . _____	89
Tableau 12. Valeurs des indices et des rapports calculés par spectroscopies pour les échantillons correspondant aux points centraux des plans d'expériences. _____	254
Tableau 13. Effet des paramètres environnementaux sur les interactions HAP-MOD et sur les propriétés optiques de la MOD. _____	255
Tableau 14. Indices d'absorption UV-visible et de fluorescence des différents types de MOD. _____	265
Tableau 15. Extinctions de fluorescence et valeurs de K_{DOC} obtenues pour les différents médicaments en présence des différents types de MOD. _____	269

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Présence de la matière organique et interactions entre les différents compartiments au sein du milieu aquatique. _____	24
Figure 2. Schéma du cycle de la MO et des transferts de carbone. _____	26
Figure 3. Composition moyenne de la MOD aquatique issue d'eaux douces. _____	27
Figure 4. Structures des HAP. _____	31
Figure 5. Schéma des structures possibles de la MOD dues aux variations de pH. _____	37
Figure 6. Schéma de principe de la SPME couplée à la GC-MS. _____	54
Figure 7. Schéma de l'extraction par des phases absorbantes vs adsorbantes. _____	55
Figure 8. Exemples de revêtements commerciaux. _____	55
Figure 9. Schéma des équilibres entre contaminants libres et associés à la MOD a) non modifiés par la SPME, b) modifiés par une extraction excessive des contaminants libres par la fibre. _____	58
Figure 10. Différents modes d'un triple quadripôle. _____	60
Figure 11. Transitions électroniques entre orbitales moléculaires. _____	63
Figure 12. Diagramme de Perrin-Jablonski. _____	65
Figure 13. Exemples de spectres 3D de MOD obtenus par spectrofluorimétrie. _____	67
Figure 14. Schéma du trajet optique dans la cuve dans le spectrofluorimètre. _____	72
Figure 15. Procédé de séparation des HAP libres des HAP associés à la MOD par dialyse. _____	73
Figure 16. Dispositifs expérimentaux de dialyse possibles pour l'étude des interactions contaminants-MOD. _____	74
Figure 17. Photo du dispositif de dialyse. _____	75
Figure 18. Suivi du nettoyage des sacs à dialyse par spectrofluorimétrie. _____	75
Figure 19. Spectres de fluorescence du dialysat et du rétentat pour un témoin (eau ultrapure à l'intérieur et à l'extérieur du sac à dialyse) après 48h d'immersion, $\lambda_{excitation} = 277 \text{ nm}$. _____	76
Figure 20. Carte des prélèvements de l'eau douce et de l'eau marine _____	81
Figure 21. Fractions d'ultrafiltration des échantillons concentrés de La Réole et de Toulon. _____	82
Figure 22. Carte des prélèvements du Bassin d'Arcachon. _____	83
Figure 23. Carte des prélèvements dans les ports d'Arcachon et de La Teste. _____	84
Figure 24. Chromatogramme des HAP séparés et analysés par GC-MS. _____	240
Figure 25. Quantification d'une eau ultrapure supplémentée en HAP par SPME-GC-MS sur deux systèmes différents. _____	242
Figure 26. Limites de détection par SPME-GC-MS et SPME-GC-MS/MS. _____	243
Figure 27. Comparaison des techniques d'extraction SPME, LLE et SPE. _____	244
Figure 28. Variabilité de la SPME-GC-MS et contribution de chaque élément. _____	246
Figure 29. Comparaison des aires obtenues par SPME-GC-MS avec et sans MOD pour le naphthalène d8, après normalisation par la concentration en naphthalène d8. _____	246
Figure 30. Comparaison de la quantification par SPME-GC-MS par les différents étalonnages. _____	248
Figure 31. Représentation de Stern-Volmer des interactions HAP - acide humique Aldrich. _____	249
Figure 32. Isothermes d'association des HAP avec la MOD dans 2 mélanges de 19 HAP. _____	249

Figure 33. Suivi de la cinétique des interactions par extinction de fluorescence. _____	250
Figure 34. Effet de la température d'extraction sur les K_{DOC} mesurés par SPME-GC-MS. _____	251
Figure 35. Spectres de fluorescence des 4 bandes α' , γ , β et α des 3 MOD étudiées par la méthode des plans d'expériences. _____	253
Figure 36. Valeurs moyennes des log K_{DOC} pour les échantillons correspondant aux points centraux (n = 5) des plans d'expériences pour les 3 types de MOD. _____	254
Figure 37. Comparaison des aires des HAP avec et sans étape de centrifugation pour des tubes à centrifuger en polypropylène. _____	259
Figure 38. Rendements en HAP après l'étape de centrifugation. _____	260
Figure 39. Concentrations en HAP quantifiées lors de l'extraction d'eau ultrapure selon le protocole d'extraction des eaux interstitielles. _____	260
Figure 40. Corrélation entre les log K_{DOC} et les log K_{OW} des HAP présents dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon _____	262
Figure 41. Corrélations entre les K_{DOC} et le HIX, le pourcentage d'aromaticité, le rapport $\alpha'/[COD]$ et le rapport γ/α dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon. _____	263
Figure 42. Extinction de fluorescence de la MOD par les HAP pour les échantillons du port d'Arcachon et de l'île aux oiseaux. _____	264
Figure 43. Spectres d'extinction de fluorescence des HAP par la MOD pour l'échantillon de l'île aux oiseaux. _____	264
Figure 44. Rendements de quantification des benzodiazépines par SPME-GC-MS d'un pseudo-inconnu à $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ par différents étalonnages (fibre Carbowax TM -DVB 65 μm , n = 3). _____	267
Figure 45. Spectres de fluorescence des blancs a) carbamazépine et b) diazépam pour des concentrations de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$. _____	268
Figure 46. Spectres de fluorescence a) théorique eau marine + carbamazépine, b) expérimental eau marine + carbamazépine, c) théorique eau marine + diazépam, d) expérimental eau marine + diazépam. _____	270
Figure 47. Spectres de fluorescence a) théorique eau interstitielle + carbamazépine, b) expérimental eau interstitielle + carbamazépine, c) théorique eau interstitielle + diazépam, d) expérimental eau interstitielle + diazépam. _____	271
Figure 48. Spectres de fluorescence a) théorique acide humique Aldrich + carbamazépine, b) expérimental acide humique Aldrich + carbamazépine, c) théorique acide humique Aldrich + diazépam, d) expérimental acide humique Aldrich + diazépam. _____	272
Figure 49. Évolution de l'intensité de fluorescence des eaux de mer et interstitielle en fonction de la concentration en médicaments pour les bandes α (en haut), α' (au milieu) et γ (en bas). _____	274
Figure 50. Évolution de l'intensité de fluorescence de l'acide humique Aldrich en fonction de la concentration en médicaments pour les bandes α (en haut) et α' (en bas). _____	276

Introduction

Depuis quelques années, des suivis environnementaux se sont avérés nécessaires afin de progresser dans la compréhension des origines et des conséquences de la présence des polluants chimiques dans l'environnement. La préoccupation actuelle est due au fait que de plus en plus de molécules sont synthétisées à des fins industrielles, agricoles, domestiques ou thérapeutiques et que l'on ignore pour beaucoup d'entre elles les effets à moyen et long termes sur la flore et la faune. Certes, la réglementation REACH (enRegistrement, Évaluation et Autorisation des substances CHimiques) est une avancée dans ce domaine puisqu'elle a notamment comme but le recensement et le contrôle des substances extrêmement préoccupantes (cancérogènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction, persistantes et accumulables dans les tissus biologiques, perturbateurs endocriniens) (http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/DP_Reach_cle55acde.pdf). Cependant cette réglementation ne concerne qu'environ 30 000 substances utilisées, importées ou synthétisées par des industriels à hauteur d'au moins une tonne par an (face aux 100 000 substances mises sur le marché avant 1981 et actuellement utilisées pour lesquelles pas ou peu d'informations sont disponibles) et beaucoup de molécules sont libérées involontairement dans l'environnement par des processus non contrôlés (combustion incomplète, sous-produits de réaction...).

Certains contaminants, comme les métaux lourds ou les polluants organiques, se retrouvent alors à l'état de traces dans tous les compartiments de l'environnement, et notamment dans les milieux aquatiques puisque mers et océans sont les réceptacles ultimes de ces composés. Ces contaminants sont recherchés dans l'environnement aquatique afin d'établir un état des lieux dans le but d'atteindre un bon état des eaux en 2015, comme le prévoit la Directive Cadre sur l'Eau de 2000 (http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/environment/l28002b_fr.htm). Celle-ci définit une liste de substances prioritaires qui constituent un risque important pour le milieu aquatique et instaure des mesures de contrôle et des normes de qualité. Les États membres sont ainsi tenus d'analyser ces substances chimiques dans leurs eaux de surface, souterraines et côtières.

Les contaminants organiques sont d'autant plus difficiles à analyser qu'ils sont nombreux (plusieurs centaines), avec des propriétés chimiques très variées. De plus, ils sont présents sous forme de mélanges au sein de matrices souvent très complexes. La teneur de ces composés dans les différents environnements aquatiques a donné lieu à de nombreuses publications, mais la mesure d'une concentration en contaminants dans un environnement donné peut s'avérer insuffisante pour prédire l'impact sur les organismes. En effet, un contaminant pourra être plus ou moins disponible pour les organismes en fonction de sa spéciation, c'est-à-dire la ou les formes physico-chimiques dans lesquelles il se trouve (Suffet et al. 1994). Plusieurs paramètres peuvent conditionner la spéciation des contaminants organiques, la quantité de particules dans l'eau par exemple ou la présence de matière organique. Cette dernière peut influencer le comportement et le devenir des contaminants (Chiou et al. 1986, Haitzer et al. 1998, Khetan et Collins 2007). Il est donc essentiel de s'intéresser à la matière organique et aux interactions qu'elle peut avoir avec les contaminants afin de mieux comprendre leur comportement dans l'environnement aquatique. A l'heure actuelle, peu d'études ont été réalisées sur les interactions entre la matière organique des eaux de surface et les

contaminants organiques. Ceci est dû d'une part à la difficulté d'extraction de cette matière organique des eaux en raison de sa faible concentration et donc à sa caractérisation rendue de ce fait compliquée. D'autre part, la nature organique des deux partis (contaminants et matière organique) rend difficile l'étude de leurs interactions puisque l'étude de l'un peut être « gênée » par l'autre et les équilibres modifiés.

Ces travaux de thèse avaient donc pour but de développer des outils analytiques permettant une étude fiable des interactions entre la matière organique et les contaminants organiques et d'essayer de comprendre les phénomènes mis en jeu dans ces interactions.

Le premier chapitre synthétise l'état des connaissances actuelles concernant la matière organique, les contaminants organiques, les interactions entre les deux, ainsi que les différentes techniques permettant leur étude. Le deuxième chapitre (matériels et méthodes) présente les outils analytiques et les méthodes de calculs nécessaires à cette étude, ainsi que des informations sur les matières organiques utilisées. Les résultats obtenus sont présentés dans un troisième chapitre sous la forme d'articles. Les deux premières publications reprennent les principaux développements de la Micro-Extraction sur Phase Solide (SPME) appliquée au dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans les eaux, ainsi qu'une comparaison avec les techniques les plus couramment utilisées. Les publications suivantes sont plus spécifiques aux interactions des contaminants organiques avec la matière organique. La troisième publication présente les développements de trois techniques analytiques développées pour l'étude des interactions entre les HAP et l'acide humique Aldrich ainsi que la comparaison des résultats obtenus et les implications analytiques et environnementales des interactions. La quatrième publication est l'application de plans d'expériences à l'identification des facteurs environnementaux intervenant dans les interactions entre les HAP et la matière organique. La cinquième publication est l'application environnementale pour l'étude des interactions des HAP dans un milieu aquatique naturel, le Bassin d'Arcachon. Enfin, la sixième publication s'intéresse aux interactions de la matière organique avec des substances pharmaceutiques. Pour finir, une synthèse des résultats est faite dans le quatrième chapitre avant la conclusion et les perspectives.

Chapitre 1 : synthèse bibliographique

I. La contamination organique : comportement et devenir dans l'environnement

Les composés organiques dans l'environnement sont issus de nombreuses sources : industrielles, agricoles, domestiques et naturelles, qui peuvent être directes ou indirectes, ponctuelles ou diffuses. Il existe des centaines de milliers de contaminants organiques et leur présence dans l'environnement est initialement conditionnée par leur origine. En effet, les bassins versants agricoles sont généralement plus contaminés en pesticides et en substances issues des épandages de boues (produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPSP), phtalates et parfois polychlorobiphényles (PCB) ou hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)) (Dichtl et al. 2007). Les régions fortement urbanisées montrent en plus des contaminations reliées à des phénomènes de combustion de façon générale (trafic routier, chauffage, incinérateurs...) et les zones industrialisées peuvent être fréquemment contaminées en produits et sous-produits de synthèse (solvants, détergents...) (<http://rsde.ineris.fr/>). Les concentrations d'un milieu dépendent donc fortement des habitudes agricoles, urbaines et industrielles de la région. Il existe également des sources de « pollution » d'origine naturelle comme les volcans ou les incendies. Les mers et les océans sont le réceptacle final des contaminations organiques terrestres et peuvent également être le réceptacle initial d'hydrocarbures (naufages de pétroliers, transport maritime et navigation de plaisance), de pesticides (peintures anti-salissures des bateaux) (Voulvoulis 2006) ou encore de déchets directement rejetés (eaux usées de bateaux par exemple). Le compartiment atmosphérique est quant à lui le vecteur de bon nombre de ces composés et participe également à leur dissémination sur toute la surface de la planète, même aux endroits les plus éloignés des sources.

Tous les compartiments environnementaux (air, eau et sols) peuvent donc être plus ou moins contaminés. Pour relativiser néanmoins, il est nécessaire de savoir que ces contaminants sont généralement présents à l'état de traces, sauf en cas de pollution ponctuelle accidentelle, à des concentrations inférieures au ppt (partie par trillion, soit ng.L^{-1} en solution aqueuse) jusqu'à la dizaine ou centaine de ppb (partie par billion, soit $\mu\text{g.L}^{-1}$ en solution aqueuse). Cependant, même à de très faibles concentrations, certains de ces composés peuvent avoir des effets toxiques à court ou moyen terme sur les organismes aquatiques ou plus généralement sur tous les êtres vivants. Certains HAP, par exemple, peuvent s'avérer cancérigènes, d'autres contaminants, comme les alkylphénols ou les hormones de synthèse ont des effets sur le système endocrinien et peuvent perturber la reproduction à des concentrations inférieures au ng.L^{-1} (Carlsson et al. 2006). De plus, les contaminants organiques ont la faculté de pouvoir être dégradés par des phénomènes physiques, chimiques et/ou biologiques. Ainsi la photodégradation, la biodégradation ou encore l'hydrolyse sont les principaux processus de dégradation permettant l'élimination des contaminants organiques dans l'environnement. Ces mécanismes mènent rarement à une dégradation totale (transformation en CO_2 , H_2O et minéraux uniquement) mais le plus souvent à des produits de dégradation qui peuvent être plus toxiques ou plus persistants que la molécule initiale. Pour les contaminants qui se dégradent peu, une préoccupation supplémentaire est due à leur persistance puisqu'ils peuvent être transportés sur de longues distances et ne sont pas dégradés lors de leur ingestion par les organismes vivants et peuvent s'accumuler tout au long de la chaîne alimentaire (bioaccumulation et bioamplification).

Une fois émis dans l'environnement, les contaminants ont des comportements différents selon leurs caractéristiques physico-chimiques, qui sont très variables selon la classe de composés mais aussi au sein d'une même classe (Tableau 1). De plus, leurs produits de dégradation (métabolites) ont également des comportements différents des molécules parentes. De par cette grande variabilité de composés et de comportements, le devenir des contaminants dans l'environnement est très difficile à appréhender. Cependant, la connaissance de certaines propriétés physico-chimiques importantes mises en relation avec le comportement des composés permet de comprendre les phénomènes qui contrôlent leur devenir et de les catégoriser.

La solubilité aqueuse d'un composé, par exemple, permet de déterminer son affinité avec les eaux naturelles alors que la pression de vapeur saturante permet de connaître sa volatilité à l'équilibre entre la phase gazeuse et la phase dissoute. Ces données permettent donc de prévoir la répartition des contaminants entre la phase aqueuse et la phase gazeuse. L'affinité d'un composé pour la phase organique, mesurée généralement grâce au coefficient de partage octanol-eau (K_{OW}) (Tableau 2), permet d'appréhender la capacité de ce composé à se concentrer (bioconcentration) et à s'accumuler (bioaccumulation) dans les organismes. Cette capacité à pénétrer dans les êtres vivants est régie par de nombreux autres facteurs tels que la taille et la configuration spatiale des contaminants, les propriétés physico-chimiques du milieu, le fonctionnement biologique des organismes... L'accumulation d'un composé dans un organisme ne peut donc pas être simplement décrite par ses propriétés hydrophobes. Parallèlement, le caractère hydrophobe des contaminants implique également une répulsion vis-à-vis de l'eau et un fort K_{OW} implique généralement une préférence pour la phase solide par rapport à la phase liquide. La phase solide dans l'environnement est représentée par les sols, les sédiments mais aussi les particules dans la colonne d'eau ou dans l'air. Il existe également une constante, le K_D , qui permet de décrire l'équilibre entre la phase liquide et la phase solide (Tableau 2). Mais là encore, les phénomènes sont plus complexes qu'une simple relation linéaire entre le K_{OW} et le K_D . En effet, il a été montré que cet équilibre est fortement dépendant de la concentration en matière organique contenue dans la phase solide (Schwarzenbach et al. 1993). Ce paramètre est d'ailleurs tellement important que Mader et al. (1997) ont montré que dès lors qu'une surface minérale contient une très faible proportion de carbone organique (< 1 %), les interactions des contaminants hydrophobes avec la phase solide sont entièrement dépendantes des propriétés de la matière organique. Pour refléter ce phénomène, le K_D peut être corrigé de la fraction organique contenue dans la phase solide étudiée, c'est le coefficient de partition eau – carbone organique (K_{OC}). De la même façon, le K_{DOC} est le coefficient de partition eau – carbone organique dissous, donc dans la phase aqueuse.

	Log Kow	Solubilité dans l'eau (mg.L ⁻¹)	Constante de Henry à 20 °C (Pa.m ³ .mol ⁻¹)	BCF (L.kg ⁻¹)	Temps ½ vie (jours) dans l'eau	Concentrations déjà mesurées dans l'eau	Toxicité de certains composés
HAP (de Maagd et al. 1998, Abrajano et al. 2003)	3-6,7	3.10 ⁻⁴ -30	0,001-45	27-98000	0,5h-stable	0,01-100 ng.L ⁻¹	Écotoxicité, Cancérogénèse
polychlorodibenzodioxines (Schäfer et al. 2002, Liu et al. 2008)	5,4-13,4	7,4.10 ⁻⁸ à 5,5.10 ⁻⁴	0,1-10	700-26000	0,8-1,5 an	0,001-0,5 µg.L ⁻¹	Écotoxicité, perturbation endocrinienne, cancérogénèse
PCB (Schäfer et al. 2002, Sinkkonen et Paasivirta 2000)	4,1-6,8	0,01-0,2	19-202	4,4-6,2	60 jours-30 ans	0,1-50 ng.L ⁻¹	Écotoxicité, perturbation endocrinienne
polybromodiphényléthers (de Wit 2002, Rahman et al. 2001, Watanabe et Sakai 2003, Costa et al. 2008, Kuramochi et al. 2007, Kuivikko et al. 2007)	5,9-10	10 ⁻⁶ -0,4	0,8-6,8	18000-10 ⁸	0,5-900 h	< 0,1 µg.L ⁻¹	Écotoxicité, perturbation endocrinienne, neurotoxicité
alkylphénols, sulfonates alkylés linéaires (David et al. 2009, Ying 2006, Yamamoto et al. 2003, Zhang et al. 2009)	1,6-4,5	5-12	3-4	20-1300	1-60	2-40.10 ⁶ pg.L ⁻¹	Écotoxicité, perturbation endocrinienne
PPSP, hormones synthétiques (Comerton et al. 2007, Yamamoto et al. 2003, Schwaiger et al. 2004, Lin et al. 2006, Jürgens et al. 2002)	(-1,4)-5,1	0,02-10 ⁵	2.10 ⁻⁶ -0,02	0,3-2732	1h-9 jours	200 ng.L ⁻¹	Écotoxicité, perturbation endocrinienne
pesticides (Comerton et al. 2007, Boti et al. 2007)	0,07-7,4	2.10 ⁻⁶ -13000	6.10 ⁻⁹ - 30	1-5900	0,4-stable	1-6000 ng.L ⁻¹	Écotoxicité, perturbation endocrinienne
phtalates (Schwarzenbach et al. 1993, Yamamoto et al. 2003, Schäfer et al. 2002, Carr et al. 1997, Lertsirisopon 2009, Chen et al. 2007)	1,5-4,6	0,2.10 ⁻³ -10	0,1-0,2 à 25°C	1-387	1,5-1600	40 µg.L ⁻¹	Écotoxicité, perturbation endocrinienne
alcanes chlorés	1,5-2,5	2900-8500	40-98	4,5-2	1 h-5 jours	< 200 pg.L ⁻¹	Cancérogénèse possible

Tableau 1. Liste non exhaustive des grandes classes de contaminants organiques et leurs propriétés physico-chimiques (bases de données INERIS, INRS).

K_{OW}	Coefficient de partage octanol - eau	$K_{OW} = \frac{\text{Concentration du composé dans l'octanol}}{\text{Concentration du composé dans l'eau}}$
K_D	Coefficient de partage entre phase solide et phase liquide	$K_D = \frac{\text{Concentration du composé dans la phase solide}}{\text{Concentration du composé dans l'eau}}$
K_{OC}	Coefficient de partition eau – carbone organique dans les sédiments	$K_{OC} = K_D / f_{OC}$ où f_{OC} est la fraction de carbone organique contenue dans la phase solide.
K_{DOC}	Coefficient de partition eau – matière organique dissoute dans l'eau	$K_{DOC} = \frac{C_{MOD}}{C_{libre} \cdot [COD]}$ avec C_{MOD} , la concentration dans l'eau des composés fixés sur la MOD, C_{libre} la concentration dans l'eau des composés véritablement dissous (« libres ») et $[COD]$ la concentration en Carbone Organique Dissous (COD).

Tableau 2. Principales constantes d'équilibres permettant de définir le comportement d'un composé.

Tous les compartiments environnementaux sont donc en interaction les uns avec les autres et sujets à des phénomènes complexes régis par des équilibres à différents niveaux. D'autre part, la présence des macromolécules formant la matière organique naturelle ou anthropique, influence, de la même façon que pour les K_D , tous les équilibres au sein de ces compartiments (Figure 1).

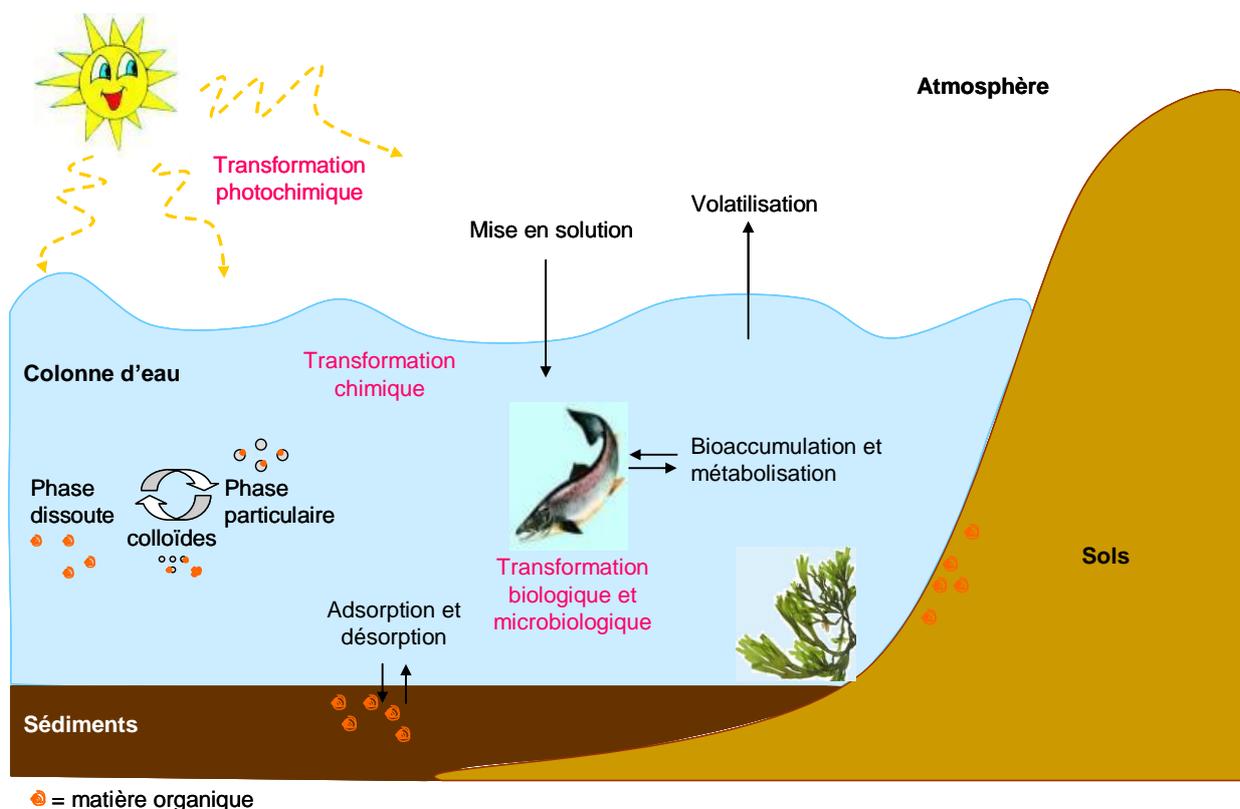


Figure 1. Présence de la matière organique et interactions entre les différents compartiments au sein du milieu aquatique.

Avant d'essayer de comprendre pourquoi la matière organique est si importante pour le devenir des contaminants, il est essentiel d'essayer de comprendre ce qu'est la matière organique.

II. La matière organique

La matière organique naturelle est un ensemble de macromolécules provenant de la dégradation de débris animaux et végétaux ainsi que de la production primaire du phytoplancton dans les eaux naturelles. On ne considère donc pas dans cette définition la matière organique vivante et les composés fabriqués par l'homme. Dans les océans, on estime à environ 89 % la part de matière organique dissoute (MOD) en solution dans l'eau, à 9 % celle de la matière organique particulaire (matière organique associée aux particules et détritiques), à 2 % celle du phytoplancton et à moins d'1 % celle du zooplancton et des bactéries, en masse de carbone organique (Duursma et Dawson 1981). La matière organique « non vivante » représente donc près de 98 % du carbone organique total dans des environnements tels que les océans.

Dans tous les compartiments environnementaux, l'état dynamique de la matière organique rend son étude difficile du fait qu'elle subit sans cesse des cycles de synthèse biologique, métabolisation et décomposition. Dans l'environnement aquatique, la matière organique est majoritairement synthétisée par le phytoplancton puis utilisée comme nutriments par d'autres espèces qui peuvent la métaboliser puis l'excréter sous une autre forme (Figure 2). Dans les eaux profondes ou plus généralement dans les zones aphotiques, la production par les bactéries devient majoritaire (Duursma et Dawson 1981). Une troisième zone de production de la matière organique dans les eaux naturelles est l'interface eau-sédiment où elle subit des transformations biologiques ou chimiques lentes (Duursma et Dawson 1981). La matière organique est également émise par dégradation des organismes animaux ou végétaux, que ce soit dans les milieux aquatiques ou terrestres. La matière organique fraîchement produite par la matière vivante (phytoplancton, bactéries, micro-organismes...) est généralement appelée matière organique récente en opposition à la matière organique plus humifiée (ancienne) issue de multiples étapes de dégradation de cette matière organique.

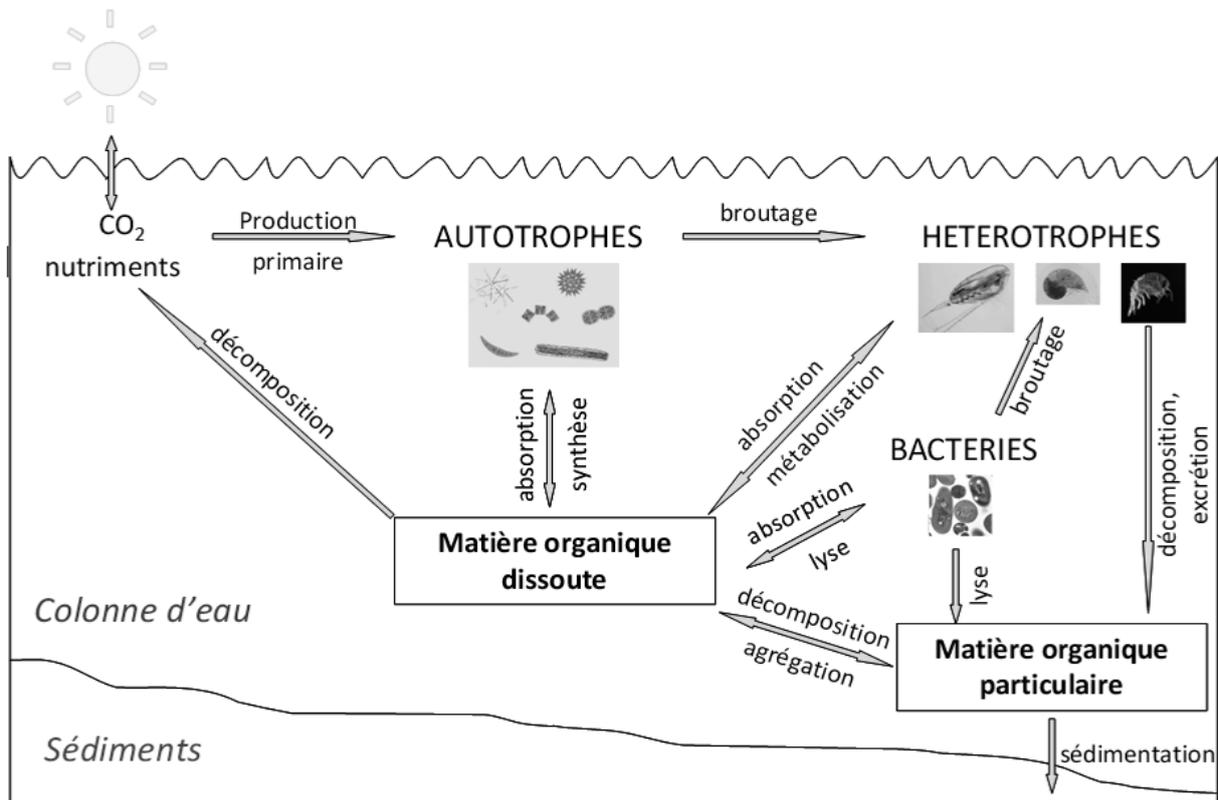


Figure 2. Schéma du cycle de la matière organique et des transferts de carbone (d'après Harvey 2006).

Comme chaque débris organique est constitué de nombreuses molécules organiques (protéines, lipides, sucres) de composition et de concentration différentes et comme leur dégradation dépend de nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques, un nombre infini de molécules différentes constitue cette matière organique. De la même façon, la matière organique peut être synthétisée par des espèces différentes et par de multiples voies ; elle est donc constituée de mélanges différents selon son origine, sa localisation ou sa période d'étude. Pour ces raisons, il est, de nos jours, impossible de caractériser de façon exhaustive toutes les molécules qui composent la matière organique. Généralement, celle-ci est caractérisée par des techniques d'observation, d'extraction et/ou de caractérisation élémentaire. Les plus utilisées sont les techniques spectroscopiques (UV-visible, infrarouge, résonance magnétique nucléaire, spectrofluorimétrie...), les techniques de séparation par la taille (dialyse, ultrafiltration, nanofiltration...), les techniques de séparation par affinité avec des résines (XAD 8, XAD 2...), les analyses élémentaires (carbone, oxygène, azote...) et les techniques d'identification moléculaire (spectrométrie de masse). Ces techniques permettent d'obtenir des informations sur certaines propriétés globales des échantillons de matière organique (taux de carbone, d'oxygène, caractère hydrophobe ou hydrophile, taille moyenne des macromolécules...) mais ne permettent pas l'identification de molécules autres que les molécules les plus simples (sucres, lipides, protéines). D'autre part, des techniques comme la résonance magnétique nucléaire et l'infrarouge qui permettent l'accès aux informations structurales et fonctionnelles de la MOD, sont difficilement applicables à l'environnement aquatique et surtout marin (à cause de la présence des sels) de par la faible quantité de matériel disponible. Récemment, une

technique a été développée, la spectrométrie de masse haute résolution à transformée de Fourier (FT-ICR-MS), dans le but d'obtenir les masses des macromolécules avec une grande précision et ainsi d'en déduire leur formule brute (Hertkorn et al. 2007). Même si cette technique marque un grand pas dans la caractérisation de la matière organique, la complexité de cette dernière est telle qu'il est tout de même difficile de traiter les informations obtenues, c'est-à-dire des milliers de masses moléculaires brutes. Toutes ces techniques permettent par contre de déterminer certaines propriétés de la matière organique telles que sa concentration, son origine (aquatique ou terrestre) ou son stade de dégradation grâce à l'étude de sa composition.

Concernant la composition moyenne de la MOD, il a été montré que les molécules simples (acides aminés, sucres...) représentent environ seulement 20 % de la matière organique aquatique et que les 80 % restants sont des macromolécules complexes difficilement analysables. La MOD présente dans les eaux douces est constituée en moyenne de 80 % d'acides hydrophobes ou hydrophiles, le reste étant des molécules neutres ou basiques (Figure 3).

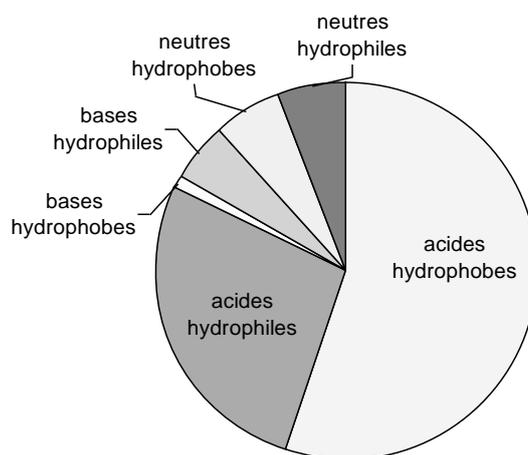


Figure 3. Composition moyenne de la MOD aquatique issue d'eaux douces, d'après Perdue et Ritchie (2003).

La majeure partie des acides hydrophobes, en tout cas pour les eaux douces car les eaux marines ont été beaucoup moins étudiées, est composée d'acides humiques (insolubles à pH < 2, minoritaires) et d'acides fulviques (solubles à tous les pH, majoritaires), regroupés sous le terme de substances humiques. Ces composés sont des macromolécules amphiphiles de poids moléculaire supérieur à 500 Da (1 Dalton (Da) = 1 g.mol⁻¹) présents sous forme de mélange hétérogène. Les substances humiques sont souvent considérées comme la portion de la MOD la plus influente sur le transport et le comportement des polluants organiques et inorganiques (Pan et al. 2008). Cependant, cette hypothèse tient du fait que pendant longtemps seules les substances humiques étaient étudiées et non la MOD dans son ensemble. Or, des études ont montré que les substances humiques ne sont pas les seules responsables des interactions avec certains contaminants (Akkanen et al. 2005a, Kukkonen et al. 1990) même si elles sont souvent isolées et étudiées séparément du reste de la MOD. Les substances humiques sont issues de multiples étapes de dégradation de la MOD fraîche et sont caractéristiques de la MOD plus mature, dite humifiée (Duursma et Dawson 1981). Ces

substances sont également appelées matière organique réfractaire, en raison de leur faible (mais non nulle) biodégradabilité et de leur faible réactivité chimique (Duursma et Dawson 1981). Le caractère acide des substances humiques est dû à la présence de groupements carboxyliques et de groupements acides hydrophiles (surtout les OH phénoliques) (Perdue et Ritchie 2003). Les acides humiques et les acides fulviques présentent des propriétés différentes. Les acides humiques ont une masse moléculaire plus grande, une aromaticité et un taux de carbone plus importants, un taux d'oxygène et une acidité plus faibles que les acides fulviques (Perdue et Ritchie 2003). De par la nature et la composition de ces substances humiques, et plus généralement des macromolécules de la MOD, il est possible de déterminer l'origine et « l'âge » de la MOD. En effet, la MOD a des caractéristiques qui diffèrent selon la façon dont elle a été produite : dans des rivières, des lacs, des océans ou dans des environnements terrestres et par des algues, des bactéries ou par décomposition de détrit. On peut ainsi distinguer la MOD autochtone (fabriquée directement dans le milieu étudié) de la MOD allochtone (fabriquée ailleurs puis transportée dans le milieu étudié) puisque, généralement, moins la MOD est humifiée (dégradée), plus elle est récente et autochtone.

Les propriétés physiques et chimiques de la MOD sont donc très variables d'un site à l'autre et dans le temps, notamment selon la saison. Par exemple, l'été est propice à une grande productivité primaire dans les lacs et une part significative de la MOD est due aux exsudats et aux produits de décomposition du phytoplancton (Thacker et al. 2005). Généralement, dans des milieux aquatiques naturels, les teneurs en carbone organique dissous (COD) varient en moyenne de 0,3 à 2 mg.L⁻¹ dans les eaux salées, sont d'environ 10 mg.L⁻¹ dans les rivières et les lacs, et peuvent aller jusqu'à 15 mg.L⁻¹ dans des eaux souterraines (Akkanen 2002). Toutefois, les concentrations en COD sont très variables et peuvent être largement supérieures (Akkanen 2002). Ces concentrations, même si elles sont le plus souvent assez faibles, sont tout de même largement supérieures à celles des contaminants et on peut donc aisément comprendre que ces macromolécules aient un rôle sur le comportement des contaminants organiques dans les milieux aquatiques.

III. Les interactions matière organique - contaminants organiques

Les contaminants organiques dont les interactions avec la matière organique ont été les plus étudiées sont les HAP, les PCB et quelques autres composés hydrophobes (polybromodiphényléthers, polychlorodibenzodioxines, pesticides) mais les composés hydrophiles ont fait l'objet de très peu d'études. La matière organique peut interagir avec les composés organiques par différents types de liaison et d'adsorption, comme les échanges d'ions, les transferts de charges, les liaisons hydrogène, les liaisons covalentes ou les interactions hydrophobes (forces de Van der Waals) (Haitzer et al. 1998). Le type d'interaction dépend du type de contaminant et du type de MOD. Par exemple, il pourrait se former des liaisons covalentes entre les amines aromatiques et les quinones présentes dans la matière organique (Doll et al. 1999). Les interactions des contaminants hydrophobes sont le plus souvent décrites comme des mécanismes d'association non spécifiques avec les structures hydrophobes de la matière organique (Doll et al. 1999). Elles peuvent également

être plus spécifiques et orientées (interactions π - π par exemple) et elles sont le plus souvent réversibles (Wijnja et al. 2004, McCarthy et Jimenez 1985, Kopinke et al. 2000).

Ces interactions dépendent aussi des paramètres physico-chimiques de la solution comme le pH ou la force ionique. Il apparaît que, généralement, pour les contaminants apolaires non ioniques, leur association avec la matière organique augmente quand le pH diminue ou que la force ionique augmente, contrairement aux composés polaires non ioniques pour lesquels l'association diminue pour ces paramètres (Lee et Farmer 1989). En effet, une augmentation du pH pourrait ioniser les groupements acides des substances humiques et les rendre plus polaires, affaiblissant ainsi les interactions hydrophobes avec les contaminants apolaires (Jota et Hassett 1991). Alors que pour les composés polaires, l'augmentation des interactions lorsque le pH augmente pourrait s'expliquer par le fait que ces interactions ne seraient pas de nature hydrophobe mais plutôt de type liaisons hydrogène ou mettant en jeu des processus donneur-accepteur d'électrons (Lee et Farmer 1989). D'autre part, le pH, la force ionique, la concentration en ions métalliques et en MOD peuvent modifier la conformation spatiale des macromolécules, formant ou supprimant ainsi des sites favorables à l'association avec les contaminants (Pan et al. 2008).

De plus, selon la composition de la matière organique, sa capacité à former des liaisons est différente : par exemple, les acides hydrophobes ont plus d'interactions avec les HAP que les autres fractions de la MOD (Kukkonen et al. 1990). De plus, les acides fulviques contenant plus de groupements fonctionnels oxygénés et moins de noyaux aromatiques, ont une nature plus polaire et moins hydrophobe que les acides humiques. Les acides humiques auront donc tendance à former des interactions plus fortes avec les contaminants organiques hydrophobes (Lee et Farmer 1989, Jota et Hassett 1991, Chiou et al. 1986).

Cependant, la plupart des études sont souvent limitées aux substances humiques et la MOD n'est que rarement étudiée dans son ensemble ; il est donc difficile de faire l'état de l'art des connaissances concernant les interactions entre les contaminants et la MOD dans son ensemble.

De nombreux facteurs peuvent donc contrôler l'association des composés avec la matière organique et ainsi jouer sur le comportement (transport, dégradation, toxicité...) des contaminants dans l'environnement. Il a été démontré que la MOD est un facteur important à considérer pour la compréhension des processus qui contrôlent le transport, le comportement et l'effet biologique des contaminants hydrophobes dans les systèmes aquatiques (McCarthy et Jimenez 1985, Carter et Suffet 1982, Landrum et al. 1984, Akkanen et al. 2005a, Simpson et al. 2004). En effet, la présence de la matière organique pourrait augmenter la solubilité aqueuse (Chiou et al. 1986), réduire la volatilisation (Yates et al. 1997), modifier les vitesses et les produits de dégradation (Chiron et al. 2006, Wang et al. 1995), altérer la bioconcentration et avoir un effet sur la toxicité des contaminants organiques (Haitzer et al. 1998, Bejarano et al. 2005).

IV. Contexte et problématique de ces travaux de thèse

IV.1. Choix des composés et contexte de l'étude

Dans ces travaux, nous avons choisi de nous intéresser aux interactions entre les contaminants organiques et la MOD. La MOD représente généralement les macromolécules de la matière organique qui ne sont pas retenues par un filtre à 0,45 μm . Cette limite, même largement utilisée, est totalement arbitraire (Duursma et Dawson 1981). Dans cette étude, nous avons choisi comme limite 0,7 μm pour des raisons purement techniques, afin d'utiliser des filtres en fibre de verre qui limitent la contamination en carbone organique et la perte à la fois de MOD et de contaminants lors de la filtration. La MOD est donc ici constituée de macromolécules dissoutes et de colloïdes, définis par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) comme les molécules et particules de tailles comprises entre 1 nm et 1 μm (Filella 2009).

En ce qui concerne les contaminants organiques, les HAP ont été choisis pour l'étude des interactions avec les contaminants hydrophobes et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ces composés sont ubiquitaires et toxiques et donc d'intérêt au niveau environnemental. De plus, cette classe de contaminants regroupe de nombreuses molécules apolaires composées uniquement de noyaux aromatiques mais ayant des caractères hydrophobes différents selon le nombre de cycles aromatiques. Ces composés sont étudiés depuis de nombreuses années au laboratoire et leur analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est donc connue et validée. D'autre part, beaucoup de travaux ont été faits avec ces composés à travers le monde et leurs interactions avec la MOD sont donc assez bien documentées, ce qui permet la validation de nos outils avant d'orienter nos travaux. Dans un second temps, des contaminants plus polaires et également de fort intérêt environnemental ont été étudiés : les substances pharmaceutiques. Ces contaminants sont présents dans de nombreux environnements aquatiques et peuvent aussi s'avérer toxiques. Bien que cette classe de composés regroupe de nombreuses molécules (plusieurs milliers), leurs interactions avec la MOD n'ont été que faiblement étudiées et leurs comportements dans l'environnement aquatique sont encore mal connus.

IV.1.1. Les HAP dans l'environnement aquatique

IV.1.1.1. Sources, distribution et devenir des HAP

IV.1.1.1.1. Propriétés physico-chimiques des HAP

Les HAP sont des composés plans à base de carbone et d'hydrogène qui comprennent plusieurs noyaux benzéniques (Figure 4).

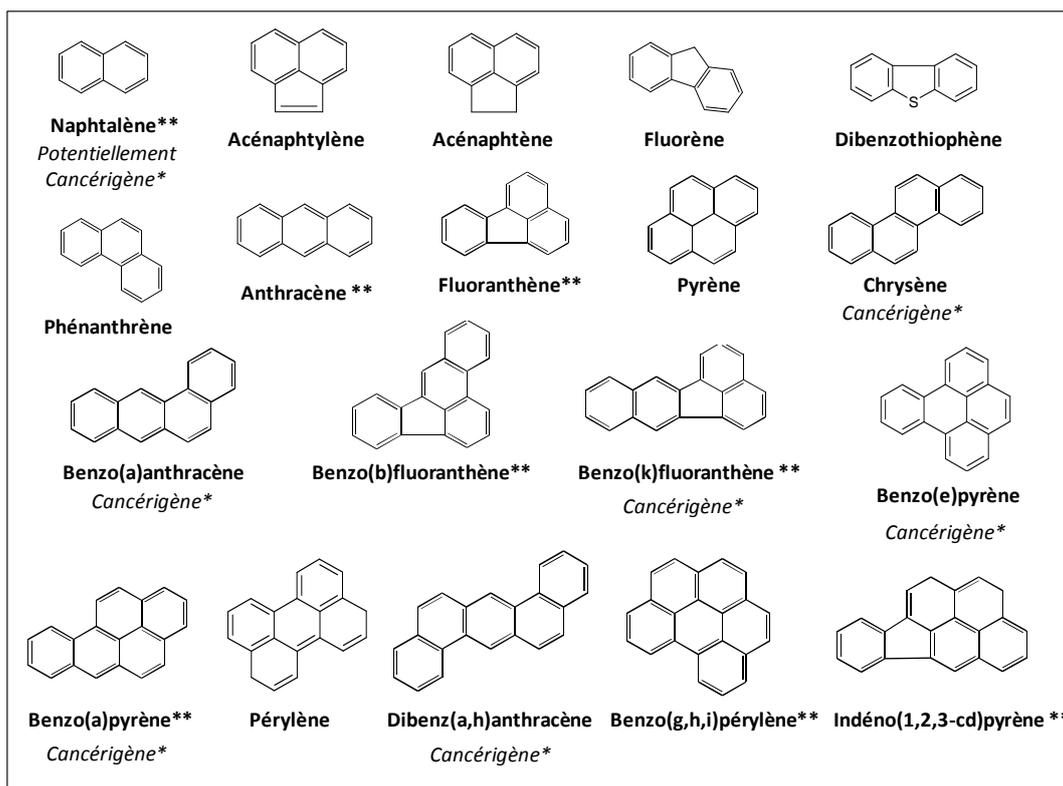


Figure 4. Structures des HAP, * : selon la directive 2009/2/CE de la Commission du 15 janvier 2009, ** : substances prioritaires de la directive européenne 2455/2001/CE.

Les HAP sont apolaires et hydrophobes. Leur caractère hydrophobe augmente avec le nombre de cycles aromatiques, alors que leur solubilité et leur volatilité diminuent (Tableau 3).

Composé	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Solubilité à 25 °C (mg.L ⁻¹)	Tension de vapeur à 25 °C (Pa)
Phénanthrène	178	4,6	1,2	9,1.10 ⁻² à 20 °C
Fluoranthène	202	5,1	0,3	1,2.10 ⁻³
Chrysène	228	5,7	2.10 ⁻³	8,4.10 ⁻⁵
Benzo[a]pyrène	252	6,0	3.10 ⁻³	7,3.10 ⁻⁷

Tableau 3. Paramètres physico-chimiques de quatre HAP.

IV.1.1.1.2. Source des HAP et distribution dans l'environnement aquatique

Les HAP peuvent avoir une origine naturelle ou anthropique. Ils sont principalement produits à des températures à partir de 500 °C par combustion incomplète de la matière organique (incendies, moteurs à combustion, chauffage, industries...), ces HAP sont dits pyrolytiques. Ils sont également présents dans le pétrole brut (HAP pétrogéniques) et peuvent être introduits dans l'environnement par des suintements naturels ou accidentellement lors du transport de produits pétroliers.

Les HAP ont été détectés dans tous les compartiments environnementaux (air, eau, sols et sédiments) (Menzie et al. 1992). Émis principalement par voies atmosphériques, les HAP peuvent avoir un temps de résidence dans l'atmosphère assez long en s'adsorbant à des particules fines (< 1-3 µm) et rester suffisamment longtemps dans l'atmosphère pour être dispersés à des centaines voire des milliers de kilomètres de leur lieu de formation et/ou d'émission (Abrajano et al. 2003). Les HAP atteignent les eaux de surface principalement par retombées atmosphériques, mais aussi par les effluents urbains et industriels (Srogi 2007). En effet, les effluents urbains ne passent pas tous systématiquement par une station de traitement et les effluents traités ne permettent pas l'élimination complète de tous les HAP (Abrajano et al. 2003). De par l'augmentation de l'activité photolytique qui les dégrade l'été et l'augmentation de fuels fossiles pour le chauffage qui les produit l'hiver, les quantités de HAP atmosphériques sont généralement plus élevées l'hiver que l'été (Abrajano et al. 2003), et cette tendance se retrouve également au niveau des écoulements urbains (Srogi 2007). Une fois dans l'environnement aquatique et à cause de leur propriété hydrophobe, ils s'associent rapidement aux particules en suspension dans l'eau et sont déposés sur les sédiments. La vitesse d'incorporation aux sédiments est contrôlée par le taux de sédimentation, la bioturbation et les échanges sédiment-colonne d'eau (Abrajano et al. 2003). Du fait de cette interface eau-sédiment et du passage de la phase particulaire à la phase dissoute, il est également important de considérer les concentrations en HAP dans les eaux interstitielles et dans la colonne d'eau. Les concentrations en HAP varient généralement entre 2 et 50 ng.L⁻¹ dans les eaux de surface, entre 0,2 et 7 ng.L⁻¹ dans les eaux souterraines, entre 1 et 10 ng.L⁻¹ dans les eaux potables et entre 3 µg.kg⁻¹ (site considéré comme propre) et 200 mg.kg⁻¹ (site pollué) dans les sédiments (pour la somme de 8 HAP : benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, indéno[1,2,3-cd]pyrène, dibenzo[ah]anthracène et benzo[ghi]pérylène) (Menzie et al. 1992).

IV.1.1.1.3. Dégradation des HAP dans l'environnement aquatique

Les transformations chimiques comme l'hydrolyse, les réactions redox et les réactions d'élimination ne sont pas des voies de dégradation dominantes des HAP dans les systèmes aquatiques peu profonds (Abrajano et al. 2003). De par leur aromaticité et leurs liaisons chimiques conjuguées, les HAP peuvent être sujets à la photodégradation dans l'atmosphère et dans la zone photique de la colonne d'eau (Abrajano et al. 2003). Par ailleurs, la biodégradation est peut-être le mécanisme de réaction le plus important pour la dégradation des HAP dans les environnements aquatiques. La dégradation bactérienne (aérobie ou anaérobie) a été reconnue comme le mécanisme le plus prédominant pour éliminer les HAP des environnements contaminés, même si les HAP de hauts poids moléculaires semblent plus résistants aux processus de dégradation bactérienne et tendent à persister plus longtemps dans les environnements contaminés (Abrajano et al. 2003).

IV.1.1.1.4. Toxicité des HAP

Il existe plusieurs dizaines de HAP dont la toxicité est très variable : certains sont faiblement toxiques, alors que d'autres, comme le benzo[a]pyrène, sont des cancérigènes reconnus depuis

plusieurs années (Figure 4). Les HAP légers sont moins toxiques mais généralement plus nombreux et peuvent réagir avec d'autres polluants pour former des dérivés plus toxiques (Srogi 2007). Il est donc nécessaire de prendre en compte la présence de plusieurs de ces HAP dans les études de toxicité. Par conséquent, plusieurs HAP ont été répertoriés comme substances prioritaires par la directive cadre européenne sur l'eau de 2000 (Figure 4).

IV.1.1.2. Interactions des HAP avec la matière organique

En ce qui concerne les interactions entre les HAP et la matière organique, beaucoup de travaux ont été faits avec de la matière organique provenant de sols ou de particules et moins avec de la MOD. La matière organique a en effet la capacité de s'adsorber à la matière minérale contenue dans les sols, les sédiments ou les particules en suspension dans la colonne d'eau. Elle peut alors être responsable des interactions plus fortes des contaminants envers ces phases solides et favoriser leur présence dans ces compartiments. Les mesures de K_{OC} peuvent se faire aisément par filtration ou centrifugation puisqu'il est uniquement nécessaire de séparer les HAP de la phase solide de ceux de la phase liquide (Laor et Rebhun 2002). Alors que pour l'étude des interactions avec la MOD, il est nécessaire de quantifier uniquement les HAP en phase liquide mais il faut pouvoir identifier ceux qui sont effectivement dissous dans l'eau (sous forme libre) de ceux qui sont associés à la MOD. Les mesures des K_{OC} sont donc généralement plus faciles à obtenir que celles des K_{DOC} . D'autre part, la matière organique est beaucoup plus concentrée dans les sols que sous forme dissoute dans les eaux naturelles ce qui complique la caractérisation de la MOD et donc la compréhension des phénomènes à l'origine des interactions avec les contaminants.

IV.1.1.2.1. Effet de la composition de la MOD sur les interactions avec les HAP

Les interactions des HAP avec la MOD dépendent en grande partie de la composition de celle-ci et notamment de la quantité de macromolécules hydrophobes. En effet, la fraction hydrophile de la MOD, constituée essentiellement de groupements fonctionnels hydroxyles et acides carboxyliques, n'interagit pas avec les HAP ; plus cette fraction représente une part importante de la MOD, plus les interactions avec les HAP sont faibles (McCarthy et al. 1989). Il a été montré que le benzo[a]pyrène a des interactions plus fortes avec la fraction hydrophobe acide de la MOD, qui est constituée de plus grosses molécules et qui est enrichie en structures aromatiques et en groupements fonctionnels acides (McCarthy et al. 1989). Ceci peut être expliqué par plusieurs causes. Tout d'abord des facteurs électroniques peuvent intervenir. En effet, le benzo[a]pyrène est un composé riche en électrons qui peut donner ses électrons via des transferts de charges vers des composés déficients en électrons comme les acides hydrophobes (McCarthy et al. 1989). Cependant, les facteurs électroniques n'expliquent pas toute leur réactivité. En effet, en plus des interactions avec la fraction hydrophobe acide (avec une faible densité électronique), le benzo[a]pyrène peut également avoir des affinités avec la fraction hydrophobe neutre (riche en électrons) de la MOD (Akkanen et Kukkonen 2001). Ceci explique également que ce contaminant puisse avoir plus d'affinités avec la MOD que

d'autres composés, même plus hydrophobes, si ceux-ci n'ont des affinités qu'avec une seule fraction de la MOD. Par exemple le tétrachlorobiphényle (PCB tétrachloré), électrophile, interagit essentiellement avec la fraction neutre donc ses interactions sont forcément plus faibles que s'il interagissait aussi avec la fraction acide (qui est généralement majoritaire dans la MOD d'eaux douces) (McCarthy et al. 1989). La configuration spatiale de la MOD peut également être importante et il semblerait que les acides hydrophobes favorisent également les interactions hydrophobes avec le benzo[a]pyrène en permettant d'ouvrir les structures de la MOD grâce à leurs fonctions acides et à la répulsion entre leurs charges lorsqu'ils sont déprotonés (McCarthy et al. 1989). Ces structures plus ouvertes pourraient contribuer à la partition des HAP en créant des cavités hydrophobes dans la MOD plus accessibles pour les solutés, et les groupements polaires à l'interface eau-MOD pourraient diminuer la tension de surface et promouvoir les liaisons hydrogène pour augmenter la partition du benzo[a]pyrène dans la MOD (McCarthy et al. 1989). Enfin, la polarité de la MOD et sa composition moléculaire peuvent également être importantes. Ainsi, l'augmentation de la fraction de la MOD hydrophobe neutre aliphatique faiblement polaire n'augmente pas l'intensité des interactions avec le benzo[a]pyrène (McCarthy et al. 1989). De la même façon, de Paolis et Kukkonen (1997) ont montré que les interactions benzo[a]pyrène - MOD diminuent quand la polarité (rapport (O+N)/C) de la MOD augmente. D'autre part, plus la MOD est oxydée (faible rapport H/O), plus les interactions sont faibles (De Paolis et Kukkonen 1997). Les interactions sont donc plus fortes avec de la MOD plus humifiée (plus mature) qu'avec des molécules plus récentes (De Paolis et Kukkonen 1997). Ceci explique que les HAP aient des affinités plus fortes avec les acides humiques qu'avec les acides fulviques, qui sont plus polaires et moins hydrophobes (Lou et al. 2006, Perminova et al. 1999, De Paolis et Kukkonen 1997).

IV.1.1.2.2. *Effet de la structure de la MOD sur les interactions avec les HAP*

Quelque soit la nature chimique des interactions, il semblerait que l'aromaticité et la taille de la MOD soient les facteurs les plus importants gouvernant les interactions HAP-MOD (Chin et al. 1997, Perminova et al. 1999, Kopinke et al. 2001). McCarthy et al. (1989) ont montré une forte relation linéaire entre la force des interactions du benzo[a]pyrène et l'absorbance spécifique (Abs_{270}), considérée comme un bon indicateur de l'aromaticité de la MOD. De la même façon, Chin et al. (1997) ont montré une relation linéaire entre le K_{DOC} du pyrène et l'absorptivité molaire de la MOD (ou coefficient d'extinction molaire) à 280 nm qui est corrélée à l'aromaticité et à la masse moléculaire moyenne de la MOD. Les noyaux aromatiques jouent un rôle important dans les interactions HAP - MOD (Perminova et al. 1999, Gauthier et al. 1987) mais il semblerait que l'environnement des molécules aromatiques soit également important. Les HAP auraient en effet les affinités les plus fortes avec les MOD présentant des structures aromatiques les plus disponibles, c'est-à-dire celles qui auraient une orientation coplanaire avec les HAP (Perminova et al. 1999). Ceci pourrait alors être interprété par des interactions donneur-accepteur d'électrons entre la MOD et les HAP déjà décrites.

La taille des macromolécules joue également un rôle dans les interactions avec la MOD. D'après Raber et Kögel-Knabner (1997), ce rôle serait d'ailleurs prépondérant sur celui du caractère hydrophobe de la MOD, pour des macromolécules issues de composts. D'après Chin et al. (1994), il semblerait que les molécules les plus petites n'aient pas la taille et la flexibilité suffisantes pour se replier et former des domaines hydrophobes favorables aux interactions, mais Raber et Kögel-Knabner (1997) ont montré que même les macromolécules inférieures à 1000 Da pouvaient interagir avec les HAP. Perminova et al. (2009) ont trouvé une corrélation positive entre la force des interactions HAP-MOD et la taille des macromolécules de MOD mais uniquement tant que la taille n'excède pas 15 kDa. Ils ont attribué cette cassure de linéarité à l'hétérogénéité de la MOD et aux différences structurelles existantes entre les différentes MOD. Chin et al. (1997) ont trouvé que cette corrélation était linéaire mais ont étudié des MOD n'allant que jusqu'à 4000 Da et de même origine (aquatique). McCarthy et al. (1989) ont trouvé une relation directe entre le K_{DOC} du benzo[a]pyrène et la taille des macromolécules de MOD d'eaux souterraines et de surface mais avec une linéarité plus faible ($R^2 = 0,58$). Une forte corrélation négative ($R^2 > 0,9$) a été observée entre les interactions des HAP et des MOD d'eaux naturelles avec le rapport d'absorbance A_{254}/A_{400} (absorbance à 254 nm sur celle à 400 nm, Akkanen et al. 2004). Ce rapport d'absorbance est généralement anti-corrélé à la taille des macromolécules mais est à prendre avec précaution puisque la relation entre les paramètres spectroscopiques et la structure de la MOD varie avec l'origine de la MOD et les constituants inorganiques de l'échantillon (comme les nitrates ou le fer) qui peuvent modifier les spectres d'absorbance (Akkanen et al. 2004). Il est difficile de définir l'effet de la taille des macromolécules uniquement alors que, de par la complexité des phénomènes de dégradation de la MOD, plusieurs caractéristiques physico-chimiques évoluent conjointement. Par exemple, pour les différents types de MOD d'origine terrestre étudiés par Perminova et al. (1999), les petites macromolécules ont un pourcentage de carbone aromatique plus élevé et les grosses molécules ont un pourcentage de carbone oxygéné plus important. Par contre, Chin et al. (1994) qui travaillaient sur des MOD d'origine aquatique avaient une corrélation positive entre taille des macromolécules et aromaticité. Il s'avère de toute façon impossible de trouver des MOD dont un seul paramètre serait variable comme la taille ou l'aromaticité sans faire varier la polarité ou le caractère hydrophobe par exemple puisque beaucoup de paramètres changent en même temps et ne peuvent pas être décorrélés (Georgi et Kopinke 2002). Ainsi, il est difficile d'étudier l'effet d'un seul paramètre indépendamment des autres avec des MOD naturelles.

IV.1.1.2.3. Effet des propriétés des contaminants organiques

De la même façon que les interactions sont dépendantes des propriétés de la MOD, elles le sont aussi des propriétés des contaminants. Pour les contaminants apolaires comme les HAP, leur caractère hydrophobe est le principal facteur de leurs interactions avec la MOD (Pan et al. 2007a). Il a été montré que les HAP ont des interactions plus fortes avec la MOD que d'autres contaminants organiques hydrophobes (composés chlorés et alcanes) de même K_{OW} (Georgi et Kopinke 2002). Ceci est peut-être dû à l'affinité particulière des HAP pour les parties aromatiques de la MOD ou à la gêne stérique qui peut avoir lieu avec les molécules chlorées (Georgi et Kopinke 2002). Concernant

les HAP, une relation linéaire a souvent été observée entre les K_{DOC} et les K_{OW} . Par exemple, Georgi et Kopinke (2002) donnent comme équation $\log K_{DOC} = (0,91 \pm 0,05) \log K_{OW} + (0,2 \pm 0,2)$ ($R^2 = 0,976$) avec l'acide humique commercial Roth ; pour McCarthy et Jimenez (1985), les deux coefficients K_{DOC} et K_{OW} sont à peu près égaux.

IV.1.1.2.4. Effet des facteurs environnementaux

Outre les propriétés de la MOD et des HAP, les paramètres physico-chimiques du milieu environnemental peuvent influencer la nature et la force des interactions.

IV.1.1.2.4.1. Effet du pH

L'un des facteurs environnementaux le plus étudié pour ses effets sur les interactions est le pH. Quelques divergences de résultats ont pu être observées, dues notamment aux différences entre les MOD étudiées. D'après Kopinke et al. (2001), avec l'acide humique commercial (Roth), il n'y aurait pratiquement aucun effet du pH sur les interactions avec les HAP, alors que ces interactions augmentent lorsque le pH diminue pour des macromolécules assez petites (2000 Da) et des substances humiques aquatiques naturelles. De la même façon, Lou et al. (2006) ont montré que le K_{DOC} du benzo[a]pyrène augmente quand le pH diminue pour des acides humiques et fulviques de référence (échantillons issus de la rivière Suwannee commercialisés par la Société Internationale des Substances Humiques (IHSS)) et de la MOD aquatique naturelle (issue d'eau douce). Le même phénomène a été observé pour le pyrène, l'anthracène et le pérylène avec les mêmes substances humiques de référence de l'IHSS (Schlautman et Morgan 1993). Contrairement à Kopinke et al. (2001), Pan et al. (2007a) ont montré que la sorption des HAP avec des acides humiques de sols et commerciaux augmente quand le pH diminue. Pour de la MOD estuarienne (issue de la colonne d'eau et de sédiments), une variation de pH entre 5 et 8 n'a que faiblement affecté les interactions benzo[a]pyrène - MOD (De Paolis et Kukkonen 1997).

La différence entre les effets du pH sur la MOD peut s'expliquer en partie par le fait qu'il a déjà été montré que les acides humiques commerciaux (Aldrich par exemple) sont composés de macromolécules beaucoup plus grosses que celles des échantillons naturels (Chin et al. 1994) et qu'ils ne sont pas de bons modèles de MOD aquatique en ce qui concerne leurs propriétés et leur réactivité (Chin et al. 1997). D'autre part, l'acide humique Aldrich est plus apolaire que les substances humiques naturelles tandis que celles des sols sont moins polaires que les substances humiques aquatiques (Chin et al. 1997).

Puisque des composés apolaires comme les HAP sont à priori peu sensibles aux variations de pH, une modification de la force des interactions lors des variations de pH est certainement due à une modification de la conformation de la MOD (Pan et al. 2007a). Dans des conditions de pH neutre et basique, les groupements carboxyles et hydroxyles de la MOD sont déprotonés. Les macromolécules sont donc globalement chargées négativement, ce qui provoque des répulsions intra-

et intermoléculaires et leur donne une conformation plus allongée et ouverte (Pan et al. 2007a, Baalousha et al. 2006, Pan et al. 2008). À ces pH, Pan et al. (2007a) ont supposé la coexistence de microenvironnements hydrophobes entourés de groupements trop polaires ou trop petits pour interagir avec les HAP et de sites hydrophobes compacts ou discrets permettant les interactions. À des pH acides, les groupements carboxyles et hydroxyles sont protonés et la neutralité des macromolécules est conservée ; les macromolécules peuvent donc se replier sur elle-même (Pan et al. 2007a, Pan et al. 2008). Les microenvironnements hydrophobes discrets peuvent s'agréger en plus grandes régions hydrophobes, voire prendre une conformation de type micelle et les macromolécules former un ensemble plus compact (Figure 5) ; ce qui pourrait expliquer que les interactions avec les HAP soient plus fortes à pH acide. Les grosses macromolécules possèderaient déjà une capacité suffisante à créer des cavités hydrophobes par le repli intramoléculaire et leur conformation et leurs interactions avec les contaminants seraient donc moins disposées aux variations de pH (Kopinke et al. 2001). De plus, les interactions π - π entre noyaux aromatiques des HAP et de la MOD seraient plus favorables à pH acide (Pan et al. 2007a).

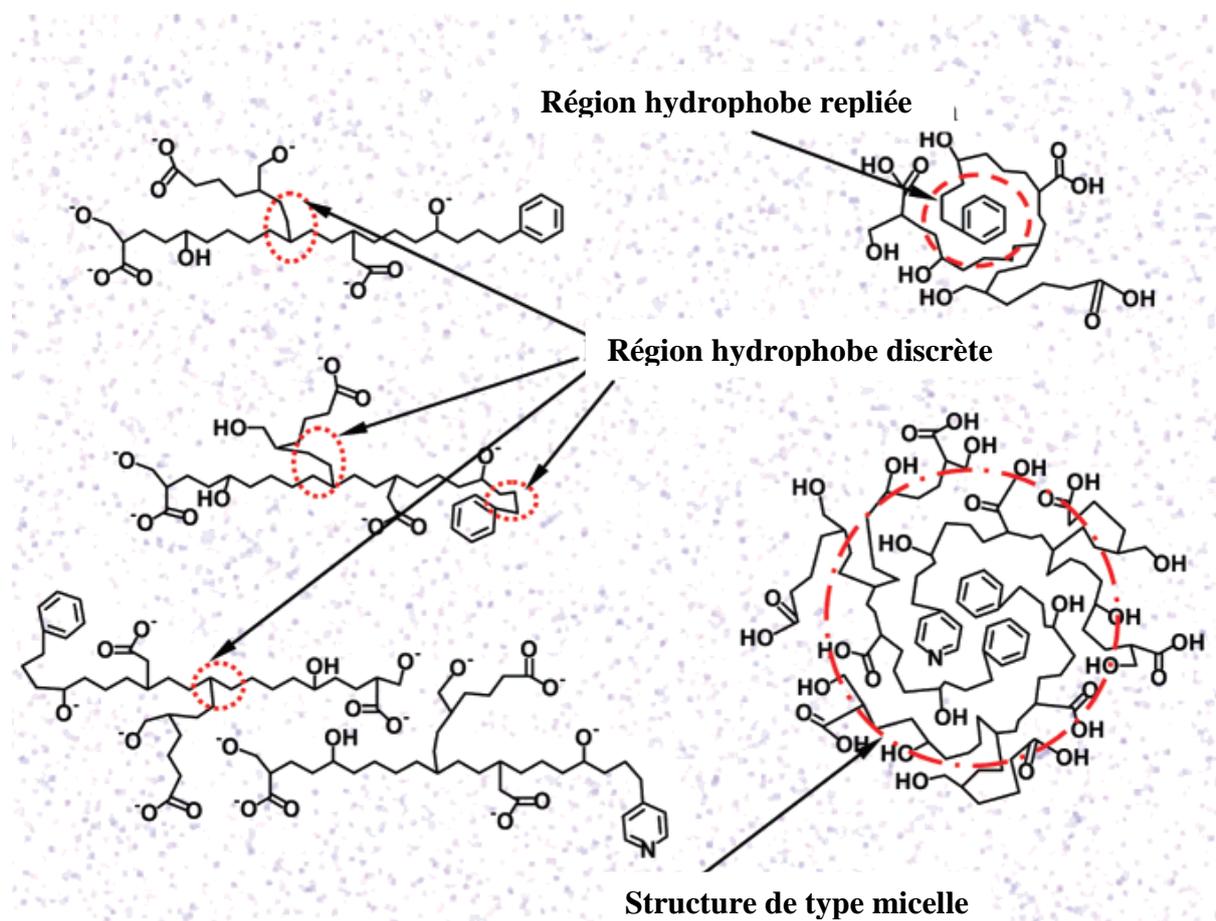


Figure 5. Schéma des structures possibles de la MOD dues aux variations de pH (d'après Pan et al. 2007a), les régions entourées en rouge sont les régions pouvant interagir avec les HAP, le fond coloré représente les molécules d'eau.

IV.1.1.2.4.2. Effet de la force ionique

Les ions en solutions peuvent également modifier les interactions HAP-MOD. Akkanen et Kukkonen (2001) ont montré que le pyrène et le benzo[a]pyrène s'associaient à la MOD naturelle (Lac de Finlande) ou de référence (acide fulvique nordique) d'autant plus que la dureté de l'eau (concentrations en ions Ca^{2+} et Mg^{2+}) est faible. Pan et al. 2008 ont noté une augmentation du K_{DOC} du pyrène avec l'augmentation de la force ionique (Al^{3+}). Schlautman et Morgan (1993) ont observé une diminution du K_{DOC} pour l'anthracène, le pyrène et le pérylène lorsque la concentration en NaCl augmente. D'autre part, ils ont remarqué un faible effet des cations Ca^{2+} , mais qui dépendait du pH. La salinité et plus généralement la force ionique des eaux naturelles ont un effet sur la solubilité aqueuse des contaminants. En effet, les ions présents dans ces eaux (Na^+ , K^+ , Cl^- ...) se lient fortement à l'eau lors de leur dissolution, la rendant alors moins disponible pour la dissolution des composés apolaires neutres, c'est « l'effet de sel » (Schwarzenbach et al. 1993). Cette diminution de la solubilité des contaminants lors de l'augmentation de la force ionique peut donc entraîner une diminution de la fraction dissoute des HAP et favoriser leur association avec la MOD. Ce phénomène peut donc expliquer, au moins en partie, l'augmentation des K_{DOC} parfois observée lorsque la force ionique augmente. D'autre part, une modification de la conductivité a également un effet sur la conformation de la MOD. Généralement, même si cet effet dépend des ions en présence, il a été rapporté une agrégation des macromolécules à force ionique plus élevée, donnant l'impression d'une augmentation de la taille de la MOD (Baalousha et al. 2006). Cependant, au-delà d'une certaine concentration en ions, la taille de la MOD tend à diminuer à cause de la condensation de ces agrégats (Baalousha et al. 2006). La modification de la conformation de la MOD pourrait alors influencer les K_{DOC} en favorisant ou en empêchant l'accessibilité à certains sites de la MOD favorables aux interactions avec les HAP. Ces phénomènes d'agrégation et de condensation seraient dus aux cations dissous qui pourraient permettre de neutraliser les charges négatives de la MOD observées à pH neutre ou basique (Baalousha et al. 2006). Le type de cations joue également un rôle important sur la conformation de la MOD : les cations monovalents (Na^+) ont un effet plus faible que les cations divalents (Ca^{2+}), qui sont capables de neutraliser plus de charges négatives sur la MOD (Baalousha et al. 2006).

IV.1.1.2.4.3. Effet de la concentration en COD

La concentration en MOD est également importante pour les interactions avec les HAP. Plusieurs études ont montré que le K_{DOC} peut diminuer quand la concentration en MOD augmente (McCarthy et Jimenez 1985, Landrum et al. 1984, Pan et al. 2008). Pan et al. (2008) ont observé une agrégation des macromolécules lorsque la concentration en MOD augmente ; celle-ci serait due à la diminution de la distance intermoléculaire et au manque d'espace dans la solution, et pourrait expliquer la modification du K_{DOC} .

IV.1.1.2.4.4. Effet de la température

La température a également un effet sur les interactions HAP-MOD, même si celui-ci est plus faible que celui des autres facteurs précédemment développés (Lüers et ten Hulscher 1996, Raber et Kögel-Knabner 1997). Lüers et ten Hulscher (1996) ont observé des interactions plus faibles lors de l'augmentation de la température pour le fluoranthène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le benzo[a]pyrène, le benzo[ghi]pérylène et l'indéno[1,2,3-c,d] pyrène avec de la MOD d'eau naturelle. Les K_{DOC} diminuent en moyenne de 20 à 30 % lors d'une augmentation de 10 °C (Lüers et ten Hulscher 1996). Raber et Kögel-Knabner (1997) ont obtenu des K_{DOC} pour le benzo[k]fluoranthène et le benzo[a]pyrène en présence de MOD de composts légèrement supérieurs (5 - 15 %) à 5 °C par rapport à 30 °C mais la différence n'est pas statistiquement significative. L'influence de la température peut également s'expliquer par la modification de la solubilité des HAP dans l'eau, ainsi une augmentation de la température expliquerait une diminution du K_{DOC} (Lüers et ten Hulscher 1996). L'intérêt aussi d'étudier l'effet de la température sur les interactions est lié au fait que le calcul des K_{DOC} à différentes températures permet également d'avoir des informations sur la thermodynamique des interactions. La variation d'enthalpie molaire (ΔH) des interactions est de -2 à -4 kJ.mol⁻¹ dans les travaux de Raber et Kögel-Knabner (1997), indiquant que les interactions sont faibles et dirigées par l'entropie, comme c'est le cas pour les interactions hydrophobes. Lüers et ten Hulscher (1996) ont calculé des ΔH allant de -18 kJ.mol⁻¹ pour le fluoranthène à -41 kJ.mol⁻¹ pour le benzo[ghi]pérylène, indiquant des interactions plus fortes.

IV.1.1.2.4.5. Effet de la luminosité

La lumière peut également jouer un rôle sur les interactions. En effet, la photodégradation de la MOD, de par la modification de ses propriétés (aromaticité, taille moléculaire, caractère hydrophobe), influence les interactions avec le benzo[a]pyrène (Lou et al. 2006). Elle peut aussi modifier les propriétés du milieu comme le pH (par production de photoproduits acides ou basiques), les concentrations en dioxygène et en COD, ce qui modifie également les interactions avec les HAP (Lou et al. 2006)

IV.1.1.2.5. Nature des interactions HAP-MOD

L'étude des facteurs et des propriétés influençant les interactions HAP-MOD ont donc permis d'émettre des hypothèses sur leurs mécanismes au niveau moléculaire. Les interactions HAP-MOD sont donc souvent décrites comme des interactions faibles de type Van der Waals entre un dipôle instantané et un dipôle induit (Georgi et Kopinke 2002, Gauthier et al. 1987, Schlautman et Morgan 1993). La faculté d'induire un moment dipolaire à une molécule dépend de sa polarisabilité et celle-ci est augmentée avec le nombre de liaisons C=C (Gauthier et al. 1987). La polarisabilité de la MOD serait donc augmentée avec le nombre de noyaux aromatiques rendant les forces de Van der Waals avec les HAP d'autant plus fortes. L'augmentation de la polarisabilité avec le nombre de noyaux aromatiques étant également valable pour les HAP, il est logique d'observer des interactions plus

fortes avec les HAP les plus lourds. D'autre part, le fait que les HAP aient peu d'affinité avec l'eau s'ajoute aux forces de Van der Waals et ces deux phénomènes sont généralement regroupés sous le terme d'interactions hydrophobes (Gauthier et al. 1987). Wijnja et al. (2004) ont également suggéré l'existence d'interactions π - π (appelées aussi transferts de charges) entre le phénanthrène (donneur d'électron π) et certains groupements de la MOD (accepteurs d'électrons π comme des quinones ou des cations aromatiques azotés). Ce type d'interactions avait également été suggéré par McCarthy et al. (1989) pour le benzo[a]pyrène. Ces interactions spécifiques, orientées et plus fortes que les interactions de Van der Waals pourraient donc amplifier les effets des interactions hydrophobes entre HAP et MOD.

IV.1.1.2.6. Linéarité des interactions HAP-MOD

Même si les interactions entre HAP et MOD ont fait l'objet de plusieurs études, peu d'entre elles ont entrepris de les étudier quantitativement (Georgi et Kopinke 2002). Ceci est dû d'une part à la difficulté d'obtenir des résultats avec des incertitudes faibles et d'autre part à l'influence importante de la technique analytique sur les résultats (Georgi et Kopinke 2002). D'un point de vue quantitatif, deux hypothèses s'affrontent concernant les mécanismes des interactions HAP-MOD. Généralement, les interactions des contaminants organiques hydrophobes avec la MOD sont considérées comme dues à des phénomènes de partition entre l'eau et la MOD (Georgi et Kopinke 2002). Ce modèle de partition est supporté par des observations d'associations à la MOD non compétitives, des isothermes linéaires (linéarité entre les concentrations libres et associées à la MOD) et de faibles enthalpies de liaison (Georgi et Kopinke 2002, McCarthy et Jimenez 1985). D'après Georgi et Kopinke (2002), même si les HAP peuvent interagir spécifiquement avec certaines parties de la MOD (comme les noyaux aromatiques), ceci n'empêche pas le concept du modèle de partition, qui suppose que quelles que soient les concentrations en contaminants, le nombre de sites d'association sur la MOD est toujours en excès.

Pour Laor et Rebhun (2002), le modèle de partition et l'hypothèse d'un excès de sites disponibles sur la MOD ne sont pas suffisants pour expliquer les interactions HAP-MOD. De par l'observation d'isothermes non linéaires, ils ont suggéré que les interactions seraient de nature plus spécifique vis-à-vis de certains sites hydrophobes de la MOD. Ils ont essayé d'expliquer cette non-linéarité par des biais analytiques mais plusieurs travaux ont obtenu les mêmes résultats par des techniques de concepts différents (extinction de fluorescence, complexation-floculation, séparation sur phase inverse), laissant penser que l'observation de cette non-linéarité n'est pas due aux méthodes analytiques (Landrum et al. 1984, Laor et Rebhun 2002, Pan et al. 2007a). Des isothermes non linéaires impliquent une distribution hétérogène des énergies d'association des sites de la MOD, la présence de phénomènes de compétition entre contaminants de propriétés similaires et des hystérèses de sorption/désorption (Pan et al. 2007a). Akkanen et al. (2005a) ont supposé que les sites de la MOD disponibles pour les interactions ont pu être saturés dans leur expérimentation puisqu'ils travaillaient à forte concentration de contaminants (environ 600 ng.L^{-1}) par rapport au milieu naturel, ce qui laisserait supposer que les interactions pourraient tout de même être linéaires à des

concentrations naturelles. Borisover et al. (2006) ont également observé cette saturation de la MOD par le pyrène mais ils étaient en présence de très fortes concentrations en HAP (20 - 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$). D'autre part, la linéarité des interactions des contaminants avec la MOD est souvent étudiée dans des systèmes « monosolutés », alors que les échantillons naturels ne sont jamais constitués uniquement d'un seul composé ; ainsi la compétition due à la présence d'autres contaminants n'a été que peu étudiée et pourrait provoquer la non-linéarité des interactions. Pan et al. (2007a) ont mis en évidence la compétition entre le phénanthrène et le pyrène pour des acides humiques issus de sols et commerciaux dissous dans l'eau. De plus, plusieurs études ont montré une diminution, parfois non significative, du K_{DOC} avec l'augmentation de la concentration en MOD (McCarthy et Jimenez 1985, Landrum et al. 1984, Pan et al. 2008). Ceci peut être dû à un changement de la configuration de la MOD comme décrit plus haut mais une autre hypothèse peut être avancée : puisque les sites spécifiques ont normalement des énergies plus fortes et sont limités en nombre, un plus fort pourcentage de contaminants serait associé à ces sites spécifiques à faible plutôt qu'à forte concentration en solutés, ce qui résulterait en une diminution des interactions après l'ajout de MOD à cause de la compétition pour ces sites (Pan et al. 2007a). Un autre critère pouvant confirmer la non-linéarité est la non-réversibilité des interactions (Akkanen et al. 2005a). Contrairement à McCarthy et Jimenez (1985), Pan et al. (2007a) ont montré des isothermes de sorption différentes de celles de désorption impliquant des interactions plus fortes pendant la désorption que pendant la sorption. Ceci pourrait confirmer la non-linéarité et s'expliquer par un changement de conformation de la MOD une fois associée au HAP, la MOD serait alors plus compacte (Pan et al. 2007a). Des résultats similaires avec une désorption en deux étapes (une lente et une rapide) avaient également été obtenus pour le benzo[a]pyrène par Akkanen et al. (2005a). Il est également possible que la partition et l'association avec des sites spécifiques peuvent avoir lieu en même temps sur des sites différents de la MOD.

Malgré ces observations, les interactions sont le plus souvent modélisées par des isothermes linéaires ; il faut donc rester prudent car si elles sont effectivement non linéaires, le rôle de la MOD pourrait être sous-estimé lors de l'extrapolation des données à plus fortes concentrations (Laor et Rebhun 2002).

IV.1.1.2.7. Cinétique des interactions HAP-MOD

Concernant la cinétique des interactions HAP-MOD, celle-ci a été mesurée par différentes techniques et semble très rapide (1-10 min) (McCarthy et Jimenez 1985, Schlautman et Morgan 1993, Poerschmann et al. 1997). Certaines études ont cependant montré des temps d'interaction beaucoup plus longs, par exemple Li et Lee (2000) ont montré que les temps d'équilibre étaient plutôt de 5 à 7 jours. Généralement, les mesures faites par micro-extraction sur phase solide (SPME) ou extinction de fluorescence donnent des temps d'équilibre très courts contrairement aux autres méthodes comme la dialyse ou la séparation sur phase inverse. Les études d'interactions entre les contaminants et la matière organique issue de sols ou sédiments montrent généralement qu'il y a deux composantes cinétiques qui entrent en jeu : une première, rapide et une deuxième plus lente, pendant laquelle les composés migreraient vers les sites moins accessibles (McCarthy et Jimenez 1985). Cependant,

McCarthy et Jimenez (1985) ont suggéré qu'en solution il n'y ait qu'une composante rapide (ou une rapide et une très rapide) car en solution les sites de la MOD seraient beaucoup plus proches et plus facilement accessibles que dans des sédiments par exemple. Mais le fait que selon la technique le résultat est différent conforte peut-être l'hypothèse d'une cinétique en deux étapes, où l'étape lente ne serait observable que si l'on étudie les interactions sur de très longues périodes.

De nombreux travaux ont permis l'avancée de la connaissance des interactions HAP-MOD mais beaucoup de questions restent encore aujourd'hui sans réponse. L'étude des interactions entre les HAP et la MOD ont donc pris une place importante dans ces travaux de thèse mais nous voulions également nous intéresser aux interactions avec des contaminants organiques moins hydrophobes et surtout plus solubles. De nombreux contaminants organiques polaires et peu hydrophobes sont présents dans l'environnement aquatique et peuvent, même sans être bioaccumulables, poser des problèmes de toxicité. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux substances pharmaceutiques et plus précisément à la classe des benzodiazépines. Ces composés sont des molécules neutres, plus polaires et moins hydrophobes que les HAP qui peuvent être présentes dans l'environnement naturel.

IV.1.2. Les substances pharmaceutiques

Les substances pharmaceutiques font l'objet de plus en plus d'études en ce qui concerne leur présence dans l'environnement. En effet, le développement de techniques analytiques très sensibles a permis la détection de nombreuses molécules actives que ce soient des médicaments ou leurs métabolites issus de dégradations biologiques, chimiques ou physiques. Les médicaments sont issus de la médecine humaine et vétérinaire et sont continuellement consommés en grandes quantités. Chaque année, plus de 3 milliards de boîtes de médicaments sont vendues en France rien qu'aux officines (<http://www.afssaps.fr/Afssaps-media/Publications/Bilans>) et près de 1350 tonnes d'antibiotiques seraient destinés à un usage vétérinaire, dont 93 % pour les animaux destinés à la consommation humaine (<http://www.anmv.afssa.fr>).

Ces substances, une fois consommées, sont en grande partie transformées au sein des organismes et excrétées sous la forme de métabolites ou sous leur forme initiale (Khetan et Collins 2007). Les molécules destinées à la médecine humaine sont concentrées dans les effluents hospitaliers et les eaux usées. Certaines de ces molécules ne sont pas dégradées par les stations de traitement et atteignent les systèmes aquatiques naturels où elles sont diluées et donc présentes à de faibles concentrations (généralement de l'ordre du ng.L^{-1} dans les eaux). Les molécules à usage vétérinaire sont concentrées dans les eaux de rejets d'aquaculture et dans les lisiers d'animaux d'élevages et peuvent également atteindre le milieu naturel via les rivières ou après épandages agricoles. Les sols, les eaux souterraines et de surface et *in fine* les eaux destinées à la consommation peuvent donc contenir des traces de molécules actives (Khetan et Collins 2007).

A cause de leur mode d'action spécifique et du fait que ces composés sont fabriqués intentionnellement pour avoir un effet sur les humains, mammifères ou autres vertébrés, les résidus des produits pharmaceutiques peuvent être aussi, voire même plus, dangereux pour la santé humaine que ceux des pesticides, qui sont créés pour affecter les mauvaises herbes, les champignons et les invertébrés (Cleuvers 2003). Au-delà de problèmes spécifiques à certaines classes de composés, comme le développement d'antibiorésistance ou la destruction de bactéries des systèmes de traitements dus aux antibiotiques, certaines molécules peuvent s'avérer toxiques pour les organismes à des concentrations faibles, de l'ordre de celles que l'on retrouve dans les systèmes aquatiques naturels. La toxicité la plus probable à ces concentrations est la perturbation endocrinienne. Celle-ci est due à la présence de produits chimiques qui ont la capacité d'interférer sur le système hormonal et de causer des dysfonctionnements de la croissance et de la reproduction des organismes (Khetan et Collins 2007).

Cette toxicité a généralement lieu à de très faibles concentrations en contaminants d'où l'intérêt croissant pour des analyses de plus en plus sensibles et permettant l'analyse simultanée d'un maximum de composés. L'une des difficultés quant à l'analyse des substances pharmaceutiques est due à la diversité physico-chimique de ces molécules. En effet, elles peuvent être plus ou moins hydrophobes, voire hydrophiles, neutres ou chargées (négativement et/ou positivement) selon les conditions du milieu. Certaines d'entre elles peuvent être facilement dégradées ce qui complique leur analyse mais également leur extraction. D'autre part, cette diversité de composition augmente la diversité de comportements dans le milieu environnemental puisque les molécules ont soit plus d'affinités pour les sols soit pour les eaux et donc leur transport et leur distribution peuvent être différents selon leurs caractéristiques physico-chimiques. De plus, comme les médicaments sont rejetés dans l'environnement via des boues ou des solutions riches en COD, l'association avec ce dernier pourrait faciliter leur transport dans l'eau et modifier leur sorption avec les sols (Carmosini et Lee 2009). Cependant, face aux difficultés analytiques et au récent intérêt pour ces substances, le manque de données concernant leur comportement et leurs interactions possibles avec la matière organique est assez important.

Il a été montré que la matière organique a la capacité de modifier la dégradation des substances pharmaceutiques (Chiron et al. 2006, Doll et Frimmel 2005). Toutefois, la modification de la dégradation est généralement due à une diminution de la photodégradation par effet de filtre interne en présence de matière organique ou à une augmentation d'espèces réactives issues de la matière organique photodégradée mais aucune interaction directe entre composés et matière organique n'a pu être mise en évidence dans ces études.

Quelques études ont montré que certaines substances pharmaceutiques peuvent s'adsorber sur des sols et des sédiments (Tolls 2001, Stein et al. 2008, Pan et al. 2009). Alors que certains médicaments pourraient s'accumuler dans les sédiments, d'autres se trouveraient uniquement dans la phase aqueuse, et ceci dépendrait de la nature physico-chimique des substances pharmaceutiques et

des sols et sédiments (Tolls 2001, Löffler et al. 2005, Gielen et al. 2009). Ces interactions avec les sols seraient dues en grande partie à la fraction minérale mais au-delà d'un certain pourcentage de carbone organique (9 % pour l'antibiotique oxytétracycline), c'est ce dernier qui dominerait les phénomènes d'interaction (Pan et al. 2009). Il est donc probable que, comme pour les HAP, des interactions aient lieu entre la matière organique et les substances pharmaceutiques. Cependant, Tolls (2001) a mis en évidence une grande variabilité des K_D pour différentes classes de molécules pharmaceutiques et différents sols, et cette variabilité était tout aussi importante même après la normalisation par la fraction organique contenue dans le sol (calcul des K_{OC}). Les valeurs de K_{OC} pour certains médicaments à usage vétérinaire et différents sols varieraient de 17 à 770 000 $L.kg^{-1}$ (Tolls 2001). Ainsi, la fraction organique n'aurait pas autant d'importance pour la sorption des médicaments que pour les HAP et cette sorption dépendrait également de la taille des particules minérales et des conditions environnementales (e. g. pH). L'effet de la matière organique serait en fait plus important et même dominant pour les composés neutres comme la carbamazépine contrairement aux médicaments possédant des charges au pH environnemental (Gielen et al. 2009). D'autre part, Carmosini et Lee (2009) ont suggéré que les macromolécules les plus petites (< 1000 Da) et généralement les plus polaires pourraient interagir avec les médicaments polaires chargés alors que les plus grosses macromolécules, de par leur capacité à former des cavités hydrophobes, interagiraient préférentiellement avec les contaminants apolaires.

Maskaoui et al. (2007) ont montré que certains médicaments pouvaient interagir avec la matière organique colloïdale et ont calculé les K_{DOC} de ces composés (de 54 500 $mL.g^{-1}$ pour la carbamazépine à 754 000 $mL.g^{-1}$ pour la mébévérine) par ultrafiltration. Bai et al. (2008) ont montré que la carbamazépine pouvait interagir avec des substances humiques grâce à l'extinction de fluorescence. Ils ont obtenu des K_{DOC} variant d'environ $11\,000 \pm 2\,000$ à $465\,000 \pm 20\,000$ $mL.g^{-1}$ selon le type de MOD et ont donc conclu que la MOD pouvait avoir un rôle important sur le comportement de la carbamazépine dans l'environnement aquatique. Moeder et al. (2000) ont montré une réduction des aires obtenues par SPME-GC-MS pour l'ibuprofène et le paracétamol en présence d'acides humiques. Même s'ils attribuent cette diminution à la modification de la cinétique d'extraction des contaminants à cause de la présence de MOD, la diminution pourrait également indiquer une diminution de la forme libre de ces contaminants.

De par la polarité des substances pharmaceutiques, on peut supposer que les interactions avec les sols ou la matière organique sont dues à des liaisons hydrogène, des réactions acido-basiques ou plus généralement électrostatiques (Stein et al. 2008). Maskaoui et al. (2007) ont également montré une corrélation positive entre les interactions et le K_{OW} de certains médicaments (propranolol, sulfaméthoxazole, mébévérine, carbamazépine, indométacine, diclofénac, acide méclofénamique), ainsi qu'avec la taille de ces composés. Ceci confirme donc l'importance du caractère hydrophobe des contaminants et de leur taille pour leurs interactions avec la matière organique. Il semblerait donc que les contaminants polaires puissent réagir de la même façon que les HAP avec la matière organique, avec en plus des interactions dues à leur polarité avec les parties

plus polaires de la MOD. Cependant, il semblerait que les interactions soient fortement dépendantes des médicaments puisque l'étude bibliographique de Tolls (2001) n'a pas montré de relations entre le K_{OC} et le K_{OW} pour des substances pharmaceutiques vétérinaires.

Afin d'étudier les interactions entre les substances pharmaceutiques et la MOD, nous avons choisi d'utiliser des médicaments sous forme neutre à pH environnemental puisque leurs interactions pourraient être plus fortes (Gielen et al. 2009). Ces molécules offrent également la possibilité de les analyser par GC-MS. Nous avons ainsi sélectionné des molécules appartenant à la classe des benzodiazépines : la carbamazépine et le diazépam (Tableau 4). Le diazépam est un antidépresseur fréquemment utilisé en médecine humaine et pourrait l'être encore davantage. En effet, les antidépresseurs sont de plus en plus utilisés dans notre société et la dépression pourrait être la deuxième maladie dans le monde d'ici 2020 (Khetan et Collins 2007). Le diazépam agit sur le système nerveux central, il a des propriétés anxiolytiques, sédatives et un effet relaxant sur les muscles (Nunes et al. 2005, Khetan et Collins 2007). La carbamazépine est l'un des antiépileptiques les plus utilisés (Nghiem et al. 2006). Après chaque ingestion, 3 % de cette molécule sont excrétés inchangés et c'est le composé pharmaceutique le plus persistant détecté dans l'environnement (Khetan et Collins 2007, Brun et al. 2006, Nghiem et al. 2006). C'est pourquoi cette molécule est retrouvée fréquemment dans les cours d'eau et a déjà été observée au niveau du $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans des effluents de station d'épuration et dans des eaux de surface (Lam et Mabury 2005). De plus, ces deux composés ont un fort intérêt environnemental puisque leurs toxicités vis-à-vis de certains organismes aquatiques ont été démontrées individuellement ou en présence d'autres composés (Oetken et al. 2005, Cleuvers 2003, Nunes et al. 2005).

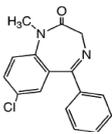
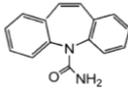
Composé	Formule	Masse molaire (g.mol^{-1})	Moment dipolaire (D)	Solubilité (mg.L^{-1})	pKa (20 °C)	Log K_{ow}
Diazépam		284,7	3,26	50	3,3	2,99
Carbamazépine		236	1,67	17,7	< 1-13,9	2,45

Tableau 4. Propriétés physico-chimiques du diazépam et de la carbamazépine (Luo et al. 1998, Machatha et Yalkowsky 2004, Li et al. 2005, Sila-On et al. 2008, Comerton et al. 2007, Cleuvers 2003, Löffler et al. 2005).

IV.2. Techniques analytiques disponibles

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour l'étude des interactions entre les contaminants organiques et la MOD : des méthodes spectroscopiques (e. g. spectrofluorimétrie), des méthodes séparatives (e. g. dialyse, ultrafiltration) ou des techniques basées sur des affinités avec une phase organique (e. g. échantillonneurs passifs, micro-extraction sur phase solide,

chromatographie sur phase inverse). Les techniques utilisées sont généralement soit appropriées à l'étude de la MOD et on regarde l'effet de l'ajout de contaminant, soit appropriées à l'étude des contaminants et on regarde l'effet de l'ajout de MOD. Les techniques les moins invasives sont les techniques spectroscopiques puisque l'échantillon n'est pas modifié, il est juste observé. Pour les autres techniques, il y a introduction d'outils ou de phase dans le milieu, ce qui peut perturber l'équilibre contaminant - MOD de façon plus ou moins marquée. Les techniques les plus anciennes et toujours utilisées sont l'extinction de fluorescence (Gauthier et al. 1986, Pan et al. 2007b), la dialyse (Carter et Suffet 1982, Akkanen et al. 2005a) et la séparation sur phase inverse (Landrum et al. 1984, Brown et Peake 2003). Plus récemment, la micro-extraction sur phase solide (SPME) a montré son adéquation pour ces études (Poerschmann et al. 1997) et encore plus récemment, les échantillonneurs passifs ont permis de mettre en évidence ces interactions mais ne sont qu'au début de leur développement (Tusseau-Vuillemin et al. 2007). Les échantillonneurs passifs sont constitués d'une phase liquide (e.g. les SPMD (Semi-Permeable Membrane Device)) ou solide (e.g. les POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler)) qui, par diffusion, permettent la concentration des contaminants organiques initialement présents dans un milieu aqueux. Les phases absorbantes ou adsorbantes étant entourées de membranes, ces échantillonneurs ne captent que les contaminants libres dans l'eau et pas ceux associés à la MOD ou aux particules. Ces outils pourraient donc permettre la quantification de la fraction libre des contaminants directement dans le milieu naturel et donc *in fine* le calcul des K_{DOC} . D'autres techniques peuvent également être utilisées, comme l'augmentation de solubilité aqueuse (Chiou et al. 1986), la floculation (Laor et Rebhun 1997), l'électrophorèse capillaire (Lucio et Schmitt-Kopplin 2006), la microcalorimétrie (Hesketh et al. 1996)... Parmi toutes ces techniques, toutes présentent des inconvénients plus ou moins majeurs. Par exemple, avec la technique de floculation, la matière organique ainsi que les contaminants associés sont précipités par l'ajout de cations polyvalents puis séparés de la phase aqueuse ; on peut cependant aisément supposer que l'ajout de ces cations modifie l'équilibre préexistant entre contaminants et matière organique. La séparation sur phase inverse modifie également les équilibres puisque les résultats sont systématiquement surestimés par cette technique par rapport à d'autres qui sont inertes vis-à-vis des équilibres comme la dialyse (Kukkonen et Pellinen 1994). Le principe de la dialyse est la séparation de la matière organique de la phase aqueuse permettant d'isoler les HAP librement dissous dans l'eau de ceux associés à la matière organique. Cette séparation est faite grâce à une membrane de seuil de coupure adapté et la force motrice de la séparation est la diffusion, ce qui permet de ne pas modifier les équilibres. Cependant, la dialyse, comme l'ultrafiltration présente d'autres inconvénients puisque les contaminants organiques hydrophobes s'adsorbent sur les membranes causant la perte de certains composés et rendant l'analyse des contaminants libres plus difficile (Woolgar et Jones 1999, Heringa et Hermens 2003). Les techniques qui semblent les plus prometteuses sont l'extinction de fluorescence et la SPME de par leur simplicité d'utilisation et leurs nombreux avantages tels que rapidité, nécessité de faibles volumes d'échantillons et coût relativement faible.

IV.3. Objectifs de l'étude

De par leur présence dans l'environnement et leur toxicité vis-à-vis de certains organismes, l'étude du comportement des HAP et des médicaments, et plus particulièrement l'étude de leurs interactions avec la MOD, nous a paru très intéressante à mettre en œuvre. Les HAP semblent être de bons modèles du comportement des contaminants hydrophobes alors que les médicaments pourraient permettre d'étoffer les connaissances concernant les interactions entre la MOD et les contaminants organiques plus hydrophiles.

Avant de s'intéresser aux interactions entre les contaminants organiques et la MOD, il a d'abord été nécessaire de choisir les outils analytiques les plus appropriés à cette étude et de les développer (publications n°1 et 2), avant de pouvoir compléter les connaissances déjà bien avancées à ce sujet. Trois techniques nous ont paru les plus appropriées : la SPME, l'extinction de fluorescence et la dialyse. Ces techniques ont dans un premier temps dû être développées pour l'étude des interactions des HAP avec la MOD commerciale afin de pouvoir valider les outils par comparaison avec les données de la littérature (publication n°3). Une fois ces techniques développées, elles ont permis l'étude des interactions HAP-MOD pour différents types de MOD dans différentes conditions environnementales dans le but d'améliorer les connaissances quant aux mécanismes intervenant dans ces interactions (publication n°4 et 5).

Après l'étude des interactions sur des échantillons dont les propriétés physico-chimiques étaient en grande partie contrôlées au laboratoire, le but ultime était de pouvoir appliquer les outils développés à l'étude des interactions directement dans le milieu naturel (publication n°5). Le site du Bassin d'Arcachon a été choisi dans cet objectif car plusieurs projets ont déjà permis de mettre en évidence une faible contamination ubiquitaire en HAP. D'autre part, les eaux interstitielles, à l'interface entre le sédiment et la colonne d'eau, sont intéressantes pour l'étude des interactions HAP-MOD puisque les HAP et la MOD s'y trouvent en quantités plus importantes que dans la colonne d'eau. Ainsi les interactions HAP-MOD dans cette zone de transition pourraient conditionner en partie le rôle de source ou de puits de contaminants du sédiment vis-à-vis de la colonne d'eau. L'étude des interactions HAP-MOD dans les eaux interstitielles pourraient donc permettre de mieux appréhender le rôle de la MOD sur la distribution des HAP dans le Bassin d'Arcachon.

Les techniques analytiques développées pour les HAP ont ensuite été transférées à l'étude des interactions entre les substances pharmaceutiques et la MOD (publication n°6). L'étude des interactions entre les benzodiazépines et la MOD en est à ses débuts et le but de ces travaux de thèse était donc d'étudier les interactions de la carbamazépine et du diazépam avec des MOD commerciales et naturelles de différentes origines et de développer les outils analytiques nécessaires afin (1) d'établir si oui ou non il y a interactions, (2) le cas échéant, de quantifier ces interactions, et enfin (3) de déterminer quelles fractions caractéristiques de la MOD sont mises en jeu dans ces interactions.

Chapitre 2 : matériels et méthodes

Dans cette partie, seuls sont détaillés les échantillons, les principes des techniques et les moyens opératoires, les spécificités des outils et des contaminants étant donnés dans les articles du chapitre 3 et dans les annexes techniques.

Ces travaux de thèse se caractérisent par l'utilisation de plusieurs outils analytiques pour divers objectifs. Les techniques d'extraction et d'analyse des contaminants organiques qui ont permis leur quantification sont détaillées dans une première partie. Les techniques spectroscopiques qui ont été utilisées pour la caractérisation de la MOD sont explicitées dans une seconde partie. Certaines des techniques utilisées ont été adaptées à l'étude des interactions entre les contaminants organiques et la MOD. Les formules nécessaires aux calculs des coefficients de partition permettant la quantification des interactions contaminants organiques – MOD sont données dans une troisième partie. Les échantillons utilisés sont détaillés dans une quatrième partie. Enfin, la méthodologie des plans d'expériences est expliquée dans une cinquième partie.

I. Techniques de dosage des contaminants organiques dans l'eau

Le dosage des contaminants organiques dans des matrices environnementales complexes se fait en plusieurs étapes : tout d'abord les contaminants sont extraits de leur matrice environnementale puis sont analysés (par spectrométrie de masse par exemple) après avoir été séparés par chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide. De plus, pour certains échantillons, il est nécessaire d'ajouter une étape de purification afin d'isoler au mieux le contaminant.

I.1. Techniques usuelles d'extraction

I.1.1. L'extraction liquide-liquide (LLE)

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour extraire les contaminants organiques d'un milieu aqueux. La technique la plus ancienne et la plus simple est l'extraction liquide-liquide. L'extraction liquide-liquide est un procédé physique permettant la séparation d'un ou plusieurs constituants en utilisant leur différence de solubilité dans deux liquides non miscibles. Pour l'extraction des HAP dans l'eau, un solvant organique non miscible avec l'eau et ayant une forte affinité pour les HAP est utilisé : le dichlorométhane. Après décantation, seule la phase organique contenant les HAP est récupérée puis séchée pour enlever les traces d'eau restantes (protocole donné dans l'annexe technique n°1). Cette technique nécessite des quantités de solvant assez importantes et devient rapidement laborieuse en présence de nombreux échantillons ou de volumes d'eau importants (> 1L). Du fait des faibles concentrations en contaminants organiques dans l'environnement aquatique, il est apparu nécessaire de développer une technique permettant l'analyse de gros volumes d'eau ; c'est ainsi que l'extraction sur phase solide ou SPE a vu le jour.

1.1.2. L'extraction sur phase solide (SPE)

La SPE est aujourd'hui la technique la plus utilisée pour l'extraction d'échantillons aqueux environnementaux (Hennion 1999). De par son facteur de concentration très important (plusieurs litres d'eau peuvent être ramenés à quelques μL de solvant), la SPE permet l'analyse d'échantillons ayant des concentrations en composés d'intérêt de l'ordre du ng.L^{-1} sans difficulté.

Le principe de la SPE repose sur l'affinité des contaminants avec une phase adsorbante solide et l'utilisation de différents mélanges de solvants pour ne récupérer que les contaminants désirés, sans les impuretés de la matrice. La grande sélectivité de la SPE est également un avantage par rapport à l'extraction liquide-liquide.

Il existe de nombreuses phases adsorbantes, la première et la plus utilisée pendant longtemps est la silice greffée C_{18} . Cette phase permet l'extraction sans difficulté particulière des analytes apolaires à moyennement polaires (Hennion 1999). Les analytes ioniques ou ionisables peuvent être extraits par des phases de paires d'ions ou d'échanges d'ions. Il existe également des cartouches en adsorbant dit mixte. Ce sont généralement des cartouches de phase inverse contenant des groupements ioniques (par exemple échangeur de cations – phase inverse pour Oasis[®] MCX). Ces phases sont généralement utilisées pour l'extraction de molécules pharmaceutiques contenant des groupements azotés basiques qui peuvent être protonés à faible pH (e. g. NH_4^+) (Hennion 1999). La phase adsorbante est prise entre deux filtres au sein de la cartouche. Pour que le rendement d'extraction soit optimal, la phase doit, dans un premier temps, être conditionnée avec le passage de solvant qui permet d'activer les sites d'adsorption. Ensuite l'échantillon est transféré dans la cartouche à un débit ni trop lent ni trop rapide (environ $5\text{-}10 \text{ mL.min}^{-1}$) pour que les interactions avec la phase aient le temps de se faire. Selon l'échantillon, il peut être nécessaire de faire une étape de lavage pour enlever des impuretés de la matrice. De plus en plus, cette étape est réalisée lors de l'élution en utilisant des solvants et des mélanges de solvants assez sélectifs pour ne retenir que les analytes sans les impuretés. L'éluat est ensuite injecté en chromatographie en phase liquide ou en phase gazeuse tel quel ou après reconcentration. La SPE peut également être automatisée et couplée à la chromatographie (Hennion 1999).

Les conditions opératoires utilisées dans ces travaux pour l'extraction par SPE des HAP et des substances pharmaceutiques sont données dans les annexes techniques n°2 et 3 respectivement.

1.1.3. La micro-extraction sur phase solide (SPME)

La SPME a été introduite au début des années 1990 dans le but de faciliter la préparation de l'échantillon et l'extraction des contaminants à la fois en laboratoire et sur le terrain (Lord et Pawliszyn 2000). Depuis, de nombreuses améliorations ont vu le jour et la SPME peut aujourd'hui être

automatisée, couplée à des chromatographes en phase gazeuse ou en phase liquide et de nombreux contaminants peuvent être analysés grâce à cette technique.

1.1.3.1. Analyse des contaminants organiques

La SPME est une méthode d'extraction sans solvant, automatisable et sensible du fait de sa capacité à concentrer les composés et de sa méthode d'injection (limites de détection de l'ordre du ng.L^{-1}). Elle permet de réduire la durée de l'analyse de manière significative en combinant l'extraction, la concentration et l'injection dans un chromatographe en un processus simple. Son coût est également réduit de par la faible verrerie nécessaire et la réutilisation d'une même fibre pour plusieurs échantillons.

1.1.3.1.1. Principe et fonctionnement

Une fibre de silice fondue enrobée d'un revêtement en polymère est plongée dans un échantillon où les analytes vont se distribuer entre la fibre et l'échantillon jusqu'à atteindre un équilibre (Lord et Pawliszyn 2000). La fibre est ensuite retirée de l'échantillon puis introduite généralement dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse, où les analytes sont désorbés thermiquement et entraînés sur la colonne du chromatographe (Figure 6). Une interface permettant le couplage de la SPME avec la chromatographie en phase liquide a plus récemment été développée dans le but d'analyser également les contaminants non volatils et thermiquement instables. Cette interface permet à la fibre d'être introduite dans la chambre de désorption du chromatographe à pression ambiante ainsi que l'introduction d'un solvant de désorption, l'ensemble pouvant être chauffé pour faciliter la désorption (Lord et Pawliszyn 2000). On trouve aussi des applications où la fibre est désorbée par exposition à du solvant et où l'extrait est ensuite analysé par chromatographie en phase liquide ou en phase gazeuse. Ce mode de désorption est notamment employé lorsque la SPME est utilisée en mode manuel et non en automatique (Durjava et al. 2007, Ter Laak et al. 2006 a et b, Cornelissen et al. 2008).

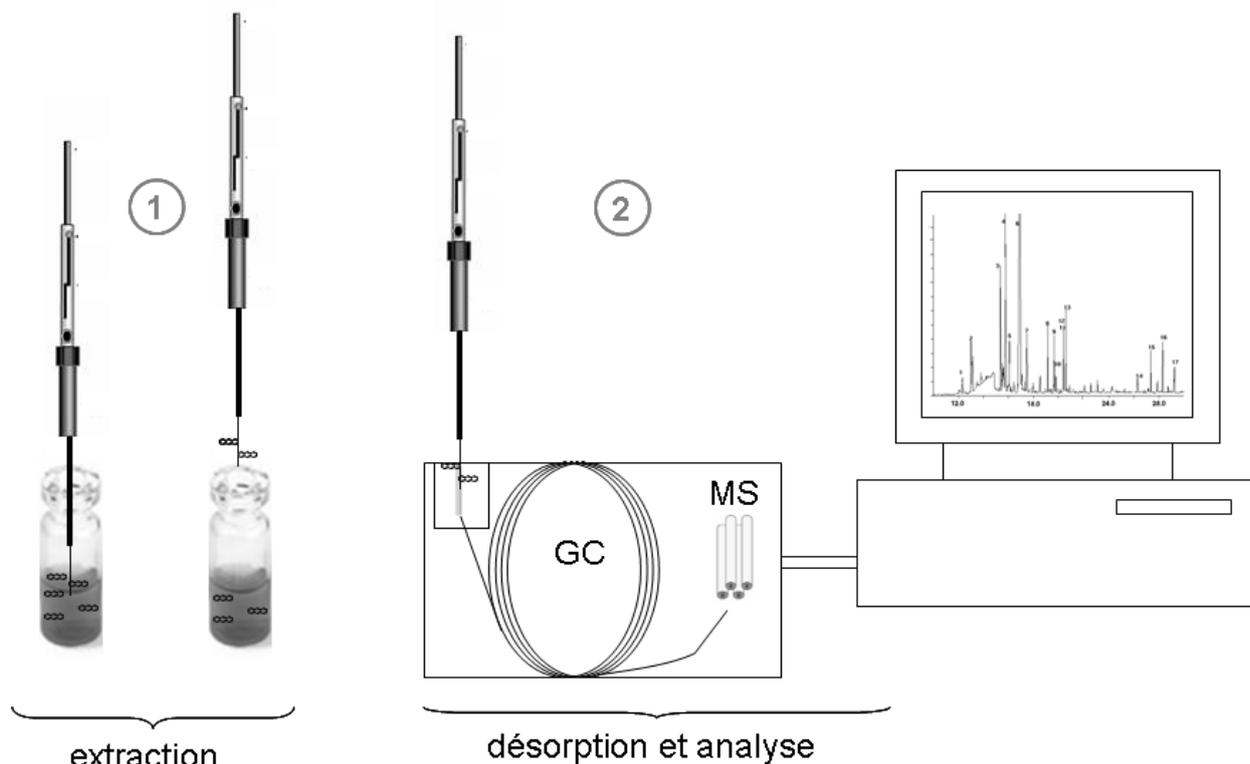


Figure 6. Schéma de principe de la SPME couplée à la GC-MS.

1.1.3.1.2. Choix de la fibre

La SPME doit sa sensibilité et sa sélectivité en grande partie à la nature du polymère qui constitue la fibre. Il existe aujourd'hui près de 50 sortes de fibres SPME si l'on tient compte des calibres d'aiguille, de la conception de l'assemblage du polymère et du polymère lui-même qui sont disponibles. Les premières fibres automatisables commercialisées sont constituées de silice avec le polymère greffé directement dessus. Elles ont de bonnes capacités d'adsorption mais elles sont fragiles et peuvent casser facilement lors de l'introduction de la fibre dans le septum de l'échantillon ou lors de l'injection. Pour améliorer la durabilité des fibres, il est nécessaire que le cœur de la fibre soit rétracté dans l'aiguille lors de ces moments où une forte pression peut être exercée sur la fibre. Cependant, même l'aiguille rétractée, la pression peut être telle que l'aiguille contenant le cœur de la fibre se courbe et finisse par se casser. C'est pourquoi des aiguilles d'un diamètre plus important avec un cœur de fibre plus gros ont été conçues, ce sont les fibres de gauge 23 (contre 24 pour les premières). Les fibres de gauge 24 dépassent rarement les 100 cycles d'extraction alors que celles qui sont plus épaisses dépassent généralement les 300 cycles. De plus, les fibres de plus gros calibre sont compatibles avec un injecteur sans septum (comme le système Merlin Microseal[®]), qui permet d'éviter la perforation du septum lors de l'injection et donc un stress supplémentaire sur la fibre et une perte de morceaux de septum vers la colonne (Pawliszyn et Pedersen-Bjergaard 2006). Afin d'améliorer encore plus la durabilité des fibres, un nouvel assemblage composé d'une fine couche de polymère souple entre la silice et le revêtement a vu le jour. Cette configuration appelée StableFlex[™]

permet une meilleure souplesse du cœur de la fibre (Gonçalves et Alpendurada 2002). Plus récemment, des fibres en métal ont vu le jour ; celles-ci sont encore plus résistantes grâce à l'alliage flexible et inerte qui compose l'aiguille et le cœur de la fibre (au lieu de la silice) (Pawliszyn et Pedersen-Bjergaard 2006). Pour ces différentes sortes de fibres, les paramètres qui ont le plus d'importance pour l'extraction restent la nature du polymère et son épaisseur.

1.1.3.1.3. Nature du revêtement

La nature du revêtement détermine le mécanisme d'extraction des analytes de l'échantillon : soit de l'absorption, soit de l'adsorption. Les revêtements absorbants sont des polymères liquides, principalement des gommés qui agissent un peu comme des éponges, où les analytes vont se répartir à l'intérieur et à l'extérieur (Figure 7). Les revêtements adsorbants sont généralement poreux et retiennent les analytes soit par interactions avec la surface (grâce à des interactions π - π par exemple), soit par piégeage dans les pores (Lord et Pawliszyn 2000).

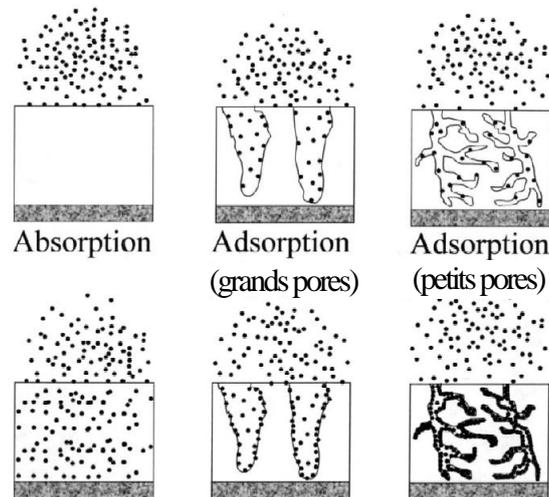


Figure 7. Schéma de l'extraction par des phases absorbantes vs adsorbantes (Lord et Pawliszyn 2000).

Il existe plusieurs polymères commerciaux (Figure 8), certains sont absorbants (e.g. polydiméthylsiloxane ou PDMS, polyacrylate ou PA) et d'autres sont adsorbants (e.g. divinylbenzène ou DVB). Les polymères poreux sont greffés sur des polymères absorbants et il peut y avoir plusieurs revêtements adsorbants sur une même fibre. Toutes ces combinaisons permettent une grande sélectivité vis-à-vis de l'analyte.

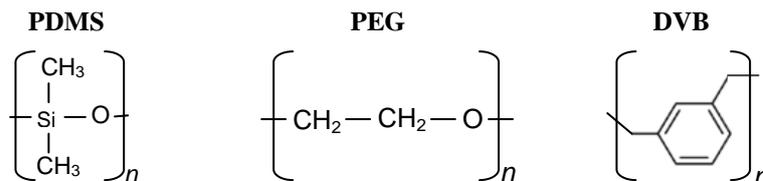


Figure 8. Exemples de revêtements commerciaux.

Pour choisir le polymère adapté à l'analyte et à l'échantillon, il faut prendre en compte plusieurs paramètres : la masse moléculaire de l'analyte et sa polarité mais aussi sa concentration et la complexité de l'échantillon. En effet les petites molécules migrent plus facilement vers le polymère et sont moins retenues que les grosses molécules. Pour les molécules inférieures à 150 uma (unités de masse atomique), il est préférable d'utiliser un revêtement adsorbant si elles sont présentes à de très faibles concentrations. Pour les molécules plus grosses, il est généralement conseillé d'utiliser des phases absorbantes. Cependant, la forme et la configuration des molécules sont également importantes. Des molécules avec des structures planes non substituées peuvent interagir avec le revêtement par des interactions π - π . Par exemple, les HAP qui ont une structure assez rigide due à leurs noyaux aromatiques, ont de fortes interactions et se comportent comme si leurs masses moléculaires étaient 30 à 50 uma supérieures (Shirey 2007). Le contraire se produit pour des molécules fortement substituées, et ce d'autant plus que le substituant est électronégatif. Pour les HAP, il peut donc être intéressant d'utiliser des polymères contenant du DVB, mais si les interactions avec l'adsorbant sont trop fortes, les analytes se désorbent mal et la sensibilité est de ce fait diminuée (Shirey 2007). Avec des polymères plus épais, la désorption est plus lente mais la sensibilité est souvent meilleure (Lord et Pawliszyn 2000). En plus de la taille des molécules, il faut tenir compte de leur polarité. Les molécules polaires inférieures à 80 uma sont préférentiellement extraites avec un polymère PDMS-carboxène (Shirey 2007). Les autres analytes polaires peuvent être facilement extraits avec des fibres en PA. Une fibre en PA permet également d'extraire des composés moins polaires mais aromatiques, pour lesquels elle a de bonnes affinités. Récemment, un revêtement en polyéthylène glycol (PEG) a été développé pour l'extraction très sélective de composés polaires et donnerait de meilleurs résultats que le PA ou le carbowax-DVB, jusque là les plus utilisés pour ces molécules (http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/t407068.Par.0001.File.tmp/t407068.pdf). La fibre PDMS 100 μ m, elle, ne convient pas aux composés polaires. Pour les polymères poreux (les polymères adsorbants), il faut prendre en compte le fait qu'ils ne conviennent qu'à de faibles concentrations en analytes, pour des temps d'extraction courts, pour éviter les phénomènes de compétition entre analytes (Lord et Pawliszyn 2000). Leur capacité est très limitée et leur gamme linéaire assez faible ; ces polymères ne conviennent donc généralement qu'à des matrices propres ou de composition constante. Pour les mêmes raisons, un mélange complexe contenant des composés inconnus ou des gammes de concentrations très différentes pour plusieurs analytes doit plutôt être extrait à l'aide d'une phase absorbante (Lord et Pawliszyn 2000).

Il faut donc faire un compromis entre de nombreux paramètres pour choisir la fibre la plus appropriée. Le développement de la SPME ainsi que la comparaison avec les deux autres techniques d'extraction détaillées précédemment (LLE et SPE) pour l'extraction des HAP sont développés dans les publications n°1 et 2. Les conditions d'extraction par SPME sont données dans l'annexe technique n°4.

1.1.3.1.4. Dosage par SPME

Lorsque l'équilibre entre les composés et la fibre est atteint et tant que les paramètres d'échantillonnage (agitation, température...) sont attentivement contrôlés et parfaitement reproductibles, la quantité d'analytes extraits par la fibre est proportionnelle à la concentration du composé dans l'échantillon (Lord et Pawliszyn 2000). Le rendement d'extraction varie également avec le temps d'extraction de façon linéaire jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint, représentatif de l'équilibre entre les composés et la fibre ou d'une saturation de cette dernière. Afin de diminuer le temps d'analyse, il est possible de se placer à un temps d'immersion inférieur à la durée nécessaire pour atteindre cet équilibre, s'il est parfaitement reproductible, et de conserver la linéarité entre la concentration en analytes de l'échantillon et le signal obtenu après analyse (Lord et Pawliszyn 2000).

1.1.3.2. Étude des interactions avec la MOD

L'un des avantages de la SPME est qu'elle permet d'obtenir plusieurs informations simultanément lors d'un dosage. En effet, il a été montré que la SPME n'extrait que les analytes sous forme libre dans l'eau (Porschmann et al. 1998, King et al. 2004, Poerschmann et al. 1997). Donc théoriquement si la SPME est calibrée avec des solutions aqueuses de concentrations connues en analytes, la quantification par étalonnage externe fournira uniquement les valeurs des concentrations en analytes libres dans l'échantillon. Par ailleurs, l'étalonnage interne permet de déterminer la concentration totale en analytes dans l'échantillon. En effet, si des étalons internes sont ajoutés à l'échantillon en quantité connue avant l'extraction et s'ils se comportent comme les composés étudiés, les quantités d'analytes totales pourront être déterminées par comparaison avec les résultats obtenus pour les étalons internes (Porschmann et al. 1998, King et al. 2004, Poerschmann et al. 1997). Le choix des étalons internes est donc très important : ceux-ci doivent avoir un comportement le plus proche possible des analytes. Les isotopes correspondants aux composés à doser (par exemple des molécules contenant des atomes de ^2H au lieu des ^1H) sont à priori les meilleurs étalons internes possibles puisque les molécules ont les mêmes propriétés chimiques mais des masses différentes. Les étalons internes deutérés et les composés natifs devraient donc se comporter de la même façon dans l'échantillon vis-à-vis de la MOD mais leur différenciation lors de l'analyse pourra se faire par spectrométrie de masse (qui permet l'identification des molécules selon leur masse). La quantification par SPME des HAP en présence de MOD et l'utilisation des différents étalonnages sont développées dans la publication n°3.

A partir de la concentration totale en contaminants (contaminants libres + contaminants associés à la MOD) et de la concentration en contaminants libres, il sera aisé d'en déduire les quantités de contaminants piégés sur la MOD. De plus, il semblerait que, si le volume de l'échantillon est assez important (10 mL) devant le volume de la fibre (PDMS 100 μm : 0,612 μL), la SPME puisse extraire les analytes sans changer significativement leur concentration dans l'échantillon (Hawthorne et al. 2005, Porschmann et al. 1998). Ceci est très intéressant et nécessaire pour l'étude des interactions étant donné que si la SPME extrait trop de contaminants libres, il peut se créer un

déséquilibre entre les contaminants libres et associés à la MOD puisque ces derniers vont alors essayer de se dissocier pour combler le vide créé en contaminants libres dans l'échantillon (Figure 9).

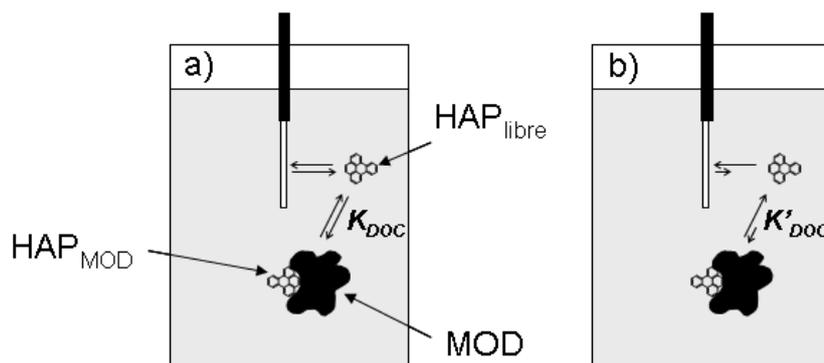


Figure 9. Schéma des équilibres entre contaminants libres et associés à la MOD a) non modifiés par la SPME, b) modifiés par une extraction excessive des contaminants libres par la fibre.

Pour être quantitative, la SPME, dans ces travaux, a été utilisée en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse simple ou en tandem.

1.2. Méthodes d'analyses chromatographiques

Étant donnée la complexité des échantillons naturels, tant au niveau de la présence de multiples contaminants que de la charge matricielle, il est nécessaire de différencier les analytes pour permettre leur identification. Les analytes pouvant être nombreux mais à de faibles concentrations dans les échantillons naturels, des méthodes robustes et sensibles comme la chromatographie doivent être utilisées. La chromatographie, qu'elle soit en phase liquide ou en phase gazeuse, permet la séparation d'analytes à des niveaux traces avec une bonne résolution et l'identification des composés grâce au couplage avec des techniques analytiques telles que la spectrométrie de masse par exemple.

1.2.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Après l'extraction des composés, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est un bon outil pour la quantification de composés organiques peu polaires à l'état de traces. Le rôle du chromatographe est de séparer les composés présents dans l'extrait. La chromatographie en phase gazeuse est réservée à l'analyse de composés volatils ou volatilissables et thermiquement stables. Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire qui sépare les composés selon leur polarité et un détecteur. Le détecteur utilisé dans cette étude est un spectromètre de masse.

Dans le cadre de ces travaux, l'injecteur est une chambre de vaporisation. Cette chambre est constituée d'un insert ou liner en verre qui permet un transfert directement vers la colonne, d'un septum qui permet de l'isoler de l'extérieur et d'un plancher qui permet de faire l'interface avec la

colonne. Lors de l'injection de l'échantillon, les analytes et le solvant sont instantanément vaporisés de par les températures très élevées de l'injecteur (généralement entre 230 et 280 °C). Une fois vaporisées, les molécules sont entraînées en tête de colonne par un gaz vecteur (ici de l'hélium). Lorsque les échantillons analysés sont faiblement concentrés, tout ce qui est injecté est transféré vers la colonne, c'est le mode « splitless » (sans division). Ce mode est généralement utilisé pour les analyses de contaminants traces afin d'obtenir une sensibilité maximale. Lorsque des échantillons sont très concentrés, on préférera utiliser le mode « split » (avec division) où seule une fraction de l'échantillon est entraînée vers la colonne. Une fois en tête de colonne, les molécules se recondensent puisqu'elles sont alors soumises à des températures beaucoup plus faibles (10 – 20 °C inférieure à la température d'ébullition du solvant) autour de 50 – 60 °C. A partir de là, un gradient de température est appliqué dans le four pendant le temps nécessaire à ce que tous les composés présents dans l'échantillon aient traversé la colonne. Les colonnes utilisées sont généralement des colonnes capillaires qui sont des tubes creux et étroits en silice dont la paroi interne est recouverte d'une phase stationnaire. La polarité de cette phase impose la sélectivité de la séparation puisque selon la polarité des analytes, ceux-ci interagissent plus ou moins longtemps avec la phase et les temps de rétention dans la colonne sont ainsi différents d'un composé à un autre. La phase stationnaire utilisée dans ces travaux est en silice greffée 5 % méthyl 95 % phényl polysiloxane. Cette phase hydrophobe permet la séparation et l'élution des composés les moins hydrophobes en premier puisque ceux-ci ont moins d'affinité avec la phase stationnaire.

La sortie de la colonne est directement reliée au spectromètre de masse qui est utilisé ici comme détecteur. Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des analytes. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse ; tous ont en commun trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur. La source permet la production des ions à partir des molécules introduites. La technique d'ionisation la plus largement utilisée est l'ionisation par impact électronique : un filament est chauffé suffisamment pour fabriquer des électrons qui sont ensuite accélérés par un champ électrique de 70 V. Ces électrons ont alors la possibilité d'entrer en collision et d'interagir avec les analytes présents sous forme gazeuse provoquant ainsi leur ionisation. L'analyseur sépare ensuite les ions produits par la source en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) grâce à un champ électrique et/ou magnétique. Les analyseurs les plus courants sont le quadripôle, l'analyseur à temps de vol et le piège ionique. Dans ces travaux, toutes les analyses ont été effectuées avec un quadripôle. Celui-ci tient son nom des quatre barreaux cylindriques parallèles qui le composent. Chaque barreau opposé est chargé au même potentiel, ce qui permet de créer un champ électrique hyperbolique, et la variation de ce potentiel permet de modifier les trajectoires des ions qui diffèrent selon leur rapport m/z . En sortie du quadripôle, le rôle du détecteur est triple : détecter les ions proportionnellement à leur nombre, transformer le signal ionique en signal électronique et amplifier le courant correspondant pour le rendre détectable par l'électronique du système.

Pour l'analyse quantitative avec un quadripôle, le spectromètre de masse est utilisé en mode « Selected Ion Monitoring » (SIM) : seuls les ions caractéristiques des analytes étudiés d'un rapport

m/z donné sont détectés. Les autres ions vont heurter les électrodes ou les parois internes du spectromètre ; ils se déchargent et sont entraînés par le système de pompage. Le gain en sensibilité est important car le mode SIM augmente le signal associé à la détection des analytes tout en diminuant le bruit de fond du système. Pour améliorer la sélectivité et la sensibilité, il est possible d'utiliser la spectrométrie de masse en tandem en couplant plusieurs analyseurs ou en utilisant un piège ionique. Seul le triple quadripôle a été utilisé et sera détaillé ici. Le triple quadripôle, comme son nom l'indique, est constitué de trois quadripôles : le premier (Q1) permet de sélectionner un ou plusieurs ions (les ions précurseurs), le deuxième (Q2) est en fait une cellule de collision qui permet de fragmenter les ions sélectionnés et le troisième (Q3) est l'analyseur qui détecte les ions fils produits (ou ions fragments). Un triple quadripôle peut s'utiliser dans différents modes selon le but de l'analyse (Figure 10).

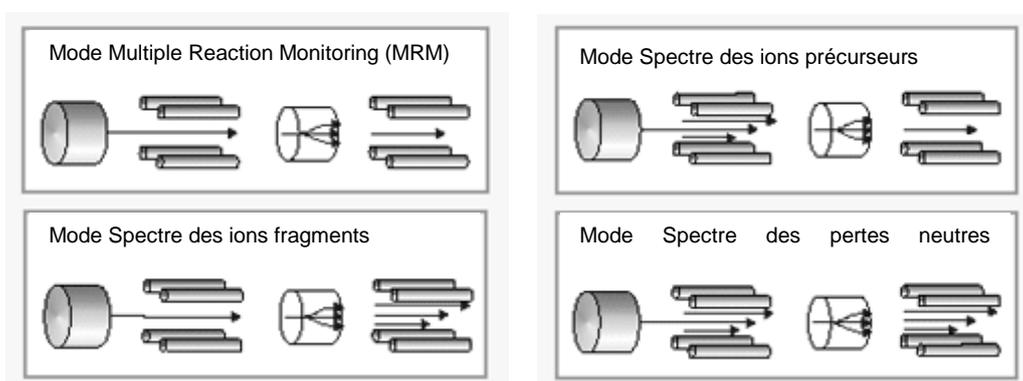


Figure 10. Différents modes d'un triple quadripôle (d'après http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/detail_page_images/Quattro_micro_GC_detail_2.jpg).

Le mode « spectre des ions précurseurs » permet de rechercher les ions précurseurs qui donnent un ion fils spécifique. Le mode « spectre des ions fragments » permet d'identifier tous les ions fils produits lors d'une fragmentation d'un ion précurseur spécifique. Le mode « spectre de perte de neutres » permet de déterminer par un balayage approprié (décalage de Q1 par rapport à Q3 = masse du neutre recherché) les ions précurseurs produisant une perte de masse (perte neutre) spécifique lors de la fragmentation. Le mode « MRM » (Multiple Reaction Monitoring) permet de sélectionner différents ions précurseurs spécifiques des analytes dans Q1 et des ions fils caractéristiques dans Q3. Ce mode fait de la MS/MS la technique la plus sensible et la plus sélective pour quantifier des analytes dans une matrice complexe puisque le bruit de fond observé avec un simple quadripôle en mode SIM est quasiment éliminé. Le mode « spectre des ions fragments » est utilisé pour définir les meilleurs ions fils d'un ion précurseur spécifique d'un composé qui seront choisis dans le mode MRM pour les analyses quantitatives. En choisissant bien les ions fragments, les analytes ayant un même ion précurseur (e.g. ion moléculaire) peuvent ainsi être différenciés.

Les conditions expérimentales des analyses par GC-MS et GC-MS/MS sont données dans les annexes n°5 et 6 respectivement. Le développement de la spectrométrie de masse en tandem ainsi

que son application au dosage des HAP dans des matrices environnementales chargées font l'objet des publications n°1 et 2.

Alors que la GC-MS est utilisée pour l'analyse des HAP, les médicaments, après extraction par SPE, sont analysés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). En effet, même si les substances pharmaceutiques étudiées peuvent être analysées par GC-MS, comme c'est le cas après la SPME, la LC-MS apporte une meilleure sensibilité et est donc utilisée après la SPE.

1.2.2. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

De la même façon que pour la GC-MS, la LC-MS est composée d'un injecteur, d'une colonne qui permet la séparation des analytes et d'un détecteur qui est un spectromètre de masse. La différence réside dans le fait que la phase mobile n'est pas un gaz inerte mais une phase liquide (mélange de solvants) qui interagit, comme la phase stationnaire, avec les analytes. L'appareillage est de ce fait différent puisque l'échantillon n'a pas besoin d'être vaporisé lors de son injection ; d'autre part des pompes sont nécessaires pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne et celle-ci doit pouvoir supporter le passage de solvants à hautes pressions. Le mode d'ionisation en sortie de colonne et avant l'analyse par spectrométrie de masse est également différent puisque l'échantillon est alors en phase liquide. La configuration chromatographique utilisée dans ces travaux est décrite dans l'annexe 7.

Dans ces travaux, l'extrait organique est injecté en mode automatique dans une boucle d'injection, qui permet l'injection d'un volume exact. La phase mobile est polaire en mode gradient d'éluion (mélange de solvants de composition variable au cours de l'analyse). La phase stationnaire est apolaire (chromatographie dite de phase inverse) ; la colonne est remplie de microsphères poreuses de silice greffé de groupements C_{18} (groupements diisobutyloctadécylsilanes). Les composés les plus polaires sortent donc en premier de la colonne dans cette configuration. La LC a été utilisée couplée à un triple quadripôle de même fonctionnement que celui utilisé en GC-MS/MS mais avec une source d'ionisation différente. En effet, en sortie de colonne, l'échantillon a été nébulisé (divisé en très fines gouttelettes) à pression atmosphérique par la technique d'ionisation par électronebuliseur ou ESI (de l'anglais electrospray ionization). Une fois formées, les gouttelettes sont portées à un potentiel élevé (positif ou négatif selon si l'on étudie les ions positifs ou négatifs) qui leur confère une charge. Après le passage d'un gaz sec (N_2), les molécules de solvant contenues dans les gouttelettes s'évaporent provoquant une augmentation progressive de leur densité de charge (rapport z/m très grand) et leur explosion en plus petites gouttelettes et ainsi de suite jusqu'à transformation des analytes en ions moléculaires très chargés. Ceux-ci sont ensuite prêts à être analysés par le spectromètre de masse.

1.2.3. Quantification par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

La quantification est généralement effectuée par étalonnage interne. Les étalons internes sont introduits dans l'échantillon lors de l'extraction et subissent donc les mêmes étapes de préparation de l'échantillon que les composés natifs. Les étalons internes sont choisis selon plusieurs critères essentiels : ils doivent avoir un comportement physico-chimique semblable aux composés recherchés, être absents des échantillons naturels et ne pas provoquer d'interférences avec les analytes. Les étalons internes les plus adaptés sont des isotopes stables (souvent des composés perdeutérés) des analytes recherchés. Les étalons internes utilisés dans cette étude sont donnés dans l'annexe technique n°8.

Par étalonnage interne, les contaminants sont quantifiés en comparant les aires obtenues sur les chromatogrammes avec celles obtenues pour les composés étalons introduits en quantités connues. Cet étalonnage est basé sur la formule suivante :

$$A_i = K_i \times C_i \quad (2.1)$$

où : A_i = aire du pic chromatographique de l'analyte i

C_i = concentration de l'analyte i

K_i = le facteur de réponse de l'analyte i

Ce facteur de réponse propre à l'analyte peut être déterminé relativement à un étalon interne ($A_e = K_e \times C_e$), ce qui conduit à la formule suivante :

$$\frac{A_i}{A_e} = \frac{K_i}{K_e} \times \frac{C_i}{C_e} \quad (2.2)$$

Grâce à une solution de référence contenant les HAP et les étalons en quantités connues, le coefficient de réponse K_i/K_e du système peut être déterminé. Il suffit ensuite d'utiliser sa valeur pour retrouver les concentrations des échantillons par la formule :

$$C_i = C_e \times \frac{A_i}{A_e} \times \frac{K_e}{K_i} \quad (2.3)$$

II. Techniques de caractérisation et de fractionnement de la MOD

La caractérisation précise des macromolécules qui composent la MOD étant à ce jour impossible, la MOD est généralement étudiée par des techniques de dosage élémentaire (carbone, oxygène, azote...) et des techniques spectroscopiques. Ces dernières sont très utilisées pour la caractérisation de la MOD issue des milieux aquatiques car elles sont assez sensibles pour permettre l'étude de faibles volumes où la MOD est présente à l'état de traces. Même si toutes les macromolécules ne possèdent pas de propriétés optiques, l'étude des chromophores et des fluorophores permet de connaître quelques propriétés globales sur la composition de la MOD. Dans ces travaux, la spectroscopie d'absorption UV-visible a été utilisée pour la détermination rapide (en quelques minutes) des propriétés générales de la MOD chromophorique et l'acquisition de spectres de fluorescence a permis une étude plus précise de la MOD.

II.1. L'absorption UV-visible

II.1.1. Principe de l'absorption UV-visible

La MOD possède de nombreux groupements fonctionnels appelés chromophores. Ces molécules absorbent des photons de radiations UV et visible (généralement d'environ 250 à 500 nm) qui vont les exciter à des niveaux d'énergie électronique plus élevés. Ces excitations électroniques observées pour la MOD correspondent à des énergies d'environ 250 à 500 kJ.mol⁻¹, caractéristiques des transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$, les autres étant généralement trop énergétiques pour être observées à ces longueurs d'onde (Figure 11). Ces transitions électroniques peuvent donc avoir lieu uniquement dans des molécules pourvues d'électrons π (doubles et triples liaisons, noyaux aromatiques) et/ou d'hétéroatomes possédant des électrons non liants.

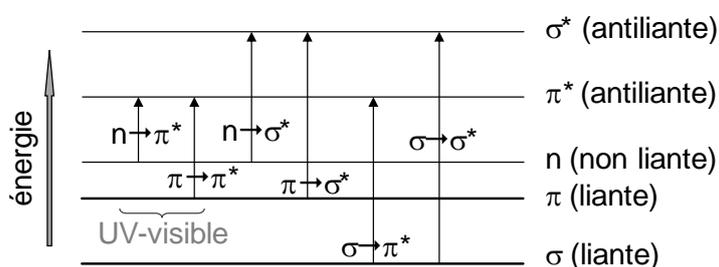


Figure 11. Transitions électroniques entre orbitales moléculaires.

Certaines molécules contenant des hétéroatomes ne sont cependant pas observables à ces longueurs d'onde comme par exemple les électrons non liants de l'oxygène des fonctions éthers et alcools. Ainsi, le méthanol étant transparent sur la gamme de longueurs d'onde observées, il a été utilisé comme solvant de dissolution des contaminants dans ces travaux. Les transitions électroniques de différents groupements fonctionnels ayant des énergies différentes, il est théoriquement possible de déterminer les chromophores présents dans l'échantillon selon la longueur d'onde de l'absorbance. Cependant, l'environnement des atomes subissant l'excitation électronique peut modifier les longueurs d'onde ainsi que la valeur de l'absorbance. La présence de certains substituants et surtout la conjugaison peuvent augmenter les longueurs d'onde et l'absorbance des molécules. Ainsi, les molécules aromatiques ont des absorbances plus importantes et sont déplacées vers les grandes longueurs d'onde lorsque le nombre de noyaux aromatiques conjugués augmente. L'une des principales caractéristiques que le spectre d'absorption peut permettre de déterminer est donc l'aromaticité d'un échantillon. Certaines longueurs d'onde ont ainsi été utilisées pour caractériser la MOD. Par exemple, l'aromaticité d'un échantillon est souvent corrélée aux absorbances entre 270 et 280 nm (Perdue et Ritchie 2003, Thomsen et al. 2002). D'autres auteurs utilisent l'absorbance à 254 nm (Akkanen et al. 2005b, Borisover et al. 2006). De façon générale, les composés aromatiques polycycliques, phénoliques et acides benzoïques absorbent entre 250 et 280 nm (Lepane et al. 2004). Cependant, l'absorbance dépend entre autre de la concentration de l'échantillon et donc il n'est pas possible de comparer les absorbances de différents échantillons entre elles. En effet, d'après la loi de Beer-Lambert, on a :

$$A_{\lambda} = \log \frac{I_0}{I_T} = \varepsilon_{\lambda} \cdot \ell \cdot c \quad (2.4)$$

où A_{λ} est l'absorbance à la longueur d'onde λ , I_0 est l'intensité du rayonnement incident, I_T est l'intensité lumineuse transmise, ℓ est la longueur du chemin optique parcouru dans l'échantillon (en cm), c est la concentration de l'échantillon (en mol.L⁻¹) et ε_{λ} est le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ (en L.mol⁻¹.cm⁻¹).

Pour comparer les échantillons entre eux, on peut donc calculer les coefficients d'extinction molaire aux longueurs d'onde choisies pour s'affranchir de la concentration de l'échantillon et de la largeur de la cuve. Deux paramètres sont généralement utilisés pour caractériser l'aromaticité d'un échantillon : le SUVA (équation 2.5) et le pourcentage d'aromaticité (équation 2.6) (Chin et al. 1994) :

$$\text{SUVA} = \frac{\text{Abs}_{254}}{[\text{COD}]} \times 100 \quad (2.5)$$

où Abs_{254} est l'absorbance à 254 nm et $[\text{COD}]$ est la concentration en COD en mg.L⁻¹.

$$\text{aromaticité}(\%) = 0,05 \times \frac{\text{Abs}_{280}}{[\text{COD}]} + 6,74 \quad (2.6)$$

où Abs_{280} est l'absorbance à 280 nm et $[\text{COD}]$ est la concentration en COD en mol.L⁻¹.

Des rapports d'absorbances peuvent également être utilisés. Par exemple, le rapport appelé E_4/E_6 équivalent à l'absorbance à 465 nm divisée par l'absorbance à 665 nm est souvent utilisé pour caractériser la taille moyenne des macromolécules, puisque certains auteurs ont noté une diminution du rapport E_4/E_6 lorsque la taille moyenne des macromolécules augmente (Thomsen et al. 2002). Un autre rapport est souvent utilisé, E_2/E_3 (l'absorbance à 250 nm divisée par l'absorbance à 365 nm), qui augmente quand l'aromaticité diminue (Thomsen et al. 2002). La principale difficulté de l'étude de la MOD par cette technique repose sur le fait qu'elle est constituée d'une multitude de composés avec des bandes d'absorption élargies en raison de la superposition des transitions électroniques et que les spectres sont de ce fait très mal résolus.

II.1.2. Présentation du spectrophotomètre

Le spectrophotomètre UV-visible utilisé (Jasco V-560) est équipé d'un tube à décharge au deutérium (190 à 350 nm) et d'une lampe à incandescence à filament de tungstène (330 à 900 nm), d'un double monochromateur (réseau plan) pour la sélection des longueurs d'onde et d'un photomultiplicateur (qui permet de transformer l'intensité lumineuse reçue en un signal électrique) comme détecteur. Bien que l'appareil fonctionne en mode double faisceau, il est utilisé en mode simple faisceau : le signal de référence (cuve + solvant) n'est pas acquis simultanément avec l'échantillon mais avant l'échantillon et soustrait manuellement afin d'utiliser exactement la même cuve dans les deux acquisitions.

II.2. La spectrofluorimétrie

L'énergie absorbée par les chromophores de la MOD peut être utilisée par celle-ci dans des réactions photochimiques, transférée à d'autres constituants des eaux naturelles, ou rejetée dans l'environnement sous forme de chaleur (absorbance) ou à des longueurs d'onde plus grandes (fluorescence) (Figure 12) (Perdue et Ritchie 2003).

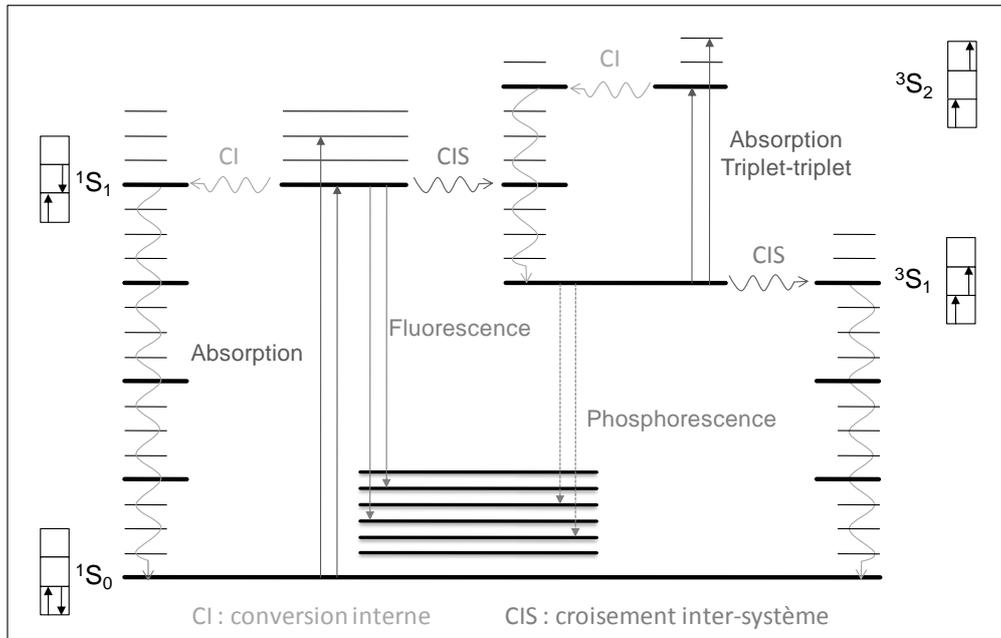


Figure 12. Diagramme de Perrin-Jablonski.

II.2.1. Présentation du spectrofluorimètre

Le spectrofluorimètre utilisé est un Fluorolog FL3-22 SPEX de Jobin Yvon. La source lumineuse est une lampe à arc xénon d'une puissance de 450 Watts qui émet un rayonnement de 240 à 850 nm avec un spectre continu de 240 à 600 nm. L'appareil est équipé de doubles monochromateurs à l'excitation et à l'émission qui permettent d'obtenir d'excellentes résolution et sensibilité. La fluorescence est observée à 90° par rapport au faisceau incident et détectée par un photomultiplicateur. Le compartiment échantillon est thermostaté à 20°C . Les conditions expérimentales sont détaillées dans l'annexe technique n°9.

Lors d'analyses de fluorescence, il est nécessaire de corriger le signal obtenu afin de s'affranchir de certains signaux dus à la diffusion de la lumière et des déviations dues à l'appareillage. La diffusion Rayleigh est le phénomène dominant, elle résulte de collisions élastiques (donc sans échange d'énergie) entre les photons et les molécules. La longueur d'onde d'émission de la raie Rayleigh est donc située à la longueur d'onde d'excitation. Les spectres d'émission ont tous été acquis à des longueurs d'onde d'émission supérieures d'au moins 10 nm à la longueur d'onde d'excitation pour s'affranchir de la raie Rayleigh. La diffusion Raman est un phénomène d'intensité

plus faible et n'est observable que pour les molécules de solvant, mais les raies Raman peuvent être beaucoup plus intenses que les bandes de fluorescence dues aux échantillons. Il est donc nécessaire de faire un spectre du blanc (uniquement le solvant dans les mêmes conditions que l'échantillon) pour soustraire les raies Raman du spectre de l'échantillon. Pour l'étude des MOD naturelles, les raies Raman ne sont parfois pas totalement compensées par la soustraction du blanc qui est effectué avec de l'eau ultrapure qui n'a pas les mêmes paramètres physico-chimiques que les échantillons. L'appareillage est lui aussi responsable de certaines modifications des spectres de fluorescence qu'il est nécessaire de corriger pour pouvoir les comparer entre eux. En premier lieu, l'intensité de la lampe varie avec sa durée de fonctionnement. Le signal acquis est donc systématiquement corrigé par le signal de la lampe seule pris comme référence afin de s'affranchir des fluctuations de son émission (acquisition en mode S/R). Les spectres tridimensionnels obtenus ont ensuite tous été convertis en unités Raman (normalisation par la bande Raman de l'eau, Huguet et al. 2009). D'autre part, les spectres de fluorescence sont déformés du fait que plusieurs éléments de l'appareil ont des propriétés qui dépendent de la longueur d'onde : intensité de la lampe, rendements des monochromateurs d'excitation et d'émission, trajet optique, réponse du photomultiplicateur (Valeur 2004). Pour permettre des analyses quantitatives, il est donc nécessaire d'appliquer des facteurs de correction instrumentaux qui sont fournis par le fabricant. Enfin, tous les spectres de fluorescence permettant la caractérisation de la MOD et l'étude des interactions avec les substances pharmaceutiques ont été acquis dans des conditions de faible absorbance ($< 0,1$) afin de limiter l'effet de filtre interne. En effet, à plus forte absorbance, il peut se produire une atténuation du faisceau d'excitation et/ou d'émission due à une concentration excessive en fluorophores ou en chromophores qui absorbent le rayonnement, faussant la valeur des intensités de fluorescence.

II.2.2. Caractérisation de la MOD

Les propriétés de fluorescence de la MOD permettent d'obtenir des informations sur la structure et les propriétés générales des macromolécules. Cette technique est beaucoup plus sensible et les spectres de fluorescence sont beaucoup mieux structurés que les spectres d'absorption. La fluorescence est ainsi l'une des techniques les plus sensibles qui permettent de caractériser la MOD à partir d'un échantillon aqueux de faible volume sans nécessité de concentration ou d'extraction. Pour caractériser la MOD, la fluorescence tridimensionnelle (3D) est généralement utilisée. Cette technique consiste à accumuler les spectres d'émission acquis pour plusieurs longueurs d'onde d'excitation. Le spectre 3D obtenu est interprété par la présence de pics et de rapports d'intensité caractéristiques. En effet, l'étude de substances humiques par émission/excitation de fluorescence montre que deux pics sont des fluorophores quasi-universels et sont présents dans pratiquement tous les échantillons d'eaux naturelles (Sun et al. 2007). Ils sont notés α et α' (Figure 13 et Tableau 5). D'autres fluorophores peuvent être présents dans les eaux et peuvent renseigner sur la composition ou l'origine de la MOD (Tableau 5).

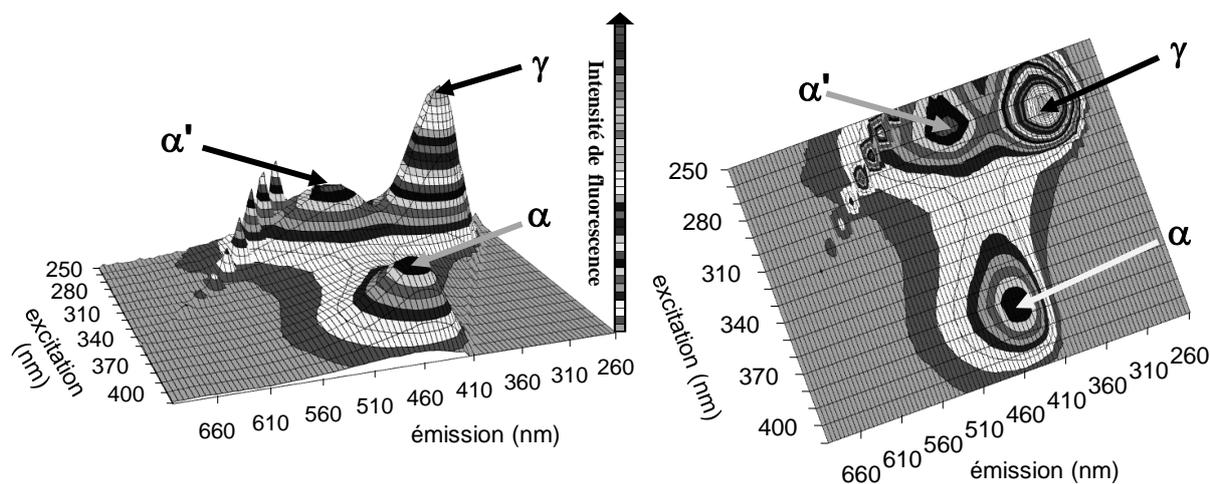


Figure 13. Exemples de spectres 3D de MOD obtenus par spectrofluorimétrie.

Pics	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Type de composés
α	330 - 350	420 - 480	Substances humiques
α'	250 - 260	380 - 480	Substances humiques + matériel récent
β	310 - 320	380 - 420	Matériel récent
γ	270 - 280	300 - 320	Tyrosine, tryptophane ou protéines

Tableau 5. Fluorophores majeurs de l'eau de mer (Parlanti et al. 2000).

La fluorescence tridimensionnelle permet de mettre en évidence la signature des acides humiques et des acides fulviques. Par exemple, le pic α est bien défini pour les acides fulviques mais représente plus un épaulement pour les acides humiques (Sierra et al. 2005, Thacker et al. 2005). Pour les acides fulviques, les intensités relatives entre les pics α et α' ne varient pas beaucoup d'un échantillon à l'autre (Sierra et al. 2005). De plus, à concentrations égales, les intensités de fluorescence des acides fulviques sont plus importantes que celles des acides humiques (Sierra et al. 2005). Ceci est dû à la grande proximité des groupes aromatiques dans les acides humiques. En effet, dans les molécules de masses molaires importantes la probabilité de désactivation des états excités par extinction interne est plus grande, ce qui diminue l'intensité de fluorescence et déplace les maxima vers les grandes longueurs d'onde (Sierra et al. 2005). Une forte intensité de fluorescence est donc, en général, associée à des composés de faible masse moléculaire, faiblement condensés et de degré aromatique faible (Sierra et al. 2005).

Les corrélations entre les caractéristiques de fluorescence et l'origine, l'âge et la biodisponibilité de la matière organique ont été assez largement étudiées. Cependant, peu de travaux ont été réalisés sur l'identification d'une corrélation entre les caractéristiques de fluorescence de la MOD aquatique et le comportement d'association des contaminants organiques. Sun et al. (2007) ont montré qu'il existait une relation négative entre le $\log K_{OC}$ et l'indice de fluorescence $I_{\alpha}/I_{\alpha'}$ pour des

perturbateurs endocriniens, montrant une corrélation entre les interactions et l'aromaticité des substances humiques.

Dans ces travaux, la spectrofluorimétrie a été utilisée pour la caractérisation de la MOD par fluorescence tridimensionnelle (publications n°4, 5 et 6) et a également été utilisée pour l'étude des interactions entre les contaminants organiques et la matière organique par extinction de fluorescence (publications n°3 et 6).

II.2.3. Étude des interactions avec les contaminants

L'extinction de fluorescence peut être utilisée pour l'étude des interactions dans le cas où au moins l'une des deux entités impliquées est fluorescente et si les interactions provoquent une diminution de cette fluorescence. L'extinction de fluorescence observée peut alors avoir deux origines. Elle peut être statique si l'extinction de fluorescence est due à la formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental ou dynamique si l'extinction est due à des collisions d'un inhibiteur sur les fluorophores à l'état excité.

Lors d'une extinction dynamique, l'énergie acquise par le fluorophore est alors perdue lors de sa collision avec un inhibiteur. Le fluorophore voit alors son temps de vie de fluorescence diminuer avec une vitesse de désexcitation qui peut s'écrire sous la forme :

$$v = k_q [F] [I] \quad (2.7)$$

avec [F] la concentration en fluorophore, [I] la concentration d'inhibiteur et k_q la constante bimoléculaire d'inhibition exprimée en $M^{-1}.s^{-1}$.

Lorsque l'inhibiteur est en excès devant le fluorophore, le processus peut être considéré du premier ordre avec une constante de vitesse $k_q [I]$ (Valeur 2004, Albani 2001).

Le rendement quantique de fluorescence est le rapport des constantes de vitesse des photons émis sur la somme des constantes de vitesse de désexcitation du fluorophore. En absence d'inhibiteur il s'écrit :

$$\Phi_F = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{isc}} \quad (2.8)$$

avec k_f la constante de vitesse de désexcitation par émission de fluorescence, k_i par émission de chaleur et k_{isc} par changement d'un état singulet vers un état triplet.

En présence d'inhibiteur, il faut également prendre en considération les processus collisionnels et le rendement quantique devient :

$$\Phi_{F(I)} = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{isc} + k_q [I]} \quad (2.9)$$

Si l'on écrit le rapport des rendements quantiques avec et sans inhibiteur, on a :

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{F(I)}} = \frac{k_r + k_i + k_{isc} + k_q [I]}{k_r + k_i + k_{isc}} = 1 + \frac{1}{k_r + k_i + k_{isc}} \times k_q [I] \quad (2.10)$$

Or le temps de vie de l'état excité (avant le retour à l'état fondamental), qui est appelé ici temps de vie de fluorescence, en absence d'inhibiteur, est égal à :

$$\tau_0 = \frac{1}{k_r + k_i + k_{isc}} \quad (2.11)$$

Il s'en suit donc l'équation suivante, appelée équation de Stern-Volmer :

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{F(I)}} = 1 + k_q \tau_0 [I] = 1 + K_{SV} [I] \quad (2.12)$$

où K_{SV} est la constante de Stern-Volmer.

D'autre part, le rendement quantique de fluorescence est également le rapport entre l'intensité de fluorescence émise (I_F) par rapport à l'intensité de lumière absorbée. Il s'écrit donc :

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_0 - I_T} \quad (2.13)$$

avec I_0 l'intensité incidente et I_T l'intensité transmise, donc non absorbée.

D'après la loi de Beer-Lambert (2.4), on a :

$$I_T = I_0 \cdot e^{-2,3\epsilon l c} \quad (2.14)$$

Ce qui conduit, lorsque l'absorbance est faible ($< 0,1$), à :

$$I_T - I_0 = I_0 (1 - e^{-2,3\epsilon l c}) \approx 2,3\epsilon l c \cdot I_0 \quad (2.15)$$

D'après l'équation (2.13), on a donc une relation linéaire entre I_F et Φ_F :

$$I_F = 2,3\epsilon l c \cdot I_0 \times \Phi_F \quad (2.16)$$

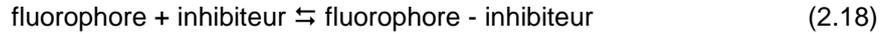
En présence d'inhibiteur, l'équation suivante peut être utilisée pour exprimer les processus d'extinctions collisionnels :

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{F(I)}} = \frac{\tau_0}{\tau(I)} = \frac{I_F}{I_{F(I)}} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [I] = 1 + K_{SV} [I] \quad (2.17)$$

si I est l'intensité de fluorescence en présence d'inhibiteur et I_0 en absence d'inhibiteur, et $\Phi_{F(I)}$, $\tau(I)$ sont Φ_F , τ_0 en présence d'inhibiteur.

De cette équation, il en ressort que plus le temps de vie de fluorescence est grand, plus la probabilité de collision avec l'inhibiteur est grande. La valeur de la constante K_{SV} , qui dépend de τ_0 , peut donc indiquer la probabilité qu'un processus de collision ait lieu. Dans des échantillons étudiés à l'équilibre avec l'air (comme c'est souvent le cas), le dioxygène peut être responsable d'une extinction dynamique de la fluorescence (Danielsen et al. 1995). La valeur de la constante d'extinction bimoléculaire (k_q) pour le dioxygène dans un milieu aqueux homogène est de l'ordre de $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Or, cette valeur est la valeur maximale trouvée de k_q en solution aqueuse et toute valeur largement supérieure indique une probabilité nulle d'extinction de type dynamique (Puchalski et al. 1992).

L'extinction dynamique de la fluorescence, même si elle doit être prise en compte lors des expériences, ne renseigne pas sur les interactions entre les contaminants et la MOD. Seule l'extinction statique, obtenue par formation de complexes non fluorescents provoquant l'atténuation de l'intensité de fluorescence de la MOD ou du contaminant, informe sur les interactions (Gauthier et al. 1986). La formation de complexes entre fluorophores et inhibiteurs peut être décrite par l'équation suivante :



On a alors la constante d'association suivante :

$$K_a = \frac{[\text{fluorophore} - \text{inhibiteur}]}{[\text{fluorophore}] \cdot [\text{inhibiteur}]} = \frac{[\text{FI}]}{[\text{F}] \cdot [\text{I}]} \quad (2.19)$$

avec [FI] la concentration en complexes formés et [F] la concentration en fluorophores qui n'interagissent pas avec l'inhibiteur.

Si la fluorescence de l'inhibiteur est négligeable devant celle des fluorophores, on a $[\text{FI}] + [\text{F}] = [\text{F}]_0$ avec $[\text{F}]_0$ la quantité totale de fluorophore présent dans l'échantillon. Comme le complexe FI ne fluoresce pas, on peut écrire :

$$K_a = \frac{[\text{FI}]}{[\text{F}] \cdot [\text{I}]} = \frac{[\text{F}]_0 - [\text{F}]}{[\text{F}] \cdot [\text{I}]} = \frac{1}{[\text{I}]} \left(\frac{[\text{F}]_0}{[\text{F}]} - 1 \right) \quad (2.20)$$

Comme les concentrations sont proportionnelles aux intensités de fluorescence, on a :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_a [\text{I}] \quad (2.21)$$

On voit ici que l'on obtient une équation de la forme de celle de Stern-Volmer (2.17) et qu'en traçant le rapport des intensités de fluorescence en fonction de la concentration en inhibiteur, il n'est pas possible de différencier l'extinction dynamique de l'extinction statique. Or il est nécessaire, dans le cas de l'étude des interactions contaminants-MOD, de savoir la nature de cette extinction. L'extinction dynamique est souvent très mineure et ne pose généralement pas de problème, mais elle peut introduire une non-linéarité entre l'extinction observée et la concentration en inhibiteur (Zimmermann et al. 1999). En effet, lorsque les extinctions statique et dynamique ont lieu conjointement, l'équation de Stern-Volmer ne représente plus une relation linéaire entre les rapports d'intensité de fluorescence et la concentration en inhibiteur mais se trouve sous la forme (Puchalski et al. 1992) :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S) \cdot [\text{I}] + K_D K_S [\text{I}]^2 \quad (2.22)$$

avec K_D , la constante d'extinction dynamique et K_S , la constante d'extinction statique.

Lorsque l'équation de Stern-Volmer est linéaire, l'extinction est donc soit dynamique soit statique, mais pas les deux. La nature de l'extinction de fluorescence peut être déterminée par la mesure du temps de vie de la fluorescence (Zimmermann et al. 1999, Doll et al. 1999). En effet, dans le cas d'une extinction statique de fluorescence où un complexe non fluorescent est formé à l'état fondamental, la durée de vie de l'état excité des fluorophores non complexés est inchangée, contrairement au cas de l'extinction dynamique, comme le montre l'équation 2.17. Il est également

possible de calculer la valeur k_q de la constante bimoléculaire et la comparer à la valeur maximale qu'elle peut prendre pour une extinction de fluorescence par collision ($10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Dans le cas des interactions entre MOD et contaminants, la constante K_a est équivalente au K_{DOC} . L'étude peut donc se faire en regardant l'extinction du signal de fluorescence de la MOD (fluorophores) lors d'ajout de contaminants (inhibiteurs). Pour certains contaminants organiques comme les HAP regarder l'extinction de la fluorescence de ces contaminants (fluorophores) lors d'ajout de MOD (inhibiteurs) est plus pertinent puisque ces composés ont des rendements quantiques de fluorescence beaucoup plus importants. L'intensité de fluorescence est alors inversement proportionnelle à la concentration en MOD ajoutée (Herbert et al. 1993), ce qui permet de déterminer la capacité complexante de la MOD sans devoir séparer les contaminants de la MOD. Pour les contaminants non fluorescents, l'avantage lorsque l'on regarde l'extinction de fluorescence de la MOD, c'est que l'on peut savoir quelles bandes de fluorescence de la MOD sont les plus impliquées dans les interactions ; par contre si l'interaction a lieu entre les contaminants et la partie de la MOD non fluorescente, il n'y a pas d'extinction de fluorescence et les interactions ne sont donc pas visibles. Alors que lorsque l'on regarde l'extinction de fluorescence des HAP, celle-ci pourra être observée même si les interactions se font avec les parties non fluorescentes de la MOD, par contre on ne pourra pas savoir quelles parties de la MOD sont impliquées dans les interactions.

Cette technique d'extinction de fluorescence peut être compliquée par des difficultés expérimentales, notamment par l'effet de filtre interne. En effet, l'atténuation due à un excès de chromophores ou de fluorophores dans l'échantillon peut être perçue comme un processus d'extinction mais ce n'en est pas un, c'est l'effet de filtre interne (Gauthier et al. 1986). Des corrections peuvent être faites en prenant en compte la géométrie de la cuve et les caractéristiques d'absorption de la solution. Dans les travaux présentés ici, les corrections mathématiques ont été faites selon l'équation développée par MacDonald et al. (1997) qui permet de corriger les effets de filtre interne à l'excitation et à l'émission :

$$\frac{F_{\text{corr}}}{F_{\text{obs}}} = \frac{2,3A_{\text{ex}} \cdot \Delta x \cdot 10^{A_{\text{ex}}x}}{1 - 10^{-A_{\text{ex}}\Delta x}} \cdot \frac{2,3A_{\text{em}} \cdot \Delta y \cdot 10^{A_{\text{em}}y}}{1 - 10^{-A_{\text{em}}\Delta y}} \quad (2.23)$$

avec F_{corr} , la fluorescence corrigée de l'effet de filtre interne, F_{obs} , la fluorescence observée sans correction, A_{ex} , l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation, A_{em} , l'absorbance à la longueur d'onde d'émission, Δx et Δy , les largeurs des faisceaux en cm, x et y les distances dues à la géométrie de la cuve et des faisceaux en cm (Figure 14).

Cependant cette correction mathématique est inexacte et ne peut être utilisée lorsque le facteur de correction est supérieur à 3 (Parker 1968).

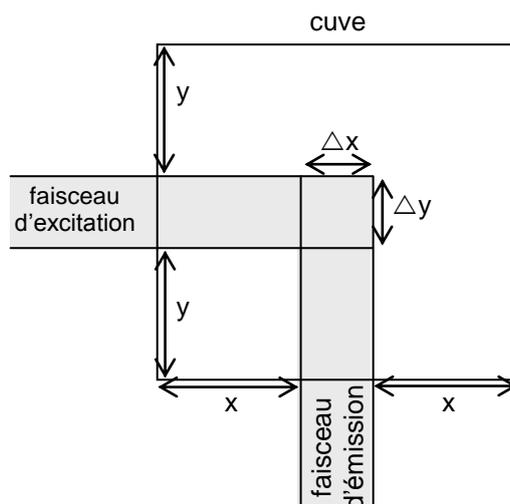


Figure 14. Schéma du trajet optique dans la cuve dans le spectrofluorimètre.

II.3. Mesure du COD

Pour mesurer la concentration en MOD dans un échantillon, il faut procéder à l'analyse élémentaire des éléments les plus présents dans la MOD (oxygène, carbone, hydrogène, azote, phosphore). Les analyses élémentaires de l'hydrogène et de l'oxygène ne peuvent être conduites que sur des échantillons secs, qui doivent donc être concentrés s'il s'agit d'eaux naturelles, avant d'être lyophilisés ou évaporés (Perdue et Ritchie 2003). Les mesures de carbone organique, d'azote et de phosphore dans les systèmes aquatiques sont beaucoup plus aisées car elles peuvent être faites directement sur des échantillons d'eau sans isoler la MOD. Le Carbone Organique Dissous (COD) étant le composé majoritaire de la MOD devant l'azote et le phosphore, il est généralement utilisé pour quantifier la MOD présente dans les eaux naturelles.

Les teneurs en COD ont été mesurées à l'aide d'un appareil Shimadzu TOC-V CSN par la mesure du carbone organique non purgeable (NPOC). L'analyse du COD comporte ici trois étapes principales:

- L'acidification et le dégazage de l'échantillon (air synthétique) permettent de transformer le carbone inorganique (CO_2 en équilibre avec l'air, CaCO_3 , H_2CO_3 , HCO_3^-) en CO_2 qui est évaporé.
- L'oxydation du carbone restant (organique) dans l'échantillon sous forme de CO_2 lors de son passage dans un four à haute température ($680\text{ }^\circ\text{C}$) en présence d'un catalyseur à base de platine.
- L'analyse quantitative du CO_2 formé grâce à un détecteur infrarouge.

La quantification est obtenue par étalonnage externe grâce à une gamme appropriée de concentrations différentes, la molécule organique standard utilisée étant l'hydrogénophthalate de potassium.

II.4. La dialyse

La MOD peut également être caractérisée par la taille des macromolécules qui la compose. Ainsi, plusieurs techniques peuvent être utilisées pour le fractionnement par la taille de la MOD : l'ultrafiltration, la dialyse, le fractionnement par flux-force, la chromatographie d'exclusion stérique... Dans ces travaux, la dialyse a été utilisée mais uniquement dans le but d'étudier les interactions entre les contaminants et la MOD.

II.4.1. Principe de la dialyse

La dialyse permet la séparation physique de molécules en solution selon un critère de taille. L'échantillon de MOD est placé dans un sac à dialyse, qui est en fait une membrane, lui-même plongé dans de l'eau ultrapure. La taille des pores de la membrane est choisie en fonction de la taille des composés à séparer sachant que les seuils de coupure disponibles s'étendent de 100 Da à 100 kDa. Par diffusion, les molécules plus petites que le seuil de coupure peuvent traverser la membrane jusqu'à l'obtention d'un équilibre en concentrations de part et d'autre de la membrane ; alors que les grosses molécules ne traversent pas la membrane et restent piégées dans le sac à dialyse (compartiment alors appelé le rétentat) (Spohn et al. 2005). Sous agitation, l'équilibre entre le rétentat et le dialysat est atteint plus rapidement mais cela peut mettre plusieurs jours (McCarthy et Jimenez 1985, Spohn et al. 2005). Cette technique permet donc le fractionnement de la MOD selon la taille des molécules, mais n'est pas souvent utilisée dans ce but car c'est une méthode longue qui ne permet pas de concentrer les macromolécules de l'échantillon.

L'intérêt de la dialyse est cependant majeur dans l'étude des interactions avec les contaminants. En choisissant bien le seuil de coupure, on peut en effet, par le même principe, séparer les contaminants libres qui peuvent traverser la membrane des contaminants associés à la MOD, qui sont retenus dans le rétentat (Figure 15). En quantifiant ensuite les contaminants dans le dialysat (contaminants libres) et dans le rétentat (contaminants libres et associés à la MOD), les constantes d'association des contaminants avec la MOD peuvent être calculées.

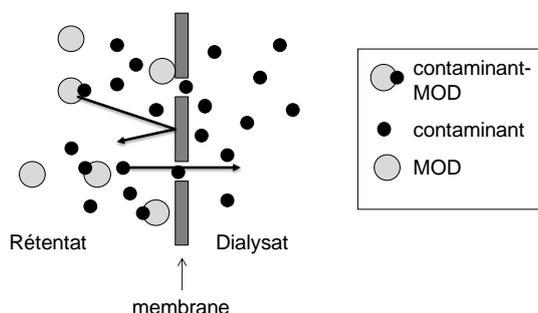


Figure 15. Procédé de séparation des HAP libres des HAP associés à la MOD par dialyse.

Pour étudier les interactions entre contaminants et MOD, plusieurs configurations peuvent être utilisées. Pour un échantillon naturel contenant à la fois de la MOD et des contaminants, l'échantillon est soit placé dans le sac à dialyse et celui-ci immergé dans de l'eau ultrapure (schéma 3 Figure 16),

soit le contraire (schéma 4 Figure 16), un sac à dialyse rempli d'eau immergé dans l'échantillon (si ce dernier a un volume suffisant). Pour des échantillons ne contenant que de la MOD ou fabriqués en laboratoire, de multiples configurations sont possibles. La MOD peut être placée dans le sac à dialyse puis, soit la solution de contaminants est ajoutée dans le sac (schéma 3 Figure 16), soit le sac est plongé dans une solution contenant des contaminants dissous dans de l'eau pure (sans MOD) (schéma 1 Figure 16). Le contraire est également faisable, avec les contaminants dans le sac qui est plongé dans une solution de MOD (schéma 2 Figure 16). On peut aussi mettre des contaminants dans les deux compartiments pour atteindre l'équilibre plus rapidement (schémas 5 et 6 Figure 16). La configuration la plus utilisée en laboratoire (McCarthy et Jimenez 1985, De Paolis et Kukkonen 1997) est l'ajout de la solution de MOD dans le sac, lui-même immergé dans une solution aqueuse de contaminant (schéma 1 Figure 16). Sachant que le volume du sac à dialyse est généralement 10 à 100 fois inférieur au volume extérieur, cette configuration permet de ne pas trop diluer la concentration en contaminant dans le dialysat, d'utiliser un volume d'échantillon de MOD assez faible et une quantification plus aisée des contaminants dans le rétentat.

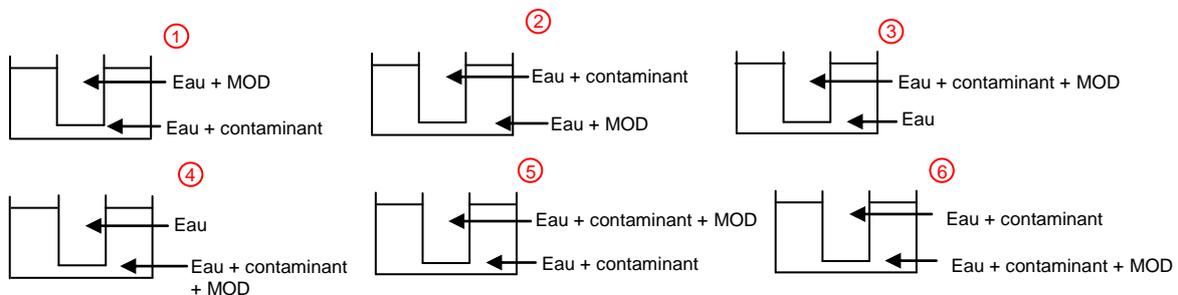


Figure 16. Dispositifs expérimentaux de dialyse possibles pour l'étude des interactions contaminants-MOD.

La dialyse est donc une méthode assez simple à mettre en œuvre mais elle doit ensuite être couplée à des techniques d'extraction et de quantification des contaminants.

II.4.2. Matériel utilisé

La dialyse a été effectuée au moyen de sacs de 10 mL Spectra/Por Biotech CE (membrane en ester de cellulose) fermés aux extrémités par un fil de coton noué (en haut) et un nœud avec la membrane (en bas) (Figure 17). Des premiers essais avec des pinces en nylon aux extrémités avaient montré une adsorption complète des HAP sur ces dernières, ces pinces n'ont donc pas été utilisées. Les expériences effectuées par cette technique sont décrites dans la publication n°3.



Figure 17. Photo du dispositif de dialyse. Le sac à dialyse est ici rempli de fluorescéine, le plomb utilisé sur la photo s'est avéré inutile pour garder le sac vertical et n'a pas été utilisé dans les expériences avec les contaminants.

Les différents composants de la MOD présentent une masse moléculaire comprise entre quelques centaines et 100 000 Da. Des sacs à dialyse avec des seuils de coupure de 1000 Da sont le plus souvent utilisés dans la littérature, ils ont donc été testés. Cependant, une perte de la MOD allant de 5 à 50 % a déjà été observée dans la littérature (Carter et Suffet 1982, Kukkonen et Pellinen 1994) donc des sacs de seuil de coupure de 500 Da ont également été testés afin de retenir un maximum de MOD sans bloquer le passage des HAP. Les sacs sont commercialisés dans une solution de conditionnement à 0,1 % d'azide de sodium et ont donc dû être rincés abondamment pour éliminer cet agent de conservation avant de commencer les expériences. Plusieurs solvants de lavage ont été testés parmi ceux supportés par la membrane en ester de cellulose. Un mélange eau - éthanol (90 - 10) et un mélange eau - HCl (95 - 5) n'ont pas permis d'améliorer significativement le lavage par rapport à l'eau ultrapure simple (Figure 18).

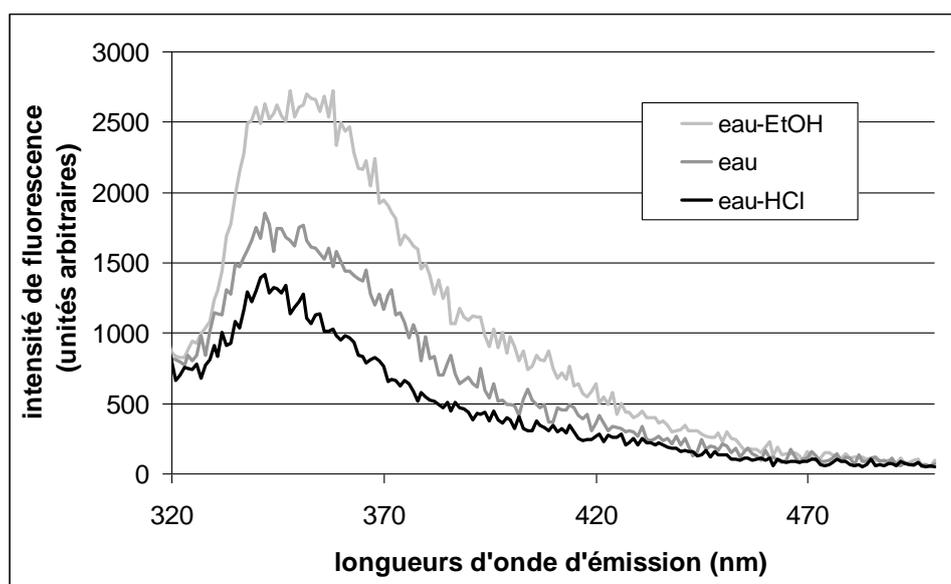


Figure 18. Suivi du nettoyage des sacs à dialyse par spectrofluorimétrie.

Finalement les sacs ont donc été rincés abondamment à l'eau chaude et à l'eau froide du robinet pendant 30 min puis rincés à l'eau ultrapure et enfin laissés dans un bécher d'eau ultrapure toute la nuit précédant l'expérience. Toutefois, ce lavage ne permet pas de faire disparaître la bande de fluorescence observable aux longueurs d'onde d'émission de 320 à 400 nm présente dans les blancs (sac à dialyse rempli d'eau immergé dans l'eau) (Figure 19).

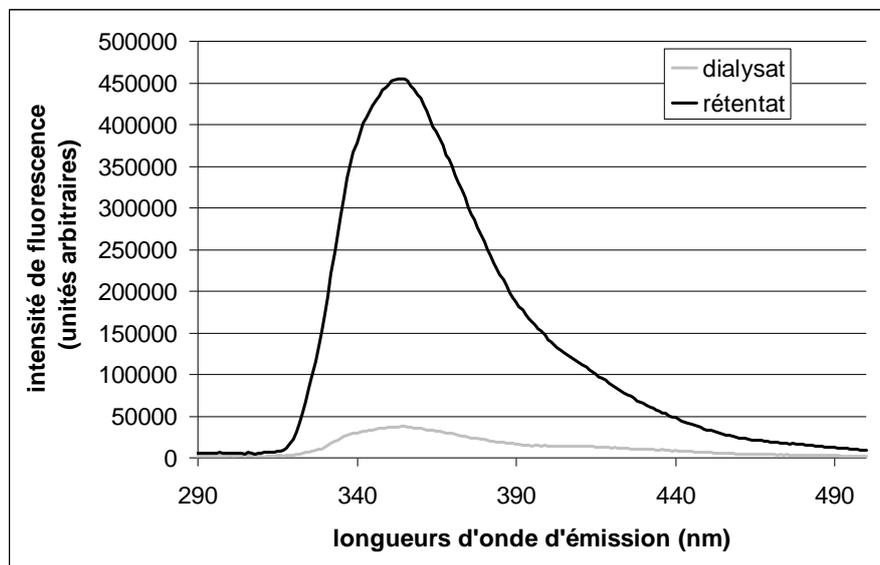


Figure 19. Spectres de fluorescence du dialysat et du rétentat pour un témoin (eau ultrapure à l'intérieur et à l'extérieur du sac à dialyse) après 48h d'immersion, $\lambda_{\text{excitation}} = 277$ nm.

III. Calculs des coefficients de distribution eau-MOD (K_{DOC})

À partir des données obtenues par SPME-GC-MS ou par extinction de fluorescence, il est possible de calculer les coefficients de distribution eau – MOD (K_{DOC}). Les valeurs de ces coefficients peuvent être calculées de plusieurs façons selon la technique analytique utilisée.

III.1. Par SPME

Pour la quantification des HAP libres et totaux en SPME, un étalonnage préliminaire à l'injection des échantillons est nécessaire. En effet, l'étalonnage interne permet de quantifier la concentration totale en HAP dans l'échantillon alors que l'étalonnage externe permet la quantification de la fraction libre. D'autre part, un troisième étalonnage a été développé (voir publication n°3) pour la détermination de la fraction libre car il s'est avéré que l'étalonnage externe donnait des résultats variables. L'étalonnage en question est basé sur le principe de l'étalonnage interne ; la concentration en HAP libre est obtenue par comparaison des aires avec un étalon ajouté en quantité connue sauf qu'au lieu d'utiliser l'étalon deutéré correspondant au HAP dosé, un étalon qui n'a pas d'interaction avec la MOD est utilisé. Le naphthalène deutéré a été employé comme étalon de la fraction dissoute puisque celui-ci n'interagit avec aucune des MOD étudiées dans ces travaux. L'utilisation de ce pseudo-étalonnage interne permet alors de s'affranchir de certaines variations dues au système SPME-GC-MS et diminue ainsi la variabilité sur la mesure des HAP libres.

Le calcul des coefficients de réponse des fractions libres et totales en HAP s'effectue comme expliqué dans le paragraphe 1.2.3. à partir de solutions aqueuses contenant les HAP natifs et les étalons internes en quantités connues extraites par SPME-GC-MS. Au début du développement, ces étalons étaient fabriqués en triplicat sur une gamme de concentrations en HAP natifs allant de 0,1 à 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ce qui permettait également de tracer la droite de calibration pour l'étalonnage externe. Après quelques tests, il s'est avéré que les coefficients de réponse étaient, à la variabilité des triplicats près (5 - 40 %), équivalents pour toute la gamme de concentrations étudiées et que l'étalonnage interne par rapport au naphthalène deutéré était plus reproductible que l'étalonnage externe. Finalement, ces étalons ont donc été injectés à une seule concentration (autour de 50 - 100 ng.L^{-1}) en début et en fin de séquence en dupliquât, et parfois en milieu de séquence lorsque le nombre d'échantillons à étudier était trop élevé (≥ 15).

Grâce à ces étalonnages, toutes les données nécessaires au calcul des K_{DOC} peuvent être obtenues. En effet,

$$K_{\text{DOC}} = \frac{[\text{HAP}]_{\text{MOD}}}{[\text{HAP}]_{\text{libre}} [\text{COD}]} \quad (2.24)$$

où : $[\text{HAP}]_{\text{libre}}$ est la concentration dans l'eau des HAP libres calculée par étalonnage externe ou interne avec le naphthalène deutéré comme étalon,
 $[\text{COD}]$ est la concentration en COD mesurée par l'analyseur de carbone,
 $[\text{HAP}]_{\text{MOD}}$ est la concentration dans l'eau des HAP fixés sur la MOD, obtenue par différence entre $[\text{HAP}]_{\text{totale}}$ (calculée par étalonnage interne) et $[\text{HAP}]_{\text{libre}}$.

Lorsque l'on étudie la partition des HAP en augmentant la concentration en MOD sans modifier la concentration totale de HAP, il est également possible d'utiliser l'équation de type Stern-Volmer (2.25). Cette équation, issue de quelques réarrangements de l'équation donnant le K_{DOC} (2.24), offre l'avantage de calculer ce dernier sans utiliser la concentration en HAP associé à la MOD mais plutôt la concentration totale en HAP qui est mesurée directement en SPME.

$$\frac{[\text{HAP}]_{\text{totale}}}{[\text{HAP}]_{\text{libre}}} = 1 + K_{\text{DOC}} [\text{COD}] \quad (2.25)$$

Il suffit alors de reporter $[\text{HAP}]_{\text{totale}}/[\text{HAP}]_{\text{libre}}$ pour chaque concentration en COD sur une droite dont l'ordonnée à l'origine est égale à 1 et le coefficient directeur est le K_{DOC} .

Il est aussi possible, et c'est ce qui a été fait pour les substances pharmaceutiques, de comparer les aires obtenues par SPME-GC-MS en absence et en présence de MOD. En effet, cela revient à utiliser l'étalonnage externe et donc la concentration en contaminant libre, d'un côté, en présence de MOD, et de l'autre, sans MOD. Comme sans MOD tous les contaminants sont sous forme libre, la concentration en contaminant libre est égale à la concentration totale de contaminants, ce qui conduit à l'équation 2.26. Cependant, cette technique pose le problème pour l'échantillon sans MOD de reproduire une solution aqueuse identique à l'échantillon en termes de propriétés physico-chimiques et n'est utilisable que dans le cas d'ajout artificiel de contaminant puisqu'il doit être ajouté

en quantité connue dans les deux échantillons. Néanmoins, cette technique peut être utilisée lorsque les étalons internes échangés isotopiquement (^2H ou ^{13}C) correspondants aux analytes recherchés ne sont pas disponibles.

$$\frac{aires_{sansMOD}}{aires_{avecMOD}} = 1 + K_{DOC}[COD] \quad (2.26)$$

III.2. Par extinction de fluorescence

Par cette méthode, comme pour la dernière technique de calcul par SPME, il n'est pas nécessaire de connaître les concentrations des fractions libre et totale en contaminants pour calculer le K_{DOC} . Lorsque les interactions HAP-MOD sont étudiées, la fluorescence des HAP étant largement dominante, l'extinction de fluorescence des HAP causée par l'introduction de MOD est observée. D'après l'équation de type Stern-Volmer sur l'extinction de fluorescence (2.21), il existe une relation linéaire entre la concentration en MOD et la fluorescence de l'échantillon (Herbert et al. 1993) :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{DOC}[COD] \quad (2.27)$$

avec F_0 la fluorescence du contaminant en l'absence de MOD, F la fluorescence du contaminant en présence de MOD à différentes concentrations, K_{DOC} le coefficient de partition et $[COD]$ la concentration en carbone organique dissous.

Lorsque l'extinction de fluorescence est observée pour différentes concentrations en MOD, il suffit donc de reporter F_0/F pour chaque concentration en COD sur une droite dont le coefficient directeur donne le K_{DOC} .

Cette équation n'est cependant utilisable que si plusieurs hypothèses sont respectées. D'une part, la fluorescence des HAP doit être largement supérieure à celle de la MOD. En effet, il est nécessaire de soustraire la fluorescence du blanc MOD seule de la fluorescence du mélange HAP + MOD afin de n'utiliser que la variation de fluorescence du HAP. Or, étant donné que seuls les fluorophores libres ont la capacité de fluorescer, la formation de complexes HAP-MOD peut induire une diminution de la fluorescence de la MOD de la même façon que pour les HAP. Le signal à soustraire (blanc MOD libre) peut donc être légèrement différent de l'échantillon de MOD sans HAP (blanc MOD total). Or, il n'est pas possible de déterminer la part de « MOD libre » et seul le signal de la « MOD totale » peut être soustrait, impliquant une erreur sur la mesure de F qui sera d'autant plus grande que le signal de la MOD est éteint et que la fluorescence de la MOD représente une part importante de la fluorescence totale de l'échantillon. D'autre part, il est nécessaire que la concentration en COD soit en excès devant les HAP afin de pouvoir supposer que la concentration en COD libre est environ égale à la concentration en COD totale. Il est alors possible d'utiliser la valeur de concentration en COD mesurée, sans correction de la fraction associée aux HAP, pour tracer la droite de Stern-Volmer (Gauthier et al. 1986). Cette équation n'est donc utilisable que si l'inhibiteur est en large excès devant le fluorophore étudié et si la fluorescence de l'inhibiteur reste négligeable devant celle du fluorophore.

Pour l'étude des interactions entre la MOD et les substances pharmaceutiques, le fluorophore (la MOD) est en excès devant l'inhibiteur (le médicament étudié) et ce dernier, bien que faiblement fluorescent, peut présenter des intensités de fluorescence non négligeables par rapport à celle de la MOD. Il est donc dans ce cas nécessaire de prendre en considération la fluorescence de l'inhibiteur et la diminution de son intensité lors de la formation de complexe avec la MOD. Dans ce cas, on peut écrire que, sans interaction, la fluorescence du mélange MOD + médicament serait :

$$F_{\emptyset} = F_{MOD} + F_{med} \quad (2.28)$$

avec F_{\emptyset} , la fluorescence théorique sans interaction, F_{MOD} , la fluorescence de la MOD seule et F_{med} la fluorescence du médicament seul.

En présence d'interaction, la fluorescence de l'échantillon (mélange MOD + médicament) est de la forme :

$$F = a \cdot F_{MOD} + b \cdot F_{med} = F_{MOD(med)} + F_{med(MOD)} \quad (2.29)$$

avec F , la fluorescence mesurée de l'échantillon, a , le coefficient d'extinction de fluorescence de la MOD, b le coefficient d'extinction de fluorescence du médicament avec a et $b < 1$ pour une extinction de fluorescence, $F_{MOD(med)}$, la fluorescence de la MOD en présence de médicament et $F_{med(MOD)}$ la fluorescence du médicament en présence de MOD.

La diminution de fluorescence due à la formation du complexe MOD-médicament non fluorescent s'écrit donc de la forme :

$$F_{\emptyset} - F = F_{MOD} + F_{med} - F \quad (2.30)$$

L'équation du K_{DOC} peut donc s'écrire :

$$K_{DOC} = \frac{F_{MOD} + F_{med} - F}{[MOD]_{libre} \cdot [med]_{libre}} \quad (2.31)$$

avec $[MOD]_{libre}$ la concentration en MOD non associée au médicament et $[med]_{libre}$ la concentration en médicaments non associés à la MOD.

Étant donné que seule la fluorescence du mélange et celle des fluorophores et inhibiteurs pris séparément sont mesurables, il est impossible de déterminer directement $[MOD]_{libre}$ et $[med]_{libre}$. Pour approximer ces valeurs, il est donc nécessaire de faire des hypothèses supplémentaires. On peut ainsi supposer que l'extinction de la fluorescence de la MOD est environ égale à celle du médicament ; ceci revient à dire que $a \approx b$ dans l'équation 2.29. Cette hypothèse peut être éloignée des faits puisqu'elle implique que les mêmes proportions de fluorophores de la MOD et du médicament sont impliquées dans les interactions. Cependant, cette hypothèse reste plus proche de la réalité que si l'on considérait que $b = 0$ (hypothèse que l'on fait pour les interactions HAP – MOD). On peut alors poser :

$$\frac{F}{F_{MOD} + F_{med}} = \frac{F_{MOD(med)}}{F_{MOD}} = \frac{F_{med(MOD)}}{F_{med}} \quad (2.32)$$

La concentration en MOD libre dans le mélange est alors proportionnelle à $F_{MOD(med)}$ et la concentration en médicament libre peut être obtenue par l'équation suivante :

$$[\text{med}]_{\text{libre}} = \frac{F}{F_{\text{MOD}} + F_{\text{med}}} [\text{med}]_{\text{total}} \quad (2.33)$$

avec $[\text{med}]_{\text{total}}$ la concentration totale en médicaments dans l'échantillon.

À partir des relations 2.32 et 2.33, l'équation du K_{DOC} (2.29), après quelques réarrangements mathématiques, peut s'écrire :

$$K_{\text{DOC}} = \frac{(F_{\text{MOD}} + F_{\text{med}})^3 - F \cdot (F_{\text{MOD}} + F_{\text{med}})^2}{F^2 \cdot F_{\text{MOD}}} \times \frac{1}{[\text{med}]_{\text{total}}} \quad (2.34)$$

Le K_{DOC} peut donc être calculé grâce à cette équation pour chaque concentration en médicament, mais il peut également être retrouvé en reportant le rapport des fluorescences pour chaque concentration en médicament sur une droite dont le coefficient directeur donne le K_{DOC} .

IV. Les échantillons de matière organique dissoute (MOD)

Dans ces travaux, divers types de MOD ont été étudiés dans le but de corrélérer les propriétés des macromolécules aux valeurs de K_{DOC} obtenues pour les différents contaminants organiques. De la MOD commerciale a été utilisée afin de comparer les résultats obtenus avec ceux décrits dans la littérature (notamment pour les interactions avec les HAP, publication n°3) et pour donner un point de comparaison pour les études à venir en ce qui concerne les interactions avec les substances pharmaceutiques (publication n°6). Ensuite, les interactions ont été étudiées avec différentes sortes de MOD d'origine naturelle.

IV.1. L'acide humique Aldrich

Pour le développement analytique, de l'acide humique Aldrich technique en poudre a été utilisé. Celui-ci est en effet utilisé par de nombreuses équipes à travers le monde et a été repris ici par souci de comparaison des résultats, même s'il n'est pas représentatif de la MOD aquatique naturelle. Sa composition élémentaire donnée par le fournisseur pour les éléments principaux est détaillée dans le Tableau 6.

Éléments	Composition
carbone	39,0 %
sodium	8,7 %
hydrogène	4,6 %
calcium	1,4 %

Tableau 6. Composition élémentaire de l'acide humique commercial.

Les interactions ont été étudiées à partir de différentes solutions mères à différentes concentrations d'acide humique mais celles-ci ont toujours été préparées de la même façon. Une

certaine quantité de poudre de cet acide humique a été pesée dans une petite barquette d'aluminium transférée ensuite dans une bouteille remplie d'eau ultrapure. L'eau ultrapure est obtenue par purification grâce à des cartouches d'osmose inverse, un module d'électrodésionisation ainsi qu'une filtration à 0,22 μm . Cette eau ultrapure a des concentrations en COD inférieures à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, une conductivité à 25 °C d'environ 0,056 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ et une quantité de particules ($> 0,22 \mu\text{m}$) inférieure à 1 particule.mL⁻¹. Pour homogénéiser la solution aqueuse d'acide humique, la bouteille a été placée 10 - 15 min dans un bain ultrasons puis cette solution a été filtrée sur un filtre en fibre de verre GF/F à 0,7 μm . La teneur en COD a ensuite été mesurée pour chaque solution mère.

IV.2. Les MOD naturelles

Deux échantillons naturels concentrés ont été utilisés dans les études d'interaction entre la MOD et les substances pharmaceutiques. Ces échantillons ont été utilisés après concentration de la MOD par osmose inverse ou nanofiltration, qui sont des techniques permettant de séparer les molécules d'eau des macromolécules avec un minimum de perte de ces dernières. L'un des échantillons provient d'une eau marine, prélevée à Toulon en Mai 2006 et l'autre d'une eau douce prélevée à La Réole dans la Garonne en février 2007 (Figure 20).



Figure 20. Carte des prélèvements de l'eau douce et de l'eau marine.

Pour l'échantillon de La Réole, 332 L d'eau ont été filtrés à 0,45 μm puis concentrés par osmose inverse et ramenés à 3 L. Les 940 L prélevés à Toulon ont également été filtrés à 0,45 μm mais en raison de la forte salinité de la Méditerranée (environ 38), l'échantillon a d'abord été concentré par nanofiltration en maintenant une salinité constante par diafiltration (nanofiltration en ajoutant de l'eau ultrapure) et ensuite concentré par osmose inverse. La nanofiltration des 940 L a permis de concentrer la MOD pour obtenir 32 L d'échantillon à salinité 10,2. Enfin ces 32 L ont été ramenés à 10,5 L par osmose inverse. Les paramètres physico-chimiques de ces échantillons après concentration sont reportés dans le Tableau 7.

	La Réole après concentration par osmose inverse	Toulon après concentration par nanofiltration/osmose inverse
pH	7,2	7,8
Salinité	4,0	25,7
[COD] en mg.L ⁻¹	111,0 ± 0,6	30,4 ± 0,4

Tableau 7. Paramètres physico-chimiques des eaux naturelles concentrées (Huguet, 2007).

Juste après concentration, les échantillons de La Réole et de Toulon ont été ultrafiltrés pour connaître les proportions en COD par fraction de taille des molécules. L'échantillon de Toulon était formé majoritairement de petites molécules (80 % du COD représentait des molécules plus petites que 1000 Da) alors que l'échantillon de La Réole était formé majoritairement de macromolécules plus grosses (Figure 21).

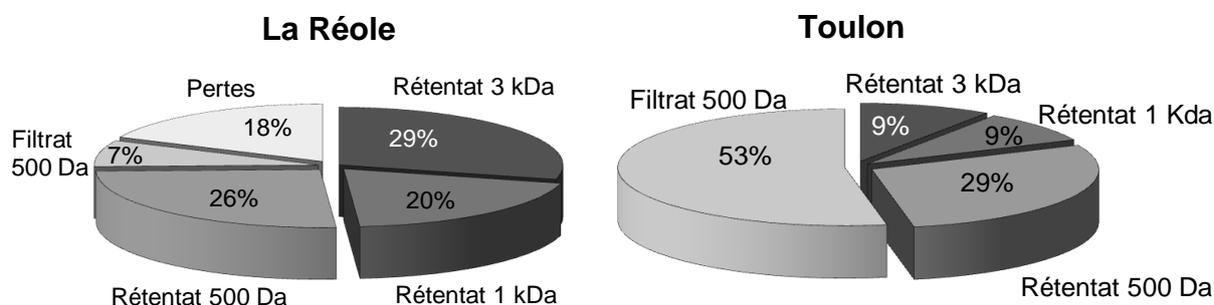


Figure 21. Fractions d'ultrafiltration des échantillons concentrés de La Réole et de Toulon (Huguet, 2007).

Des eaux interstitielles provenant de sédiments du Bassin d'Arcachon ont également été étudiées dans le cadre de ces travaux. Ces eaux ont été utilisées pour l'étude des interactions HAP-MOD par SPME-GC-MS grâce au dosage des HAP naturellement présents dans ces échantillons en parallèle de l'étude de la MOD. En effet, les eaux interstitielles contenant généralement des teneurs en COD plus fortes que la colonne d'eau, c'est certainement à cette interface sédiment-eau que les interactions entre contaminants et MOD sont les plus intéressantes à étudier. D'autre part, certaines de ces eaux interstitielles ont été utilisées comme matrice pour l'étude des interactions MOD-substances pharmaceutiques. Contrairement aux HAP qui sont ubiquitaires dans l'environnement, les médicaments ne sont pas présents dans les sédiments du Bassin d'Arcachon et ont été ajoutés directement dans les eaux interstitielles pour leur étude par extinction de fluorescence. Les sédiments ont été prélevés à sec au moment de la basse mer à différents endroits du Bassin d'Arcachon (Figure 22) et dans les ports de La Teste et d'Arcachon (Figure 23). Les eaux interstitielles ont été extraites par centrifugation (9000 g, 11 min, 15 °C) puis filtrées sur filtres en fibre de verre GF/F 0,7 µm. Leur MOD a été caractérisée par spectrofluorimétrie tridimensionnelle, absorption UV-visible et analyseur de carbone. Ces échantillons font l'objet de la publication n°5 où leur prélèvement et leur composition en MOD, HAP et les interactions HAP-MOD sont développés. Leurs interactions avec les substances pharmaceutiques sont quant à elles développées dans la publication n°6.

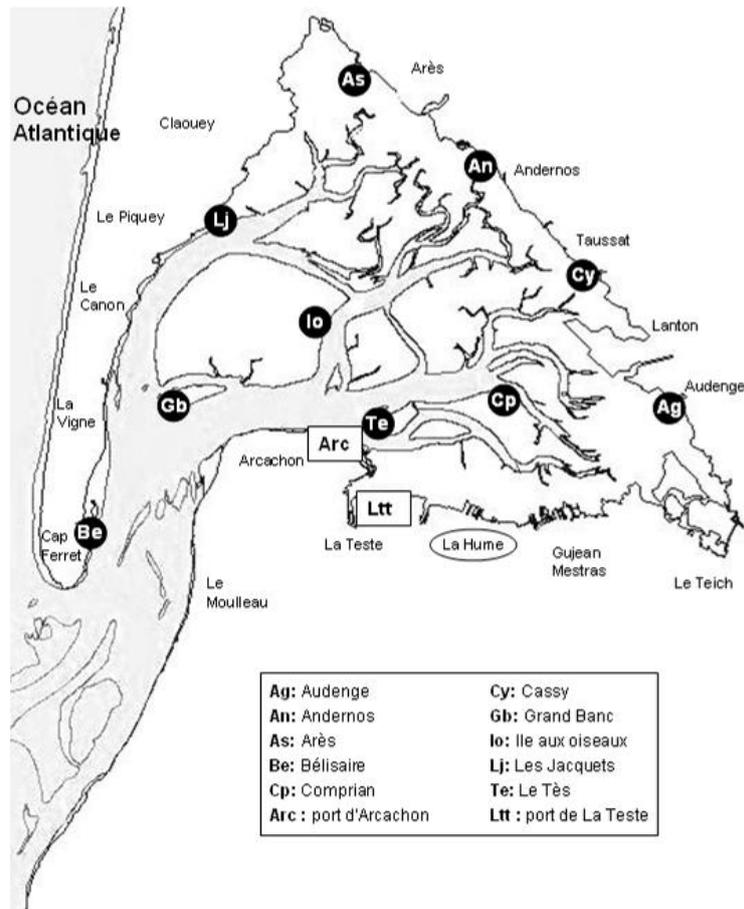


Figure 22. Carte des prélèvements du Bassin d'Arcachon (adaptée de l'Ifremer).

Toujours sur le Bassin d'Arcachon, une eau de rivière a également été utilisée pour l'étude des interactions avec les HAP. L'échantillon prélevé provient du canal de La Hume, au sud du Bassin d'Arcachon (Figure 22). L'échantillon était assez concentré en COD ($> 10 \text{ mg.L}^{-1}$) car le prélèvement a été effectué juste après la tempête de janvier 2009 et le lessivage des sols a certainement entraîné beaucoup de MOD d'origine terrestre dans le milieu aquatique. La caractérisation de cet échantillon ainsi que ses interactions avec les HAP sont décrites dans l'article n°4.

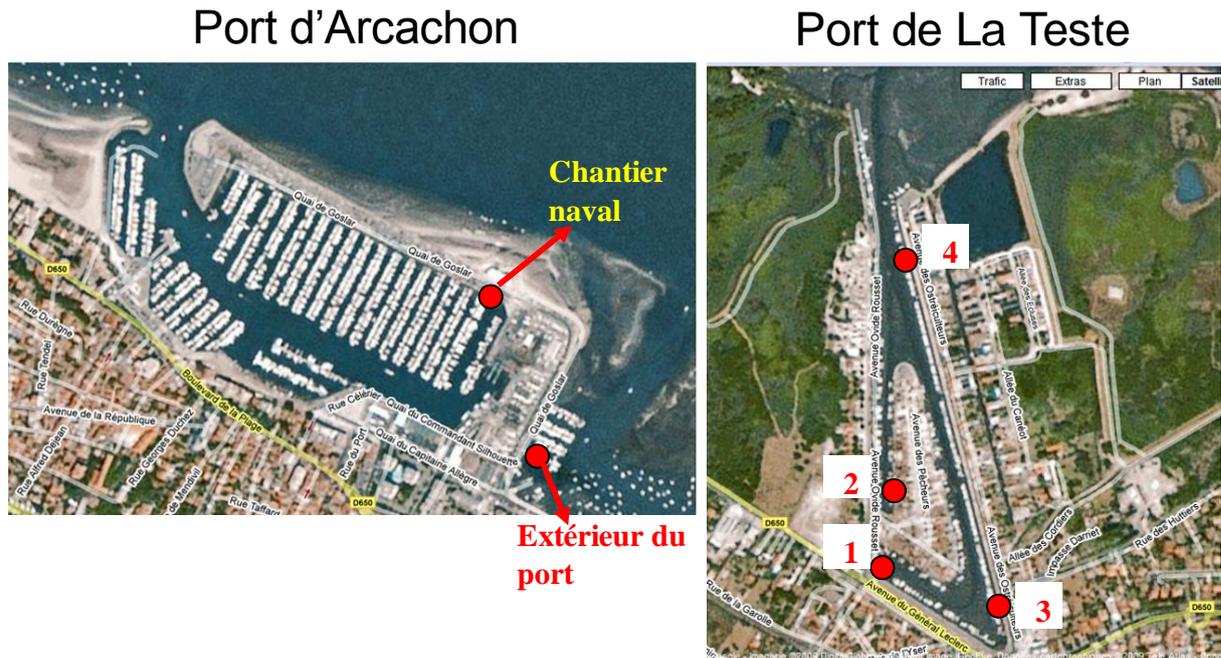


Figure 23. Carte des prélèvements dans les ports d'Arcachon et de La Teste.

IV.3. La MOD issue de culture algale

Les interactions HAP-MOD ont également été étudiées en présence de MOD issue de culture algale. En effet, la production de MOD autochtone par le phytoplancton étant majoritaire en milieu aquatique, il nous a paru intéressant d'utiliser cette MOD d'origine algale pour l'étude des interactions. C'est ainsi le moyen d'avoir des échantillons composés majoritairement de MOD récente (non ou peu humifiée) et suffisamment concentrés en COD, ce qui est très difficile à trouver dans un milieu naturel. En effet, à l'approche des océans où la composante autochtone domine sur la composante terrestre de la MOD, l'effet de dilution est tel qu'il est très difficile d'avoir des concentrations en COD supérieures à quelques mg.L^{-1} .

Des échantillons d'algues ont été prélevés à la station de l'Ifremer de La Tremblade puis filtrés au laboratoire pour enlever les algues et ne garder que la phase dissoute ($< 0,7 \mu\text{m}$). Les micro-algues étudiées étaient de type *Isochrysis galbana* (Tableau 8). Ces micro-algues sont cultivées en éclosérie et servent à l'alimentation des larves de bivalves d'intérêt commercial. Dans le milieu naturel, ces algues sont à la base de l'alimentation du zooplancton, des poissons et des bivalves. La croissance des algues se caractérise par une phase de croissance exponentielle, puis une phase stationnaire et enfin une phase de décroissance (dégradation) sachant que les échantillons prélevés étaient tous en phase de croissance exponentielle (Robert et His 1987). La culture utilisée n'était pas en milieu stérile donc il est possible qu'une partie de la MOD ait une origine bactérienne.

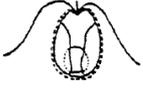
Forme schématique		
Classe	Haptophycée	
Durée de la phase de croissance exponentielle	Environ 11 jours	
Couleur	jaune	
Taille moyenne	4,5 μm	

Tableau 8. Caractéristiques des micro-algues *Isochrysis galbana* (Robert et His 1987).

Les interactions avec les HAP de cette MOD algale ainsi que de l'acide humique Aldrich et de l'eau de rivière ont été étudiées au moyen des plans d'expériences pour décrire les effets des paramètres physico-chimiques sur ces interactions. Les résultats obtenus font l'objet de l'article n°4.

V. Plans d'expériences

L'étude de l'effet de différents facteurs environnementaux sur les interactions HAP-MOD a été réalisée grâce aux plans d'expériences. Habituellement, lors de l'étude de plusieurs facteurs sur la réponse d'un système, il est généralement conseillé de ne faire varier que ce facteur en veillant à garder tous les autres constants et ensuite, par le biais d'autres expériences, de faire varier les autres facteurs chacun leur tour. Cette façon de procéder permet d'être sûr de l'effet qui est responsable de la réponse observée mais si l'étude nécessite un nombre important de facteurs, le nombre d'expériences nécessaires peut vite devenir considérable. D'autre part, l'effet d'un facteur gardé constant peut modifier l'effet du facteur qui varie et ainsi fausser les résultats. C'est pour cela que les plans d'expériences sont très utiles et de plus en plus utilisés dans tous les secteurs d'activité. Cette méthodologie est basée sur des outils mathématiques et statistiques pour proposer les meilleures expérimentations possibles dans le but de rechercher et d'étudier des facteurs influents. Les objectifs principaux de ces méthodes sont la réalisation d'un minimum d'expériences (économie de coût et de temps) avec la meilleure précision possible sur les résultats. Le principe pour y parvenir est de faire varier les niveaux de tous les facteurs à la fois pour chaque expérience, mais de manière raisonnée. Il est ainsi possible de diminuer le nombre d'expériences tout en étudiant un nombre de facteurs important, de détecter les interactions entre les facteurs, d'obtenir de meilleures précisions sur les résultats et de les modéliser (Goupy 1988).

Dans cette étude (cf publication n°4), nous avons choisi d'étudier quatre facteurs majeurs (cf chapitre 1 – paragraphe IV.1.1.2.4.) - la salinité, le pH, la concentration en COD et la concentration en HAP – et leurs effets sur les interactions HAP-MOD ; la réponse observée est donc la valeur du K_{DOC} pour chaque HAP et chaque expérience. Le domaine expérimental observé a été choisi pour être le plus représentatif possible des conditions environnementales mais avec des concentrations en HAP permettant leur quantification par SPME-GC-MS. Nous avons donc fait varier la salinité de 0 à 30 (pour mimer une eau douce et une eau de mer), le pH de 5 à 9 (valeurs de pH extrêmes dans le milieu

naturel), la concentration en HAP de 100 à 1000 ng.L⁻¹ (chacun) et la concentration en COD d'environ 1 à 15 ou 30 mg.L⁻¹. Les concentrations en HAP sont assez élevées par rapport aux concentrations environnementales usuelles et permettent ainsi d'observer un bon signal aux plus fortes concentrations en MOD pour les HAP ayant le plus d'interactions. Un facteur de 10 entre la plus faible et la plus forte concentration en HAP permet cependant d'observer les effets sur une gamme assez importante. Les concentrations en COD sont très variables dans l'environnement et ont été choisies de façon à ce que la plus faible concentration en COD permette de mettre en évidence des interactions et que la plus forte concentration permette l'étude sur une gamme assez importante.

Des plans d'expériences du 1^{er} degré ont été utilisés car ceux-ci permettent de traiter environ 80 % des problèmes et peuvent être aisément complétés par quelques expériences pour obtenir des plans du 2nd degré si nécessaire. Les plans du 1^{er} degré sont basés sur l'hypothèse de linéarité de l'effet des facteurs sur la gamme de variation étudiée. On peut ainsi étudier un facteur en définissant son niveau bas (plus petite valeur possible) et son niveau haut (valeur maximale du facteur) et en supposant qu'entre les deux niveaux la variation est linéaire, sachant que cette linéarité peut aisément être vérifiée par l'ajout de points intermédiaires judicieusement choisis. Nous avons donc choisi d'utiliser un plan factoriel complet à deux niveaux et quatre facteurs, noté 2⁴, puisque seules 2⁴, soit 16 expériences sont nécessaires. La stratégie des plans factoriels complets consiste à choisir les points aux extrémités du domaine expérimental. La matrice des essais peut ainsi être établie (Tableau 9).

Numéro de l'essai	Facteur 1 salinité	Facteur 2 pH	Facteur 3 [HAP]	Facteur 4 [COD]	K _{DOC} (Ace)	K _{DOC} (Acy)...
1	-1	-1	-1	-1	Y ₁	Y' ₁
2	+1	-1	-1	-1	Y ₂	Y' ₂
3	-1	+1	-1	-1	Y ₃	Y' ₃
4	+1	+1	-1	-1	Y ₄	Y' ₄
5	-1	-1	+1	-1	Y ₅	Y' ₅
6	+1	-1	+1	-1	Y ₆	Y' ₆
7	-1	+1	+1	-1	Y ₇	Y' ₇
8	+1	+1	+1	-1	Y ₈	Y' ₈
9	-1	-1	-1	+1	Y ₉	Y' ₉
10	+1	-1	-1	+1	Y ₁₀	Y' ₁₀
11	-1	+1	-1	+1	Y ₁₁	Y' ₁₁
12	+1	+1	-1	+1	Y ₁₂	Y' ₁₂
13	-1	-1	+1	+1	Y ₁₃	Y' ₁₃
14	+1	-1	+1	+1	Y ₁₄	Y' ₁₄
15	-1	+1	+1	+1	Y ₁₅	Y' ₁₅
16	+1	+1	+1	+1	Y ₁₆	Y' ₁₆

Niveau -1	0	5	100	1
Niveau +1	30	9	1000	12

Tableau 9. Matrice des essais du plan factoriel complet 2⁴.

Cette matrice permet de quantifier les valeurs des effets de chaque facteur (E_{facteur}) par la somme des réponses de chaque essai affectées des signes + ou – de la colonne qui est attribuée au facteur étudié normalisée par le nombre de réponses. Par exemple, pour l'acénaphthène (Ace) la valeur de l'effet moyen de la salinité est donnée par :

$$E_{\text{salinitéAce}} = \frac{1}{16}(-Y_1 + Y_2 - Y_3 + Y_4 - Y_5 + Y_6 - Y_7 + Y_8 - Y_9 + Y_{10} - Y_{11} + Y_{12} - Y_{13} + Y_{14} - Y_{15} + Y_{16})$$

Il est également possible de calculer la moyenne des réponses par l'introduction d'une colonne avec uniquement des +1 et, de la même façon, l'introduction de colonnes interactions permet de quantifier les interactions entre les facteurs. Les signes de ces colonnes sont obtenus par multiplication des +1 et -1 des facteurs considérés pour chaque essai. Ainsi la matrice des effets obtenue permet le calcul des interactions entre 2, 3 ou 4 facteurs. Les interactions sont notées 12, 13, 123, etc pour les interactions entre les facteurs 1 et 2, 1 et 3, 1 et 2 et 3, etc (Tableau 10). Par exemple, pour l'acénaphthène (Ace), l'effet des interactions entre la salinité et le pH est donné par la relation suivante :

$$E_{12,Ace} = \frac{1}{16}(+Y_1 - Y_2 - Y_3 + Y_4 + Y_5 - Y_6 - Y_7 + Y_8 + Y_9 - Y_{10} - Y_{11} + Y_{12} + Y_{13} - Y_{14} - Y_{15} + Y_{16})$$

Numéro de l'essai	Moyenne	Interaction	Interaction	Interaction	Interaction	Interaction	Interaction
		12	13	14	23	24	34
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1
5	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
7	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
9	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1
11	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
13	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
15	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Diviseurs	16	16	16	16	16	16	16
-----------	----	----	----	----	----	----	----

Effets	E_{moyen}	E_{12}	E_{13}	E_{14}	E_{23}	E_{24}	E_{34}
--------	--------------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

Tableau 10. Matrice des essais du plan factoriel complet 2^4 , seules les interactions d'ordre 2 sont représentées.

Pour diminuer encore plus le nombre d'expériences, il est possible d'utiliser les plans factoriels fractionnaires. Dans notre cas, nous avons utilisé un plan 2^{4-1} , qui revient à faire 8 essais. Les plans factoriels fractionnaires sont dérivés des plans complets mais avec une hypothèse supplémentaire qui est que les interactions de troisième ordre ou supérieur entre les facteurs sont négligeables. Ainsi pour passer d'un plan complet 2^4 à un plan fractionnaire 2^{4-1} , la colonne de l'interaction d'ordre plus élevé (ici interaction 123) devient la colonne du quatrième facteur. Ici, nous avons décidé que le facteur concentration en COD serait donc attribué à la colonne interaction 123, sachant que ce choix de facteur est sans effet sur les résultats puisque l'attribution de cette colonne à un autre facteur reviendrait uniquement à changer le numéro de l'expérience. On dit alors que le facteur concentration en COD est aliasé. Le plan factoriel est donc réécrit en partant de trois facteurs (plan complet 2^3) avec la colonne interaction 123 correspondant au quatrième facteur (Tableau 11). On peut d'ailleurs remarquer que ce plan fractionnaire est en fait composé des essais 1, 4, 6, 7, 10, 11, 13 et 16 du plan complet 2^4 . Les autres essais forment le plan fractionnaire complémentaire et donc faire deux plans fractionnaires 2^{4-1} revient à faire un plan complet 2^4 . On peut donc effectuer un premier plan fractionnaire et en cas de doute effectuer son plan complémentaire pour confirmer les résultats.

Numéro de l'essai	Facteur 1 salinité	Facteur 2 pH	Facteur 3 [HAP]	Interaction 12	Interaction 13	Interaction 23	Interaction 123 [COD]
1'	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
2'	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
3'	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
4'	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
5'	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
6'	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
7'	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
8'	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Tableau 11. Matrice des essais d'un plan fractionnaire 2^{4-1} .

Afin de vérifier l'hypothèse de linéarité des effets des facteurs, des essais correspondants aux points centraux ont été effectués ; ainsi une valeur de 0 (en valeur centrée réduite) pour tous les facteurs a été utilisée, soit une salinité de 15, un pH de 7, une concentration en HAP d'environ 550 ng.L^{-1} et une concentration en COD d'environ 7 mg.L^{-1} . Si les valeurs expérimentales des points centraux correspondent aux valeurs théoriquement calculées à partir du plan factoriel, c'est que l'hypothèse de linéarité est vérifiée. En outre, ces essais ont été réalisés en quintuplât afin d'établir la variabilité de l'analyse et injectés intercalés dans les 8 essais afin d'établir si une dérive de l'appareil ou des échantillons a pu intervenir entre le début et la fin de l'analyse de tous les échantillons.

Une fois tous les effets calculés, il est nécessaire de définir ceux qui sont significatifs pour déduire les facteurs influents et les interactions entre les facteurs. Pour cela, il est nécessaire de connaître l'erreur ΔE commise sur la valeur de l'effet, que l'on calcule grâce aux statistiques et aux points centraux. Pour ces points, il s'agit dans un premier temps de calculer la variance (s^2) sur les valeurs de K_{DOC} pour les 5 points obtenus :

$$s^2 = \frac{\sum(K_{\text{DOC},i} - K_{\text{DOC},M})^2}{n-1} \quad (2.35)$$

avec $K_{\text{DOC},M}$ la valeur moyenne du K_{DOC} , $K_{\text{DOC},i}$ la valeur du K_{DOC} pour le point central i et n le nombre de points centraux.

L'intervalle de confiance est décrit par :

$$\Delta E = t_{0,975} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (2.36)$$

avec $t_{0,975} = 2,776$ pour 4 degrés de liberté d'après la loi de Student.

Les seuls effets à considérer sont ceux dont la valeur absolue $|E|$ est supérieure à ΔE .

On remarquera que l'utilisation dans les plans factoriels de +1 et -1 pour la définition des niveaux hauts et bas implique ici l'utilisation de valeurs dites centrées réduites. Les valeurs

expérimentales ne pouvant en pratique être exactement égales aux valeurs théoriques et donc équivalentes à des -1 ou +1, un logiciel de traitement de données pour les plans d'expériences, Modde 5.0 (Umetrics), a été utilisé. Celui-ci permet l'introduction directe des valeurs expérimentales et les corrections matricielles nécessaires sont faites automatiquement.

Chapitre 3 : articles

Ce chapitre regroupe les principaux résultats sous forme d'articles en français ou en anglais. Ils sont ici précédés d'un résumé en français.

Les deux premiers articles reprennent le développement de la micro-extraction sur phase solide (SPME) appliquée au dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en solution aqueuse. Le premier est écrit en français et le second, en anglais. Il s'agissait de comparer les résultats avec deux autres techniques plus couramment utilisées pour l'extraction d'eaux naturelles : l'extraction liquide-liquide et l'extraction sur phase solide. Ces techniques d'extraction ont été utilisées en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse, simple ou en tandem. Les développements analytiques effectués ont pu être validés grâce au dosage d'une eau ultrapure supplémentée en HAP puis appliqués à des eaux de matrice chargée d'intérêt environnemental.

Les articles suivants s'intéressent plus particulièrement aux interactions entre les contaminants organiques et la matière organique dissoute (MOD). Le troisième article s'intéresse aux interactions des HAP avec la MOD. Elles ont été étudiées grâce à trois techniques qui ont dû faire l'objet d'un développement analytique préliminaire. La SPME-GC-MS, l'extinction de fluorescence et la dialyse ont ainsi dû être optimisées pour l'application à l'analyse de la spéciation des HAP en présence de MOD. Dans cet article, les interactions ont été étudiées en présence d'acide humique commercial et de un ou plusieurs HAP. On a pu ainsi comparer les valeurs des coefficients de partition eau-MOD (K_{DOC}) pour les HAP obtenus par les différentes techniques et en présence de différents mélanges de HAP et de MOD.

Le quatrième article reprend les résultats de l'étude des facteurs physico-chimiques influençant les interactions HAP-MOD. Les interactions ont été étudiées avec de l'acide humique Aldrich, une eau de rivière et de la MOD d'origine algale. Les valeurs des K_{DOC} ont été calculées par SPME-GC-MS et la spectrofluorimétrie tridimensionnelle et l'absorption UV-visible ont été utilisées pour la caractérisation de la MOD.

Le cinquième article est l'application de la SPME-GC-MS à l'étude des interactions entre les HAP et la MOD d'eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon.

Le dernier article s'intéresse aux interactions entre les substances pharmaceutiques et la MOD. Ces interactions ont été étudiées pour des benzodiazépines en présence de MOD commerciale et naturelles par SPME-GC-MS et par extinction de fluorescence.

Intérêt de la micro-extraction sur phase solide couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux

Chloé de Perre, Alexia Crespo, Ninette Abou Mrad, Karyn Le Ménach, Farouk Jaber, Édith Parlanti,
Hélène Budzinski

Résumé

La micro-extraction sur phase solide (SPME) a été étudiée dans le but d'améliorer les techniques de dosage conventionnelles généralement utilisées pour l'analyse des HAP dans les eaux (extractions liquide-liquide ou sur phase solide). Cette technique a été développée puis appliquée à l'analyse de matrices complexes telles que des eaux de station d'épuration. Ceci a permis de mettre en évidence les nombreux avantages de la SPME ; elle permet notamment une analyse rapide, performante et à faible coût des HAP dissous dans différents échantillons aqueux. Cette technique semble donc très prometteuse pour des suivis environnementaux.

I. Introduction

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) forment une grande classe de composés organiques qui peuvent présenter de fortes toxicités (mutagènes, cancérigènes ; figure 1).

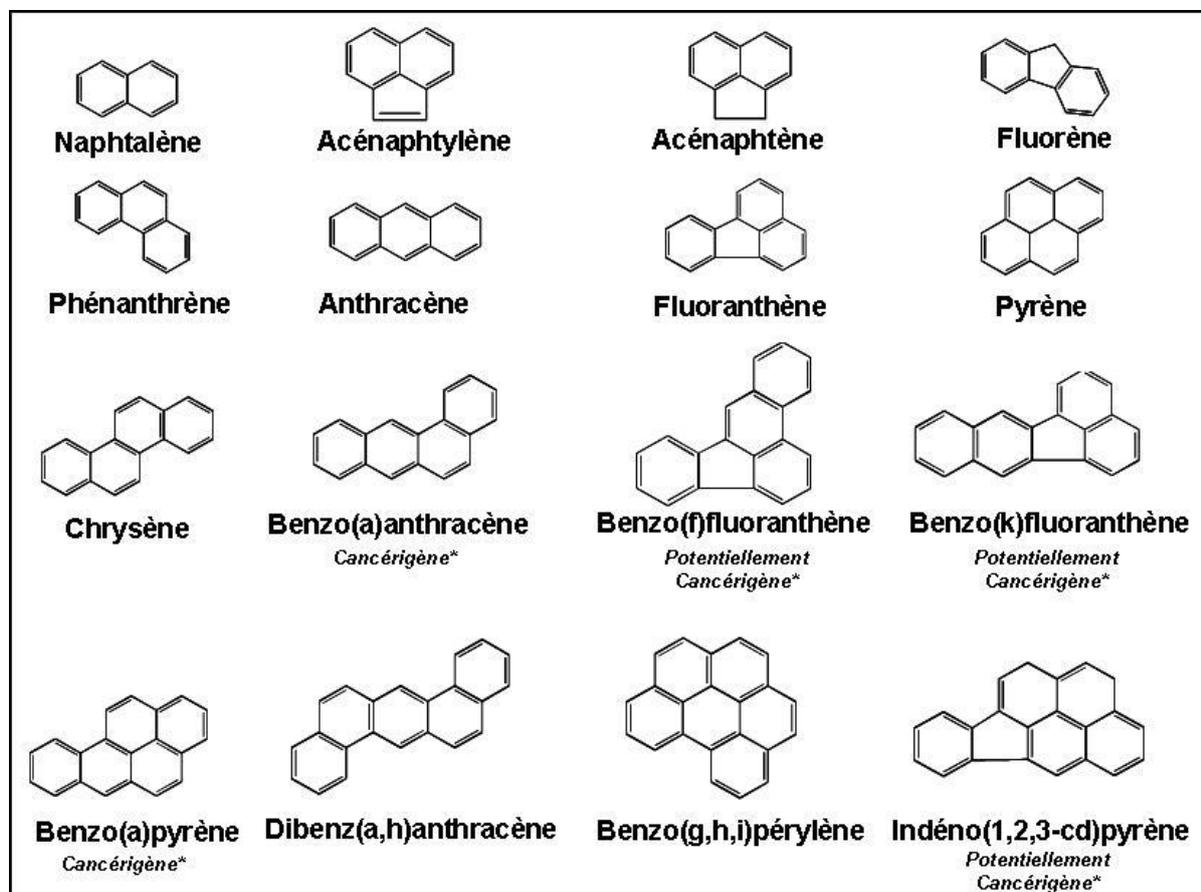


Figure 1. Les 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques listés comme substances prioritaires par l'union européenne et l'agence américaine de l'environnement. (*Selon la classification de l'Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer).

Ils sont issus de la lente maturation de la matière organique dans le milieu sédimentaire profond (pétrole) et de la combustion incomplète de la matière organique (gaz d'échappements, feux de forêt) ; ils sont présents de manière ubiquiste dans les différents compartiments environnementaux (eaux, sédiments, sols, atmosphère, biota). Ce sont des molécules hydrophobes qui sont donc généralement présentes à l'état de traces (de l'ordre du ng.L^{-1}) dans les eaux naturelles (1). Leur biodisponibilité via la phase dissoute peut s'avérer toutefois préoccupante, notamment pour les organismes filtreurs (1). L'analyse de ces composés à l'état de traces dans les eaux requiert ainsi des techniques fiables et sensibles. Les HAP contenus dans les échantillons sont généralement extraits de la matrice aqueuse par les techniques dites d'« extraction liquide-liquide » (LLE) et d'« extraction sur phase solide » (SPE) (figure 2) puis transférés vers des solvants organiques afin de pouvoir être dosés au moyen d'appareillages analytiques tels que les couplages chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (GC-MS).

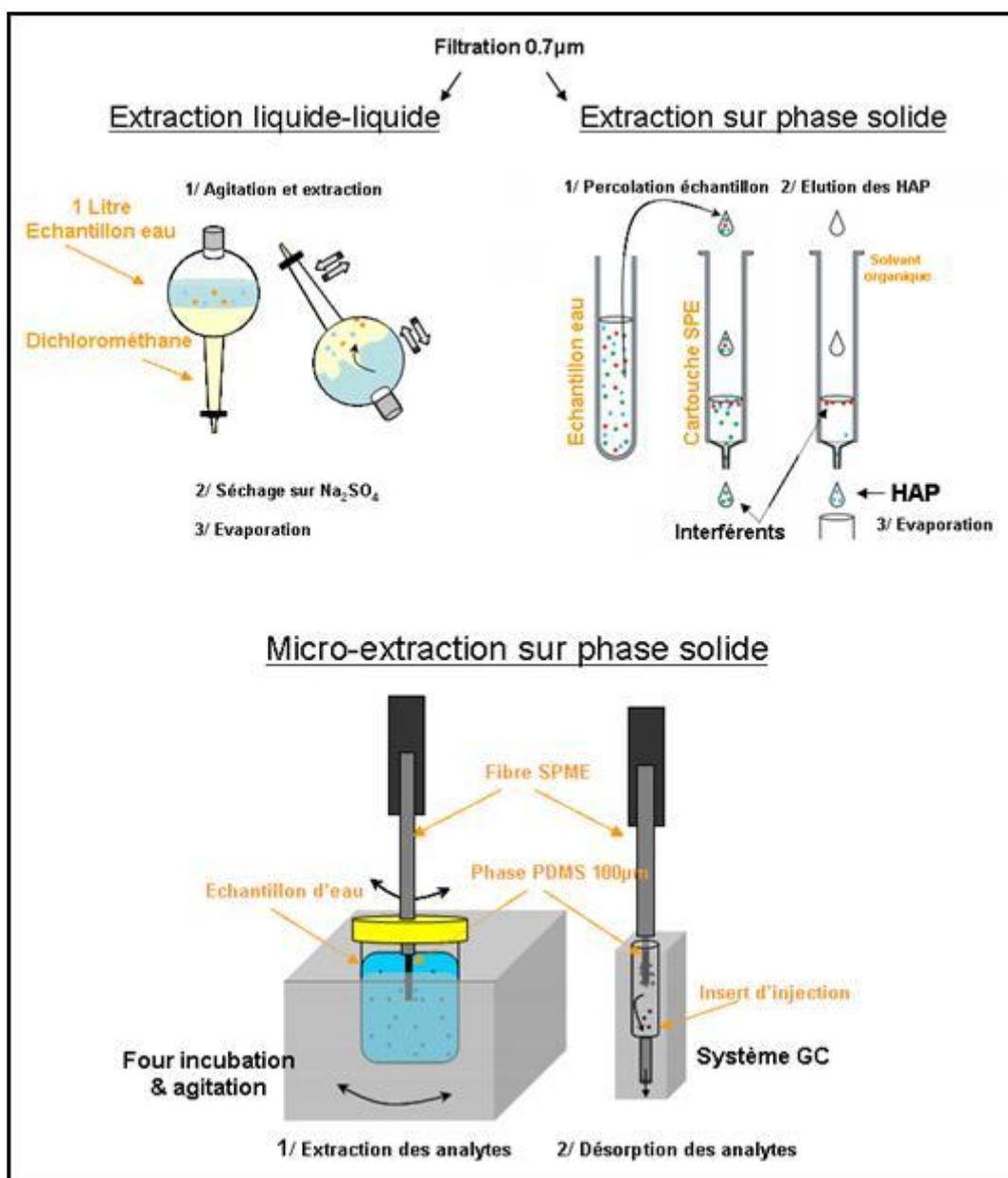


Figure 2. Vue d'ensemble sur les différentes techniques d'extraction des HAP contenus dans des eaux.

Malgré leurs sensibilités satisfaisantes, ces techniques présentent des limites lorsqu'elles sont utilisées en routine dans le cadre de suivis environnementaux à haute fréquence : manipulations relativement lourdes et délicates, nombre d'échantillons limités, consommation importante de solvants organiques... Janusz Pawliszyn (Université de Waterloo, Canada) a développé au début des années 1990 la technique de micro-extraction sur phase solide (SPME) qui permet de réduire la durée et le coût de l'analyse et de gagner en fiabilité de manière significative en combinant l'extraction, la concentration, et l'injection dans un chromatographe en un processus unique et automatisé (figure 2). Cette technique consiste à immerger dans un échantillon une fibre de silice fondue enrobée d'un polymère, opération au cours de laquelle les analytes vont se distribuer entre la fibre et l'échantillon par adsorption et/ou absorption (2). La fibre est ensuite retirée de l'échantillon et introduite dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse (GC), dans lequel les analytes sont désorbés

thermiquement et entraînés vers la colonne chromatographique. De nos jours, il existe de nombreuses sortes de fibres (différentes natures et épaisseurs de polymères, différentes gauges de seringue...), permettant ainsi une meilleure sélectivité et sensibilité des analytes recherchés. Cependant, une phase d'optimisation de la technique s'avère nécessaire pour déterminer les meilleurs paramètres d'extraction (fibre, insert d'injection du chromatographe, température et temps d'extraction, couplage GC et spectromètres de masse simple (MS) et en tandem (MS/MS)).

Les travaux reportés ici mettent en évidence l'intérêt de la SPME et de son couplage aux systèmes GC-MS et GC-MS/MS, pour l'analyse des eaux, et notamment pour l'analyse de matrices complexes telles que des eaux de station d'épuration.

II. Matériels et méthodes

1. Instrumentation : micro-extraction sur phase solide

L'extraction des HAP par SPME se fait généralement avec des fibres en polydiméthylsiloxane (PDMS) et en polydiméthylsiloxane-divinylbenzène (PDMS-DVB) (3,4). Les revêtements absorbants (type PDMS) sont des polymères liquides, où les analytes se répartissent à l'intérieur et à l'extérieur. Les revêtements adsorbants (type DVB) sont généralement poreux et retiennent les analytes soit par interactions avec la surface (grâce à des interactions π - π par exemple), soit par piégeage dans les pores (2). Ces deux types de phase (PDMS 100 μ m, PDMS-DVB 65 μ m) ont été étudiés afin de déterminer la fibre la plus performante pour l'analyse des HAP ; un troisième revêtement combinant l'absorbance de la phase Carbowax[®], qui est habituellement employée pour l'analyse des molécules hydrophiles, à l'adsorbance des phases DVB a été testé afin de comparer les pouvoirs d'absorption/adsorption entre les différents revêtements. Les fibres PDMS 100 μ m ont été testées avec deux épaisseurs d'aiguilles (gauges 23 et 24). Les fibres de gauge 23 sont les plus épaisses et sont utilisées avec un système d'injection sans septum pour éviter l'entraînement de morceaux de septum lors de la pénétration dans l'injecteur du GC. Toutes les fibres ont été achetées chez Supelco et sont employées en mode automatique grâce à un CTC Combi PAL associé au GC-MS/MS.

2. Instrumentation : système chromatographique et spectromètre de masse

La séparation et la quantification des HAP ont été effectuées à l'aide d'un système chromatographe en phase gazeuse / spectromètre de masse Agilent 6890N / Quattro micro Waters Micromass équipé d'une colonne HP-5MSI constituée d'une phase 5 % phényl- 95 % méthylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm d.i. ; 0,25 μ m de phase ; Agilent technologies), soumise à un débit constant d'hélium (1,3 mL.min⁻¹, pureté 6.0 ; Linde Gas Aquitaine). Une rampe de température du four a été programmée à chaque analyse afin d'obtenir une bonne séparation de la plupart des HAP en une durée relativement courte (25 minutes) : 60 °C pendant 2 min, augmentation à 150 °C à une vitesse de 20 °C.min⁻¹ jusqu'à 150 °C, augmentation jusqu'à 250 °C à 15 °C.min⁻¹ et

augmentation jusqu'à 310 °C à 10 °C.min⁻¹ et maintien à 310 °C pendant 3 min. Au niveau de l'injecteur, deux sortes d'insert ont été testées : un insert spécialement conçu pour la SPME (d.e. 6,5 mm, d.i. 0,75 mm, Supelco ; Bellefonte, USA) et un insert classiquement utilisé pour l'injection liquide en GC (d.e. 6,5 mm, d.i. 4 mm, Gooseneck Splitless, siltek désactivé, Restek; Lisses, France). L'influence de différentes températures d'injecteur (250 °C / 270 °C) sur la sensibilité de la technique a été testée. Le spectromètre de masse a été utilisé en ionisation électronique (70 eV) en modes SIR (Selected Ion Recording) et MRM (Multiple Reaction Monitoring). Les ions m/z recherchés sont ceux correspondants aux masses moléculaires des HAP natifs et deutérés en mode SIR. En mode MRM, un développement préalable en mode « daughter » (recherche d'ions fils majoritaires et des énergies de collision correspondantes) a permis de déterminer les meilleures transitions des ions précurseurs aux ions fils (Tableau I).

	Transition MRM	E_{coll} (eV)		Transition MRM	E_{coll} (eV)
Naphtalène	128>128	15	Naphtalène d8	136>136	10
	128>102	15		136>108	10
Acénaphthylène	152>152	20	Acénaphthylène d8	160>160	20
	152>151	21		160>158	15
Acénaphène	154>153	20	Acénaphène d10	164>162	10
	154>152	27		164>160	25
Fluorène	166>165	20	Fluorène d10	176>174	15
	166>164	35		176>172	25
Dibenzothiophène	184>184	14	Dibenzothiophène d8	192>192	15
	184>152	14			
Phénanthrène	178>178	14	Phénanthrène d10	188>188	18
	178>152	14		188>160	18
Anthracène	178>178	14	Anthracène d10	188>188	18
	178>152	14		188>160	18
Fluoranthène	202>202	20	Fluoranthène d10	212>212	20
	202>200	20		212>208	27
Pyrène	202>202	20	Pyrène d10	212>212	20
	202>200	20		212>208	27
2,1Benzonaphthothiophène	234>234	20			
	234>202	25			
Benzo(a)Anthracène	228>228	20	Benzo(a)Anthracène d12	240>240	18
	228>226	23		240>236	18
Chrysène	228>228	20	Chrysène d12	240>240	18
	228>226	23		240>236	18
Benzo(b,k)Fluoranthène	252>252	25	Benzo(b)Fluoranthène d12	264>264	25
	252>250	30		264>260	25
Benzo(a)Fluoranthène	252>252	25			
	252>250	30			

Benzo(e)Pyrène	252>252	25	Benzo(e)Pyrène d12	264>264	25
	252>250	30		264>260	25
Benzo(a)Pyrène	252>252	25	Benzo(a)pyrène d12	264>264	25
	252>250	30		264>260	25
Pérylène	252>252	25	Pérylène d12	264>264	25
	252>250	30		264>260	25
Indéno(1,2,3-cd)Pyrène	276>276	25	Indéno(1,2,3-cd)Pyrène d12	288>288	25
	276>274	45		288>284	30
Benzo(g,h,i)Pérylène	276>276	25	Benzo(g,h,i)Pérylène d12	288>288	25
	276>274	45		288>284	30
Dibenzo(a,h)Anthracène	278>278	25	Dibenzo(a,h)Anthracène d14	292>292	25
	278>276	27		292>288	30

Tableau I. Transitions MRM et énergies de collision (E_{coll}) utilisées en GC-MS/MS.

3. Produits chimiques et échantillons

Des composés standards - cristaux de puretés comprises entre 97 et 99 % (21 composés natifs / 19 composés deutérés ; CIL, BCR, Aldrich ou Promochem), ont été utilisés pour préparer micro-gravimétriquement des solutions dans l'éthanol. La solution de HAP natifs a été utilisée pour enrichir de l'eau ultrapure à des concentrations désirées (entre 10 et 30 ng.L⁻¹) lors du développement de la méthode et lors des analyses en routine (contrôle qualité du bon état du système d'analyse). Les HAP sont quantifiés par la méthode de l'étalonnage interne grâce à l'ajout en quantité connue de la solution de HAP deutérés, ceux-ci ayant des comportements similaires à leurs homologues natifs. L'ensemble des solutions préparées est caractérisé et validé au moyen d'une solution de HAP certifiée (SRM2260a, NIST Gaithersburg, MA, USA).

Lors du développement de la méthode, des eaux enrichies en HAP à environ 50 ng.L⁻¹ ont été quantifiées en SPME, SPE et LLE. Le protocole de la SPE est le suivant : les cartouches (Bond Elut C18, 200 mg, 3 mL ; Varian) ont été nettoyées et conditionnées avec 2 × 3 mL de dichlorométhane, 3 mL d'éthanol et 2 × 3 mL d'eau ultrapure Milli-Q[®] (Millipore). Cent mL d'échantillon ont ensuite été élués et les cartouches ont été séchées sous vide pendant une heure. L'éluion des composés a été effectuée avec 3 × 3 mL de dichlorométhane. Pour la LLE, 30 mL d'échantillon ont été extraits avec 3 × 5 mL de dichlorométhane puis le séchage s'est fait sur Na₂SO₄ (Fluka). Les extraits organiques SPE et LLE ont été évaporés sous flux d'azote et les échantillons ont été repris dans une centaine de microlitres d'isooctane avant d'être injectés en GC-MS. Pour les deux techniques, des étalons internes sont ajoutés lors de l'extraction pour la quantification des HAP et deux autres HAP deutérés sont ajoutés avant l'injection en GC pour quantifier les rendements de la manipulation dans son ensemble (le volume final avant injection est inférieur à 200 µL).

L'application aux échantillons a été réalisée sur des matrices complexes (charge importante en matières et contaminants organiques/inorganiques, en interférents divers, microorganismes...) provenant d'une station d'épuration. Les échantillons ont été filtrés sur filtre GF/F (0,7µm ; Whatman) au laboratoire puis 10 mL de chaque échantillon ont été transférés et pesés dans des flacons SPME. 20 µL de solution d'étalons internes ont ensuite été ajoutés. Avant chaque série d'échantillons, des flacons d'eau ultrapure enrichie en HAP natifs et HAP deutérés en concentrations connues sont extraits afin de déterminer les coefficients de réponse du système SPME-GC-MS (ou MS/MS) entre les HAP et leurs deutérés nécessaires à la quantification des HAP dans les échantillons.

III. Résultats et discussion

1. Développement analytique

En premier lieu, il a fallu déterminer la fibre la plus appropriée. Pour cela, les limites de détection ont été calculées pour des eaux enrichies en HAP avec les différentes fibres (figure 3).

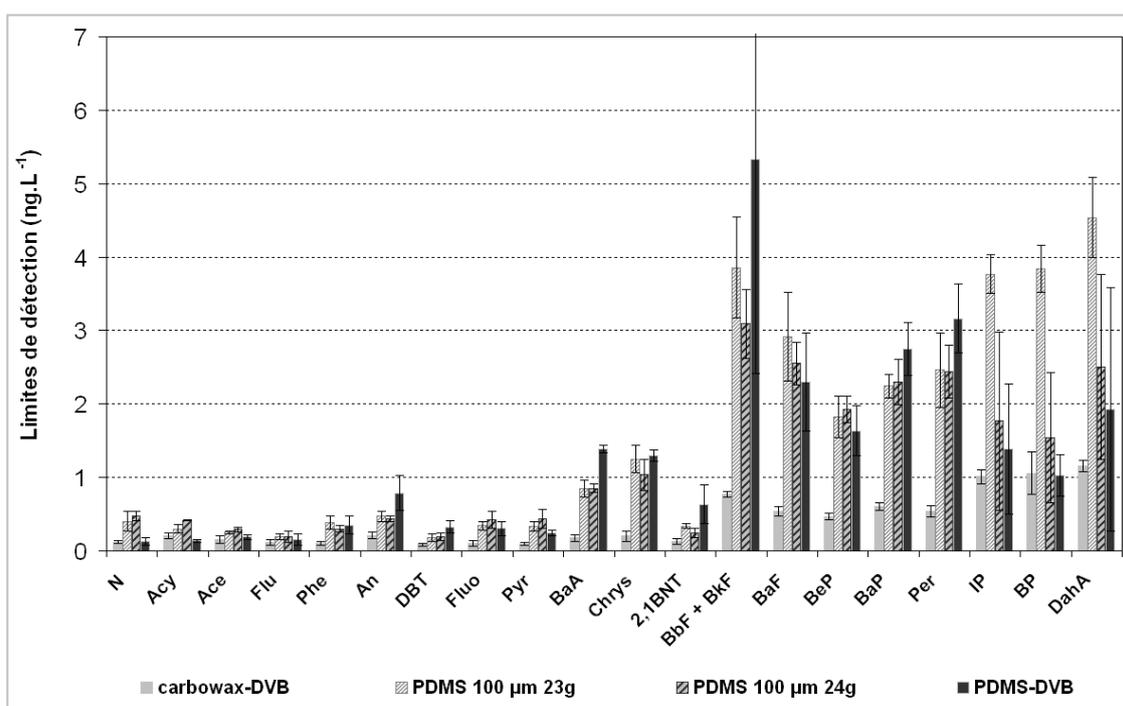


Figure 3. Comparaison des limites de détection obtenues pour différentes fibres.

La fibre la plus sensible (limites de détection les plus faibles) est la carbowax-DVB. La PDMS-DVB présente une sensibilité équivalente pour les HAP légers mais les limites de détection des HAP au-delà du phénanthrène sont nettement plus importantes. La PDMS 100 µm a une sensibilité généralement intermédiaire. Il semblerait donc que le DVB facilite l'adsorption des HAP légers mais le carbowax semble meilleur que le PDMS pour les HAP les plus lourds. Cependant, les polymères poreux ne conviennent qu'à des matrices relativement propres avec des concentrations en analytes assez faibles pour éviter les phénomènes de compétition entre analytes. Un mélange complexe doit

préférentiellement être extrait à l'aide d'une phase absorbante (2). Pour les matrices complexes telles que les eaux de station d'épuration, il semble donc que le polymère PDMS (absorbant) soit le meilleur choix. Concernant l'épaisseur de l'aiguille, il n'y a pas de grandes différences entre les deux testées mais la fibre de gauge 23 est plus solide et sa variabilité est meilleure, ceci étant peut-être dû au fait que cette fibre est utilisée avec un injecteur sans septum qui permet d'améliorer le bruit de fond.

L'influence des autres paramètres d'extraction et de désorption a ensuite été déterminée en utilisant une fibre PDMS 100 μm 23g. Les paramètres optimums sont un temps d'extraction de 60 min à 40 °C, une température de désorption de 270 °C, un insert SPME et une analyse en mode SIR (figure 4).

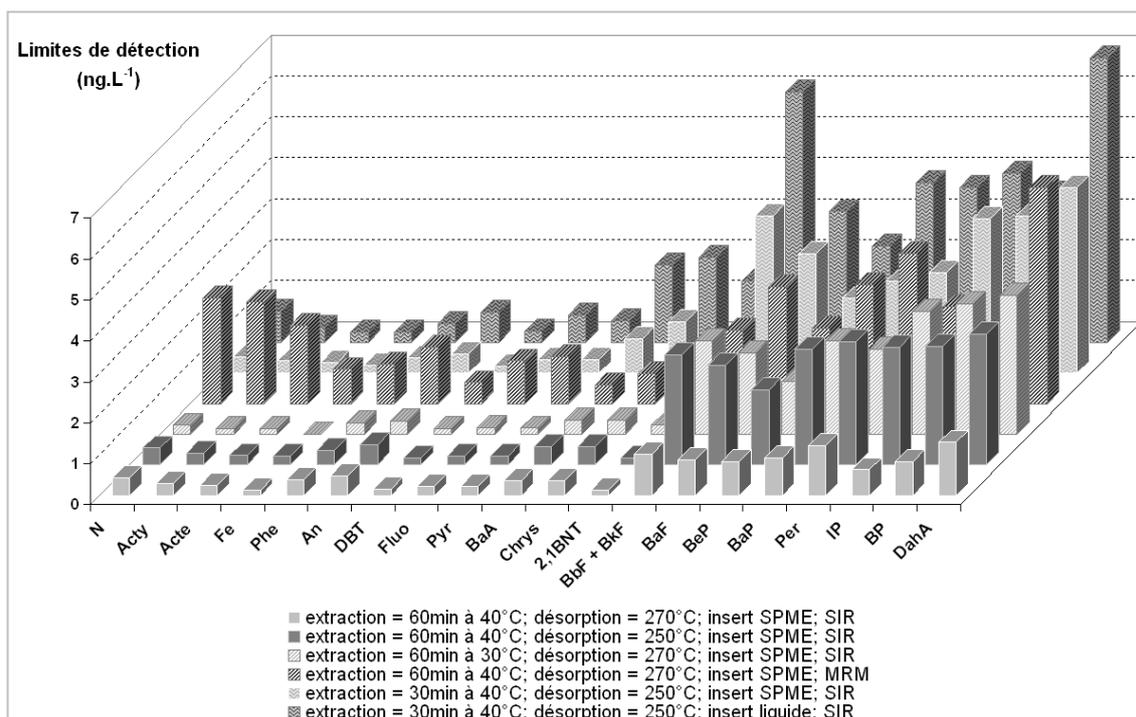


Figure 4. Limites de détection obtenues avec différents paramètres d'extraction, de désorption et d'analyse (fibre PDMS 100 μm 23g).

Dans ces conditions, les limites de détection sont de l'ordre ou inférieur au ng.L^{-1} , ce qui permet une quantification aisée de nombreux échantillons naturels et une analyse complète en 1h30 par échantillon. Certains paramètres comme la température d'extraction ou le type d'insert n'ont que peu d'effet sur l'analyse mais la température de l'injecteur peut jouer un grand rôle, notamment sur la désorption des HAP les plus lourds. Le mode MRM n'apporte pour ces composés, dans le cas d'une eau artificielle, aucune amélioration de la sensibilité mais pourrait apporter une sélectivité supplémentaire pour les matrices chargées. Lors de l'application aux échantillons, un insert liquide a été finalement utilisé car il permet un basculement aisé des modes injection liquide – SPME, ce qui permet de vérifier continuellement l'état du système GC-MS par l'injection d'une solution de référence en mode liquide.

Afin de valider l'outil et de déterminer sa justesse et sa répétabilité, un échantillon d'eau ultrapure a été analysé en triplicats par SPME (avec les paramètres optimums), SPE et LLE. De plus, la reproductibilité de la SPME a été testée par l'utilisation d'un deuxième système SPME-GC-MS (Agilent 6890 couplé à un spectromètre de masse 5972) dans les mêmes conditions d'injection, de chromatographie et d'analyse. La Figure 5 montre que la SPME permet une bonne quantification des eaux.

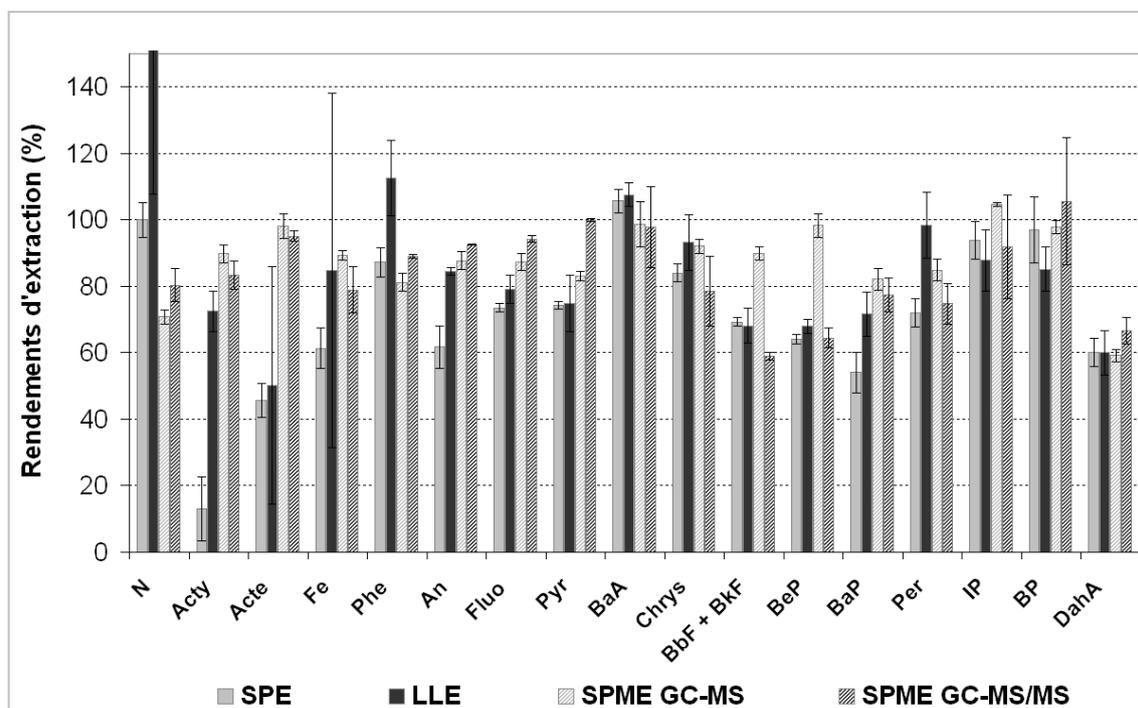


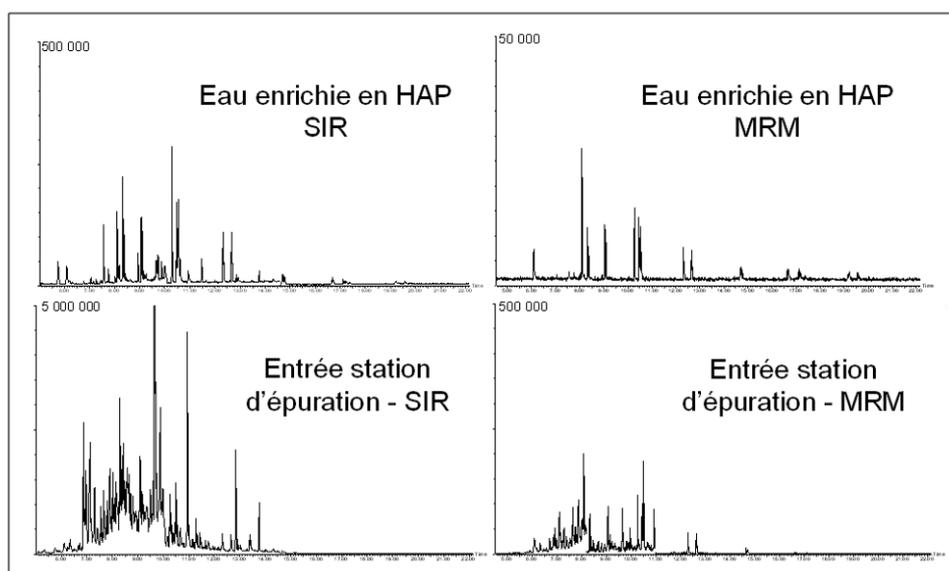
Figure 5. Comparaison des techniques d'extraction SPME, SPE et LLE des HAP en phase dissoute.

Les rendements moyens sur tous les HAP sont de 88 et 84 % pour la SPME (respectivement en mode MS et en mode MS/MS), contre 72 % pour la SPE et 81 % pour la LLE. La justesse de la SPME est donc légèrement supérieure à celle des deux autres techniques ; sa répétabilité est également excellente : 3 % de variabilité en mode MS et 6 % en mode MS/MS. Là où la SPME semble apporter un grand avantage par rapport aux deux autres techniques, c'est sur la quantification des HAP légers. En effet, par SPE et LLE, l'étape d'évaporation qui suit l'extraction est très délicate pour ces composés qui ont un faible point d'ébullition (naphtalène par exemple) ; elle introduit alors des pertes de composés sur certains échantillons et mène ainsi à une plus faible répétabilité. L'utilisation d'étalons internes permet théoriquement de pallier ce problème, mais si les pertes sont trop importantes, la quantification peut être faussée. De par la simplification des étapes lors de la SPME, la variabilité sur la quantification est alors inférieure à 5 %. D'autre part, l'utilisation d'un système SPME-GC-MS ou d'un autre n'entraîne pas de grandes différences pour la quantification des HAP, la technique semble donc assez reproductible.

2. Applications aux échantillons

Quatre échantillons d'une même station d'épuration ont été analysés par SPME-GC-MS et MS/MS en entrée et à différents points de la station. Du fait de l'excellente reproductibilité obtenue sur les eaux enrichies en HAP, les échantillons n'ont pas été analysés en triplicat. D'après les chromatogrammes obtenus (figure 6a), il semblerait que la SPME extrait une partie de la matrice mais qu'une partie de celle-ci est « éliminée » dans le mode MRM. En effet, le bruit de fond est beaucoup plus important dans les échantillons que dans les eaux enrichies en HAP, et dans les deux cas, il est plus faible en mode MRM qu'en mode SIR. Des interférents du naphthalène et du fluorène ont pu ainsi être éliminés en mode MRM dans l'échantillon d'entrée de station d'épuration (matrice la plus chargée), permettant d'identifier et de confirmer la présence de ces deux HAP (figure 6b). La présence de ces interférents a en outre entraîné la surestimation de la quantification du naphthalène lors de l'analyse en mode SIR (tableau II) ; l'analyse en mode MRM apporte ainsi une sélectivité et un gain de confiance supplémentaires dans le cas de cet échantillon. Cependant, ce dernier mode d'analyse ne peut être appliqué que sur des échantillons suffisamment concentrés en HAP car il est moins sensible que le mode SIR (tableaux II et III).

A)



B)

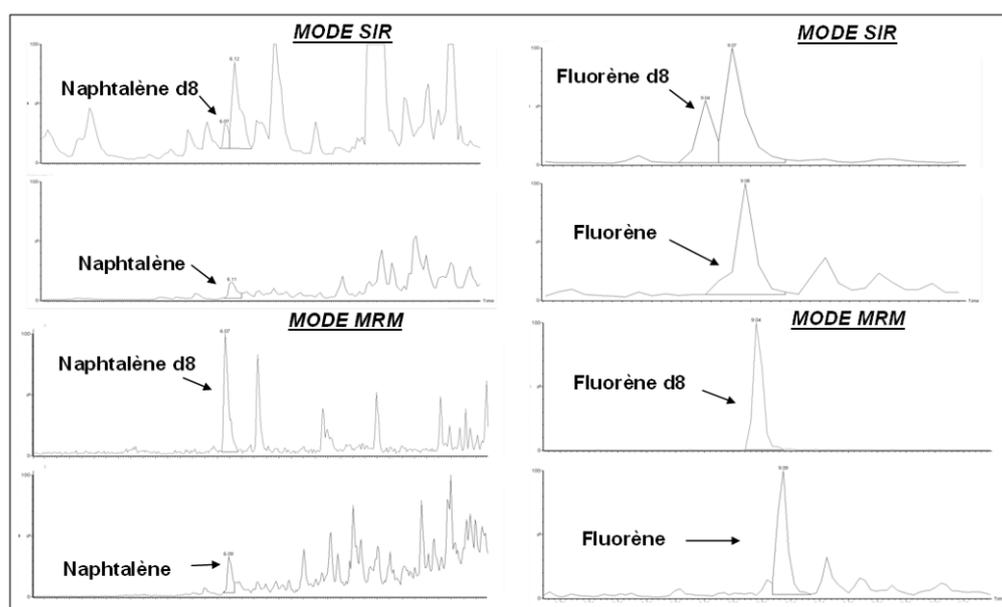


Figure 6. A) Chromatogrammes obtenus pour des eaux artificielles et naturelles par SPME-GC-MS et MS/MS.
B) Avantage du mode MRM par comparaison avec le mode SIM lors de la présence d'interférents

Limites de détection (ng.L ⁻¹)	entrée de station d'épuration		point interne 1		point interne 2		point interne 3	
	SIR	MRM	SIR	MRM	SIR	MRM	SIR	MRM
Naphtalène	Interférence	40	9	7	5	4	4	3
Acénaphthylène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acénaphthène	Interférence	7	3	nd	1	nd	1	nd
Fluorène	15	20	3	7	1	2	1	nd
Phénanthrène	20	30	7	6	3	3	2	2
Anthracène	1	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dibenzothiophène	3	2	1	nd	1	nd	nd	nd
Fluoranthène	6	5	2	3	1	1	1	nd
Pyrène	8	8	4	4	2	2	3	4
Benzo(a)anthracène	2	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chrysène	5	3	1	nd	2	nd	1	3
2,1 Benzonaphtothiophène	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(b,k)fluoranthène	8	6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(e)pyrène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(a)pyrène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pérylène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(g,h,i)pérylène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Indéno(1,2,3-cd)pérylène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dibenz(a,h)anthracène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd : non détecté

Tableau II. Quantification des eaux de station d'épuration par SPME GC-MS et SPME GC-MS/MS.

Limites de détection (ng.L ⁻¹)	eau ultrapure enrichie mode SIR	eau ultrapure enrichie mode MRM	eau station d'épuration mode SIR	eau station d'épuration mode MRM
Naphtalène Acénaphtylène Acénaphène Fluorène Phénanthrène Anthracène Dibenzothiophène Fluoranthène Pyrène	0,2-0,5	0,5-3	0,5-7	1-5
Benzo(a)anthracène Chrysène	0,5-0,9	0,5-0,7	3	6-8
Benzo(b,k)fluoranthène Benzo(e)pyrène Benzo(a)pyrène Pérylène Benzo(g,h,i)pérylène Indéno(1,2,3-cd)pérylène Dibenz(a,h)anthracène	0,1-1	2-6	5-42	19-46

Tableau III. Limites de détection par SPME GC-MS et SPME GC-MS/MS.

IV. Conclusion

Le développement de la SPME couplée à la GC-MS et à la MS/MS a permis de mettre en évidence l'intérêt de cette technique d'analyse des HAP dissous par rapport aux méthodologies conventionnelles. La simplicité de mise en œuvre, le gain de temps et le coût (facteurs 2 à 3) sont des avantages considérables dès lors que des suivis environnementaux haute fréquence sont envisagés (tableau IV). L'avantage de cette technique est également l'amélioration de la fiabilité de l'analyse ; réduire le nombre d'étapes de préparation permet d'abaisser les risques de contamination des échantillons ou de perte et dégradation de composés.

La SPME pouvant s'appliquer à différentes classes de composés organiques, elle semble devenir actuellement l'outil de choix pour le suivi ponctuel de la qualité des eaux d'environnements marins ou continentaux, des eaux destinées à la consommation, ainsi que des eaux à matrice complexe. Elle offre ainsi la perspective de pouvoir fournir une méthode d'extraction et d'analyse multi-résidus, ciblant de la sorte simultanément plusieurs classes de polluants organiques.

Estimations	LLE	SPE	SPME
Durée manipulation	8h pour 1-5 échantillons	6-8h pour 1-12 échantillons	< 5 min par échantillon
Nombre d'étapes de manipulation	6	6	1
Volume solvant	300 ml par échantillon	20 ml par échantillon	0
Durée analyse	1h	1h	2h
Materiel et appareillage	Verrerie spécifique Phase séchante Gaz Petit appareillage de laboratoire GC-MS	Petite verrerie Cartouches d'extraction Gaz Petit appareillage de laboratoire GC-MS	Petite verrerie Fibres d'extraction GC-MS
Coût total	+++	++	+

Tableau IV. Estimations des coûts et temps des différentes analyses.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier la région Aquitaine pour le soutien apporté aux travaux décrits dans cet article.

Bibliographie

- (1) **Neff, J.M.**, (1979) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the aquatic environment – sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers LTD, Essex, England, ISBN 0-85334-832-4.
- (2) **Lord, H. & Pawliszyn, J.**, (2000) Evolution of solid-phase microextraction technology (review), *Journal of Chromatography A* **885**, 153–193.
- (3) **Cam, D., Gagni, S., Lombardi, N. & Punin M.O.**, (2004) Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Solid Matrices, *Journal of Chromatographic Science* **42**, 329-335.
- (4) **Aguinaga N., Campillo N., Vinas P. & Hernandez-Cordoba M.**, (2007) Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* **596**, 285–290.

Analysis of PAH traces in water: development and application of off-line solid phase extraction and on-line solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry methodologies

Alexia Crespo, Chloé de Perre, Ninette Abou Mrad, Karyn Le Ménach, Edith Parlanti, Hélène Budzinski

Abstract

Solid phase extraction (SPE) and microextraction (SPME) were investigated in order to improve methodologies used for the monitoring of PAH contamination in waters. These methods were performed and applied in the case of marine waters, as well as in higher dissolved organic matter content waters. Both methodologies allow to perform accurate and sensitive (below and around ng per liter) analyses of dissolved PAHs, which is highly interesting when considering European quality benchmarks for drinking and environmental waters (2 - 2000 ng.L⁻¹; EU, 2005). Whereas the two methodologies present different advantages and limitations, SPME appears to be an easier, lower time- and solvent-consuming and cheaper tool. SPME presents a stronger robustness for di- to tetra-PAHs, but is limited for heavier PAHs that were better detected with SPE. Quantification *via* an internal standard procedure is essential for both methods. Environmental monitoring strategy based on spot sampling is not anymore limited by analytical capacities, and high frequency sampling may henceforth be performed. Moreover, no more filtration and other preparation would be necessary to achieve a good total PAH quantification in water, making SPME a promising tool.

Analyse des HAP traces dans l'eau : développement et application de l'extraction sur phase solide et de la micro-extraction sur phase solide couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse

Résumé

L'Extraction (SPE) et la Micro-Extraction sur Phase Solide (SPME) ont été développées dans le but d'améliorer les techniques utilisées pour la surveillance des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans les eaux naturelles. Ces méthodes ont été appliquées à des eaux marines ainsi qu'à des échantillons aqueux plus concentrés en matière organique dissoute. Ces deux techniques ont permis des mesures justes et sensibles (inférieures ou de l'ordre du ng.L^{-1}) des HAP dissous, ce qui est très intéressant étant donné les normes de qualité européennes pour les eaux potables et environnementales (2 - 2000 ng.L^{-1} ; UE, 2005). Alors que les deux techniques présentent des avantages et des inconvénients, la SPME est plus simple à mettre en œuvre, faible consommatrice de temps et de solvant et meilleure marché. La SPME présente une forte robustesse pour les HAP di- à tétra-aromatiques mais les HAP de plus hauts poids moléculaires sont plus aisément détectés par SPE. La quantification par étalonnage interne est essentielle pour les deux méthodes. De par ces outils, la stratégie de surveillance environnementale n'est plus limitée par les capacités d'analyse et l'échantillonnage à haute fréquence peut désormais être réalisé. En outre, la filtration ainsi que les autres préparations de l'échantillon pourraient ne plus être nécessaires pour atteindre un bon dosage des HAP totaux dans l'eau, faisant de la SPME un outil très prometteur.

I. Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are organic compounds constituted by at least two fused condensed rings coming from combustion processes as well as from petrogenic material input. They show toxic properties, and some of them have well-known carcinogen potency (benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene; International Agency for Cancer Research). PAHs are present in every environmental compartment from air, soil, sediment, water and biota. Their ubiquity and toxicity make them a class of pollutants declared as priority concern by the European Union and the United States Environmental Protection Agency (US-EPA). PAH physico-chemical properties can be summarized by their strong hydrophobicity and their low aqueous solubility, as well as by their relative high stability in natural environments. These properties show however some slight variations among the PAH class depending on their molecular weight. These physico-chemical properties dictate PAH presence and transfer in and through environmental compartments. PAHs are thus mainly present in solid phases rather than in an aqueous medium. They are generally present at trace levels (few ng per liter) in the dissolved phase of continental or marine water (Law et al., 1997; Fernandes et al., 1997; Maldonado et al., 1999; Mitra and Bianchi, 2003; Olivella, 2006); greater concentrations (about a hundred of ng to a hundred of μg per liter) have however been observed in extremely contaminated areas (Maskaoui et al., 2002; Luo et al., 2004). Although dissolved PAHs are at trace level in water, their monitoring in natural waters is needed since they represent part of the bioavailable fraction besides particulate PAHs for filtering marine organisms, and more particularly in low turbid biotope (Baumard et al., 1999). European water quality benchmarks for human consumption are 10 ng.L^{-1} for benzo(a)pyrene and 100 ng.L^{-1} for the other di- to hexa-aromatic PAHs (Directive 98/83/CE, 1998). European environmental quality standards are from 2 ng.L^{-1} for heavier PAHs to $1\ 200$ (marine coast) and $2\ 400$ (continental water) ng.L^{-1} for the lightest PAH naphthalene (EU, 2005). Environmental monitoring of dissolved PAH contamination requires thus sensitive and robust methodology.

Solvent extraction (also known as liquid-liquid extraction, LLE) is a widely used methodology consisting in transferring PAHs from water to an organic solvent thanks to agitation and mixing of both phases. Because of the greater affinity of PAHs for solvent than for water, the extraction is highly efficient, as well as robust. The interest of this methodology is however highly limited when considering the high solvent consumption, the heavy and non automatic manipulations, and the low number of samples that can be extracted in a series. Dissolved PAH environmental monitoring cannot thus be reasonably based on this methodology, and requires more efficient techniques in terms of management and minimizing costs. We have thus focused on off-line solid phase extraction (SPE) and on-line microextraction (SPME) techniques which were developed for the analyses of organics in water in the 80's and early 90's respectively (Junk and Richard, 1988; Arthur and Pawliszyn, 1990). The SPE principle is based on the water percolation through a cartridge filled with an appropriate sorbent on which PAHs are retained and concentrated. PAHs are then eluted with organic solvent, concentrated and analyzed thanks to various analytical instrumentations. The advantage of SPME is the possibility to perform the extraction on-line of the chromatographic apparatus. A fiber covered with

an appropriate sorbent is immersed into an aqueous sample and extracts PAHs from water under agitation and heating. PAHs are then usually desorbed from the fiber sorbent into the chromatograph injector, thermally when coupled with gas chromatography. In this study, SPE and SPME coupled with Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS) were investigated with the objective to get efficient tools for PAH environmental monitoring. Sensitivity and robustness are required criteria. Developments were undertaken thanks to spiked waters since no certified aqueous matrices are available. They were then applied and compared for the analysis of marine waters, as well as for more complex matrices (high dissolved organic matter (DOM) content). Analyses of non-filtered waters were also investigated with SPME in order to determine the ability to dose simultaneously dissolved and particulate PAHs, or at least to manage the determination of PAH concentration with the minimum of manipulation (no filtration). Environmental monitoring may also require to store samples temporarily, so that their storage conditions were optimized.

II. Experimental

II.1. Reagents

Di- to hexa-aromatic native PAHs (21) and perdeuterated PAHs (19) standard solutions were prepared by micro-gravimetric weighing (0.1 µg; Sartorius, Palaiseau, France) of crystals (Naphthalene (N): 99%, Aldrich; Acenaphthylene (Acty): > 99%, Aldrich; Acenaphthene (Acte): 99%, Aldrich; Fluorene (Fe): 99%, Aldrich; Dibenzothiophene (DBT): 99%, Acros organics; Phenanthrene (Phe): 98%, Aldrich; Anthracene (An): 98%, Labosi Fisher scientific; Fluoranthene (Fluo): 99%, Aldrich; Pyrene (Pyr): > 99%, Fluka; Benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene (2,1 BNT): 99%, Aldrich; Benzo(a)anthracene (BaA): 99%, Aldrich; Chrysene (Chrys): 98%, Aldrich; Benzo(b)fluoranthene (BbF): 99%, Aldrich; Benzo(k)fluoranthene (BkF): 98%, Aldrich; Benzo(a)fluoranthene (BaF): European Community Bureau of Reference BCR; Benzo(e)pyrene (BeP): 99%, Aldrich; Benzo(a)pyrene (BaP): 97%, Aldrich; Perylene (Per): > 99%, Aldrich; Indeno(1,2,3-cd)pyrene (IP): 99.3%, PAH research intitute; Benzo(g,h,i)perylene (BP): 99.7%, Promochem; Dibenz(a,h)anthracene (DahA): 97%, Aldrich, Fluka; N d8: > 98%, EGA-CHEMIE; Acty d8: 98%, Promochem CIL; Acte d8: 99%, Promochem CIL; Fe d10: 98%, Promochem CIL; DBT d8: 99%, MSD isotopes; Phe d10: 98%, Promochem CIL; An d10: 98%, Promochem CIL; Fluo d10: 99.2%, MSD isotopes; Pyr d10: 98%, MSD isotopes; BaA d12: 98%, Promochem CIL; Chrys d12: MSD isotopes; BbF d12: 98%, Promochem CIL; BeP d12: 98%, Promochem CIL; BaP d12: 98%, Promochem CIL; Per d12: 99.5%, MSD isotopes; IP d12: > 98%, Promochem CIL; BP d12: 98%, Promochem CIL; DahA d14: 98%, Promochem CIL). Crystals were dissolved in ethanol (HPLC reagent grade, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Spain) or isooctane (HPLC grade, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Spain) to have individual solutions of around 100 µg.g⁻¹, which were thereafter mixed and diluted with the appropriate solvent when required. All prepared standard solutions were characterized and validated thanks to certified native PAH solutions (SRM2260a in toluene, NIST Gaithersburg, MA, USA). Ultrapure water (Milli-Q®, Millipore, Molsheim, France) was used for SPE and SPME analytical developments.

PAHs were quantified with the internal standard (IS) method; each PAH was quantified with its perdeuterated homologue or with a perdeuterated isomer (Table 1). For SPME analyses, perdeuterated homologues were always used (except 2,1 BNT and BaF) in order to have similar behavior to the one of native compounds. In case of LLE and SPE, two additional perdeuterated PAHs (pyrene d10, benzo(b)fluoranthene d12) were added at the end of the protocol in order to evaluate recovery of internal standards. Response factors between PAHs and their internal standards were determined both at the beginning and at the end of the liquid or SPME analytical sequences thanks to internal standard and certified PAH solutions (diluted in isooctane for liquid injections and in water for SPME). The values of response factors ranged around 0.6 - 0.8 (margin error < 5%) for native compounds relatively to perdeuterated quantification standards, and around 1.0 for these latter relatively to recovery perdeuterated ones.

Native PAHs (quantification ions)	Perdeuterated standards (quantification ions)		
	SPE		SPME
	Quantification of Native PAHs	Recovery of internal standards	
<i>Solvent</i>	<i>Isooctane or ethanol</i>	<i>Isooctane</i>	<i>Ethanol</i>
N (128)	Nd8 (136)	Pyr d10 (212)	Nd8 (136)
Acty (152)	Phe d10 (188)	Pyr d10 (212)	Acty d8 (160)
Acte (154)	Phe d10 (188)	Pyr d10 (212)	Acte d8 (162)
Fe (166)	Phe d10 (188)	Pyr d10 (212)	Fe d10 (176)
DBT (184)	DBT d8 (192)	Pyr d10 (212)	DBT d8 (192)
Phe (178)	Phe d10 (188)	Pyr d10 (212)	Phe d10 (188)
An (178)	An d10 (188)	Pyr d10 (212)	An d10 (188)
Fluo (202)	Fluo d10 (212)	Pyr d10 (212)	Fluo d10 (212)
Pyr (202)	Fluo d10 (212)	Pyr d10 (212)	Pyr d10 (212)
2,1BNT (234)	Chrys d12 (240)	BbF d12 (264)	Chrys d12 (240)
BaA (228)	Chrys d12 (240)	BbF d12 (264)	BaA d12 (240)
Chrys+Triph (228)	Chrys d12 (240)	BbF d12 (264)	Chrys d12 (240)
B(b,j,k)F (252)	BeP d12 (264)	BbF d12 (264)	BbF d12 (264)
BaF (252)	BeP d12 (264)	BbF d12 (264)	BeP d12 (264)
BeP (252)	BeP d12 (264)	BbF d12 (264)	BeP d12 (264)
BaP (252)	BaP d12 (264)	BbF d12 (264)	BaP d12 (264)
Per (252)	BeP d12 (264)	BbF d12 (264)	Per d12 (264)
IP (276)	BP d12 (288)	BbF d12 (264)	IP d12 (288)
D(ah,ac)A (278)	BP d12 (288)	BbF d12 (264)	DahA d14 (292)
BP (276)	BP d12 (288)	BbF d12 (264)	BP d12 (288)

Table 1. Lists of perdeuterated PAHs used in SPE and SPME techniques (*m/z* are given for each compound).

II.2. Materials

High grade borosilicated glassware was used. All glassware was cleaned with alkaline detergent (Franklab, Saint Quentin en Yvelines, France), rinsed with acid (< 25% acetic acid; Franklab, Saint Quentin en Yvelines, France) and heated at 450 °C for 6 hours. Glassfiber filters were heated at 450 °C for 6 hours and then stored in aluminum paper before use. A blank sample was extracted for each series of LLE and SPE to check the contamination brought by the glassware and the laboratory environment; it was performed without extraction of ultrapure water. By SPME, blanks

were performed thanks to empty flasks which allow to verify the good desorption of the fiber and that no contamination occurs from one sample to the following one.

Analytical balances with a 0.1 mg precision (Sartorius, Palaiseau, France) were used, except for compound crystals (0.1 µg precision), and large volumes of water (> 0.5 L: 0.1 g precision; Sartorius, Palaiseau, France). Verification of the analytical balance calibration was achieved each week with standard weights (Mettler Toledo, Viroflay, France) and autocalibration are daily programmed.

II.3. Recovery experiments with spiked water

Ultrapure water was spiked with a native PAH solution (v/v 2‰ for SPME; 0.1‰ for SPE) in order to obtain concentrations ranging from 10 to 50 ng.L⁻¹ for recovery experiments of SPE and SPME methodologies, as well as for routine check. Spiked samples were then manually shaken, put into an ultrasonication bath for 5 minutes and shaken again in order to enhance solubilization of the ethanol solution and homogenization. A similar procedure was used to spike samples with perdeuterated internal standards for SPE and LLE methodologies. For SPME, samples were homogenized thanks to a vortex after the addition of internal standards.

II.4. Water sample preparation and conservation

Water samples were collected in three different environments – in a marine lagoon (Arcachon Bay, South West coast of France) that offered clean matrix samples, in a tributary of this lagoon (to have freshwater containing organic materials) and in a wastewater treatment plant that allowed to study complex matrices (high dissolved organic matter concentration, potential interferences...). The samples were filtered through GF/F glassfiber filters (0.7 µm; Whatman, Maidstone, England) on the day of the collection. SPE extractions were performed on the day after collection and were stored at 4 °C for the night before. For SPME, 10 mL of samples were weighted in SPME flasks (AlphaMOS, Toulouse, France) on the day of the collection and 20 µL of a perdeuterated PAH solution (7 ng.g⁻¹ of ethanol) were gravimetrically added at the same time. Non-filtered water was also extracted thanks to SPME.

In order to determine the allowed time between sampling and SPME analyses, conservation tests in a greater time scale were performed by SPME. Filtered and non-filtered natural and spiked marine waters were conditioned in SPME flasks and were stored for seven days at different conditions of temperature (22 °C/4 °C/-20 °C), with or without addition of methanol and formol (2‰) and with or without internal standards. The spiked marine waters were prepared by adding 80 µL of native PAH ethanol solution to 600 mL (v/v 0.1‰ ethanol) of each filtered or non-filtered water. Ten milliliters were then taken from spiked water bottles, transferred and weighted in SPME flasks; 20 µL of perdeuterated PAH solution were directly weighted in SPME samples (v/v 2‰ ethanol).

A comparative test between SPE and SPME was performed on a high dissolved organic carbon (DOC) and PAH concentration water. Four liters of high DOC (11.5 mg.L^{-1}) river water were spiked in a bottle with 80 μL of native PAHs (v/v 0.006‰). After dissolution steps, 250 mL were transferred into SPE bottles and SPME flasks where internal standards were added (80 μL , v/v 0.04‰ for SPE).

After standard solution (ethanol) addition, all spiked (native or deuterated PAH) samples were shaken, put into an ultrasonication bath for 5 minutes and shaken again (manually or with vortex for SPE and SPME samples respectively).

II.5. Off-line extraction procedures

For SPE, several cartridges were tested: C18 sorbent (200 mg/3 mL; Bond Elut C18, Varian, Les Ulis, France), C18 combined with NH_2 (PAH Aqua, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland) and ion exchange sorbent (Strata SAX 200 mg/3 mL, Phenomenex, Le Pecq, France). SPE C18 stationary phase was conditioned with sequential elutions of $2 \times 3 \text{ mL}$ of dichloromethane (Acros Organics, Geel, Belgium), $1 \times 3 \text{ mL}$ of methanol (Lichrosolv, Merck, Darmstadt, Germany) and $2 \times 3 \text{ mL}$ of ultrapure water. One liter of environmental samples was percolated through the sorbent thanks to polytetrafluoroethylene (PTFE) tubes at a flow rate of 10 mL.min^{-1} ; in the case of spiked water, 100 mL were extracted. C18 sorbents were then dried for one hour under vacuum in a manifold system (Supelco, Lyon, France) at 10 mmHg. PAH compounds were then desorbed with $3 \times 3 \text{ mL}$ of dichloromethane at a flow rate of 1 mL.min^{-1} . In order to quantify native PAHs, the addition of perdeuterated PAHs was tested either dissolved in ethanol and added directly to aqueous samples, or dissolved in isooctane and added to the organic elution fraction at the end of the extraction.

For LLE, 1L of environmental water or 30 mL of spiked water were extracted with $3 \times 80 \text{ mL}$ or $3 \times 5 \text{ mL}$ of dichloromethane respectively; the perdeuterated PAH solution was weighed in vials and then transferred into water samples before the extraction. Organic extracts were then dried with sodium sulfate anhydrous (Fluka, > 99.0%; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and concentrated using a rotary evaporator. Both SPE and LLE extracts were concentrated to 100 μL under a stream of nitrogen (purity 4.5, Lindegas, Saint-Priest, France) for spiked samples and of argon (purity 5.0 Lindegas, Toulouse, France) for environmental waters. The solution of recovery internal standards (pyrene d10 and benzo(b)fluoranthene d12) were then gravimetrically added to the extracts.

II.6. On-line solid phase microextraction

Solid phase microextractions were performed with absorbent 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS) fibers (Supelco, Bellefonte, USA) since it is recognized to be the most appropriate phase for PAH extraction (Cam et al., 2004; Aguinaga et al., 2007; De Perre et al., 2009 in preparation). Fibers of 23 gauge and a septum-less system injector (Merlin Microseal[®], Supelco, Bellefonte, USA) were

preferentially used since they were more resistant and allow to avoid septum coring through the gas chromatography injector (Pawliszyn and Pedersen-Bjergaard 2006). Microextractions were performed automatically with a Combipal (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) linked with gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Different time durations and extraction temperatures were compared in order to optimize the analysis of PAHs at trace concentrations in water. During analytical development, samples were analyzed in triplicates (three flasks, each extracted once) that were crossed throughout the sequence. Environmental samples were analyzed in triplicates for preliminary tests, and then, because of good reproducibility, just one sample (one extraction) was analyzed for routine use. As quantification is based on internal standard method and as SPME extracts only a few percent of the total analyte amount (Heringa and Hermens 2003), samples can be re-extracted if necessary; the sample re-extraction may however be limited if compounds are present at trace levels.

II.7. Gas chromatography-mass spectrometry instrumentation

Two GC-MS were used: a GC Agilent 6890 (Massy, France) coupled with a Quattro microTM Micromass® mass spectrometer (MS Technologies, Waters, Manchester, UK) and a GC Agilent 6890 (Massy, France) coupled with an Agilent 5972 mass selective detector, equipped respectively with an HP-5MSI and an HP-5MS column (5% phenyl- 95% methylpolysiloxane; 30 m × 0.25 mm i.d.; 0.25 µm sorbent; Agilent technologies, J&W Scientific, USA). A ramp of temperatures was programmed during GC run: 60 °C for 2 minutes, increase to 150 °C at 20 °C.min⁻¹, increase to 250 °C at 15 °C.min⁻¹, increase to 310 °C at 10 °C.min⁻¹ and 310 °C for 3 minutes. The carrier gas was helium (1.3 mL.min⁻¹, 6.0 grade; Lindegas, Toulouse, France) and the injector was in splitless mode; the purge flow to split vent was 60 mL.min⁻¹ after 1.5 min and the gas saver was set at 20 mL.min⁻¹ after 10 min. A specific SPME liner (e.d. 6.5 mm, i.d. 0.75 mm; Supelco, Bellefonte, USA) and a classical liner (e.d. 6,5 mm, i.d. 4 mm, Gooseneck splitless, SiltekTM deactivated, Restek, Lisses, France), as well as different injector temperatures (250 °C and 270 °C) were tested to improve PAH trace analysis. Both the mass spectrometers were used in electronic impact mode (energy of ionization of 70 eV) in SIR mode (Single Ion Recording); the MRM mode (Multiple Reaction Monitoring) was also tested for Quattro MicromassTM one in order to evaluate the benefit of tandem mass spectrometry in case of complex matrices. The MRM parameters are described in Table 2.

Control cards (reference standards in isooctane for liquid injection; spiked waters for SPME) were analyzed before and after liquid or SPME analysis sequences in order to control response factors and the sensitivity of the instrumentation.

	Transition MRM	Ecoll (eV)		Transition MRM	Ecoll (eV)
Naphthalene	128>128	15	Naphthalene d8	136>136	10
Acenaphthylene	152>152	20	Acenaphthylene d8	160>160	20
Acenaphthene	154>153	20	Acenaphthene d10	164>162	10
Fluorene	166>165	20	Fluorene d10	176>174	15
Dibenzothiophene	184>184	14	Dibenzothiophene d8	192>192	15
Phenanthrene	178>178	14	Phenanthrene d10	188>188	18
Anthracene	178>178	14	Anthracene d10	188>188	18
Fluoranthene	202>202	20	Fluoranthene d10	212>212	20
Pyrene	202>202	20	Pyrene d10	212>212	20
2,1Benzonaphthothiophene	234>234	20			
Benzo(a)Anthracene	228>228	20	Benzo(a)Anthracene d12	240>240	18
Chrysene	228>228	20	Chrysene d12	240>240	18
Benzo(b,k)Fluoranthene	252>252	25	Benzo(b)Fluoranthene d12	264>264	25
Benzo(a)Fluoranthene	252>252	25			
Benzo(e)Pyrene	252>252	25	Benzo(e)Pyrene d12	264>264	25
Benzo(a)Pyrene	252>252	25	Benzo(a)pyrene d12	264>264	25
Perylene	252>252	25	Perylene d12	264>264	25
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	276>276	25	Indeno(1,2,3-cd)Pyrene d12	288>288	25
Benzo(g,h,i)Perylene	276>276	25	Benzo(g,h,i)Perylene d12	288>288	25
Dibenzo(a,h)Anthracene	278>278	25	Dibenzo(a,h)Anthracene d14	292>292	25

Table 2. MRM parameters (*Ecoll*: collision energy).

III. Results and Discussion

III.1. Development of off-line SPE methodology in spiked ultrapure water

III.1.1. Recovery experiments with spiked ultrapure water: loss of heavy PAHs

Even though C18-bonded silica is not very selective sorbent, it has been shown to be efficient and thus is the most used for PAH extraction (Kiss et al., 1996; Urbe and Ruana, 1997; Marcé and Borrull, 2000; Li and Lee, 2001; Busetti et al., 2006). So these cartridges were used for the development of SPE, as well as dichloromethane, which is a good solvent of extraction of organic compounds, and especially for PAHs, frequently used in LLE and SPE methodologies (Kiss et al., 1996; Urbe and Ruana, 1997; Røe Utvik et al., 1999). LLE allowed to validate spiked water preparation since this extraction was shown to be accurate for the quantification of PAHs in aqueous samples (mean recoveries > 85%). Figure 1 shows native PAH recoveries for SPE protocol. Good recoveries (65-110%) are obtained for tri- to tetra-aromatic PAHs, except for acenaphthylene whose average recovery does not exceed 15%. Recoveries of naphthalene are highly variable through extraction series (0-70%); the sorbent drying and organic eluent evaporation are critical steps that may cause its loss due to its high volatility. Heavy compounds show lower recoveries (40-110%) and higher variability (10-55%) with SPE technique. Recent literature reports similar low recovery values for heavy PAHs extracted by SPE (Kiss et al., 1996; Urbe and Ruana, 1997; Marcé and Borrull, 2000;

Busetti et al., 2006). Their stronger hydrophobicity relative to low molecular weight PAHs seems to be responsible for their loss before and during extraction. Different tests were performed in order to assess the way of loss, and to improve the protocol; they are described in the following parts.

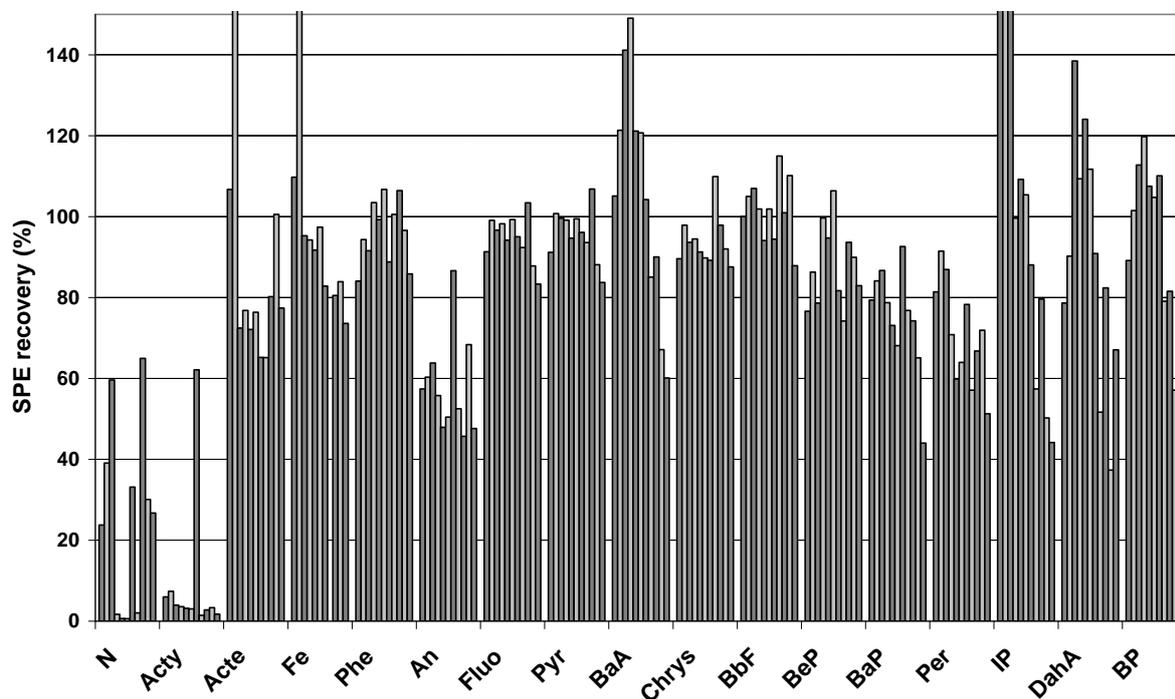


Figure 1. Native PAH recoveries for spiked ultrapure water extracted with SPE for various series of analyses. (the different symbols represent various series of analyses during several months)

III.1.2. Cause of acenaphthylene and heavy PAH losses

Penta- to hexa-aromatic PAHs are known to present a greater affinity for glass- and plastic-ware than for water (Busetti et al., 2006), and therefore they are ones of the most difficult compounds to extract by SPE. In order to underline the way of loss of heavy PAHs, as well as of acenaphthylene, different tests were done:

- The sorption efficiency on C18 was assessed by LLE re-extraction of SPE extracted water,
- The efficiency of the C18-sorbed PAH desorption step was evaluated by additional eluents (dichloromethane and other solvents),
- The PAH loss adsorbed on glass and/or tubes was quantified by rinsing bottle glass and PTFE percolation tubes with dichloromethane followed by a drying step with sodium sulfate anhydrous of the solvent eluent.

LLE extractions have shown that less than 5% of heavy PAHs are dosed in SPE extracted water and a change of SPE elution solvents (methanol, hexane, ethylacetate or toluene instead of dichloromethane; data not shown) or enhancing solvent volumes do not improve PAH desorption (Figure 2a). Adsorption on and desorption of PAHs from C18 sorbent are thus highly efficient. Around 25 to 45% of penta- and hexa-aromatic PAHs are however found adsorbed on bottle glass.

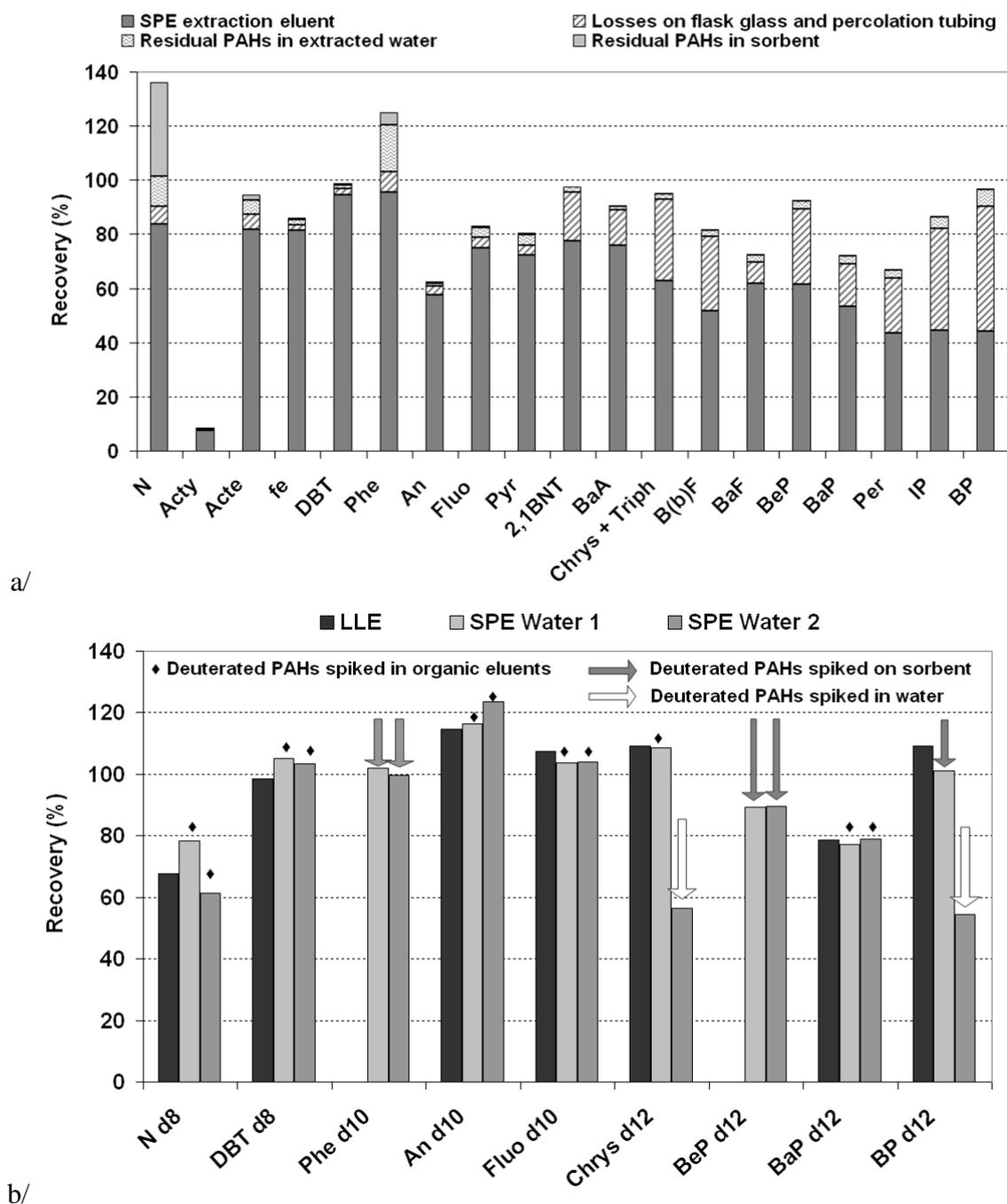


Figure 2. Losses of (a) native PAHs and (b) perdeuterated PAHs during solid phase extraction of spiked ultrapure water.

Losses of penta- and hexa-aromatic PAHs are clearly due to glass sorption, and not to the SPE efficiency itself. Heavy PAHs are generally well analyzed by LLE thanks to bottle rinsing with organic solvent, which allows to desorb all glass-adsorbed compounds. A similar practice cannot be performed in the SPE protocol, unless a sodium sulfate anhydride drying step of the solvent eluent is added. This experiment was performed and quantification was better for most of PAHs but not improved (for naphthalene and acenaphthylene) and even worse for other PAHs (phenanthrene, benzo(a)pyrene and indeno(1,2,3-cd)pyrene). Moreover, the interest of SPE methodology resides in its easy and reduced number of preparation steps that allow to limit hazardous contamination of the

samples as well as losses of compounds at each step. Therefore, this additional step was finally not performed in routine analyses.

These tests do not allow to determine the acenaphthylene way of loss. Acenaphthylene is present neither in glass surface nor in extracted water. No residual traces are found in sorbent after elutions. Acenaphthylene is however well-dosed with the LLE protocol. Moreover the lightest PAH (i.e. naphthalene) does not show a similar pattern, so evaporation of this compound cannot explain its entire loss. In the literature, acenaphthylene recoveries range however with those of naphthalene, acenaphthene and fluorene (Kiss et al., 1996; Li and Lee, 2001; Buseti et al., 2006; Werres et al., 2009). Similar losses of acenaphthylene were also sometimes observed in our laboratory during solid matrix extractions (assisted by microwave). It may be due to photodegradation during extraction since, contrary to the literature (Busetti et al., 2006), we did not use amber glassware during the extractions. A better quantification of acenaphthylene could have been achieved with the addition of perdeuterated acenaphthylene in samples, which might compensate for the loss. However, because of the loss, detection limits stay around ten-fold lower than for other PAH ones.

III.1.3. Avoiding heavy PAH underestimations: addition of organic modifier in water samples

Numerous studies have reported that adding organic modifier in water samples can allow to avoid the heavy PAH loss phenomenon (Kiss et al., 1996; Urbe and Ruana, 1997; Buseti et al., 2006); organic solvent may enhance solubility of hydrophobic PAHs and reduce their glass adsorption. Kiss et al. (1996) consider moreover the necessity to keep octadecyl chains of SPE sorbent activated. The type and amount of organic modifier should however be well chosen in order to limit breakthrough volume decrease for lighter compounds (Kiss et al., 1996). In our work, fractions of 5 and 10% of isopropanol (2-PrOH, Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) were added to water since this solvent has been reported to be efficient by Kiss et al. (1996) and Buseti et al. (2006). Losses due to glass/tube adsorption, as well as prematurely or lower desorption from the sorbent, were also evaluated for 2-PrOH supplemented water. Heavy PAHs are effectively better desorbed from bottle glass (residual traces on glass are < 10% with 10% 2-PrOH addition), whereas they are curiously not present at greater proportions neither in organic elution fraction nor in extracted water (Figure 3). Moreover, the effect of the addition of isopropanol is not so beneficial as expected: native PAH recoveries decrease from 45 to 30% with increasing proportions of solvent. PAHs desorbed from glass thanks to isopropanol are not found in the different parts/elements of the system. One can presume that glass-desorbed compounds may have not been sorbed on and may have been prematurely eluted from the C18 sorbent because of the 2-PrOH traces. However, the residual PAH amounts in extracted waters being at trace level, the differences between each case (with and without 2-PrOH) are not sufficiently high to be significant.

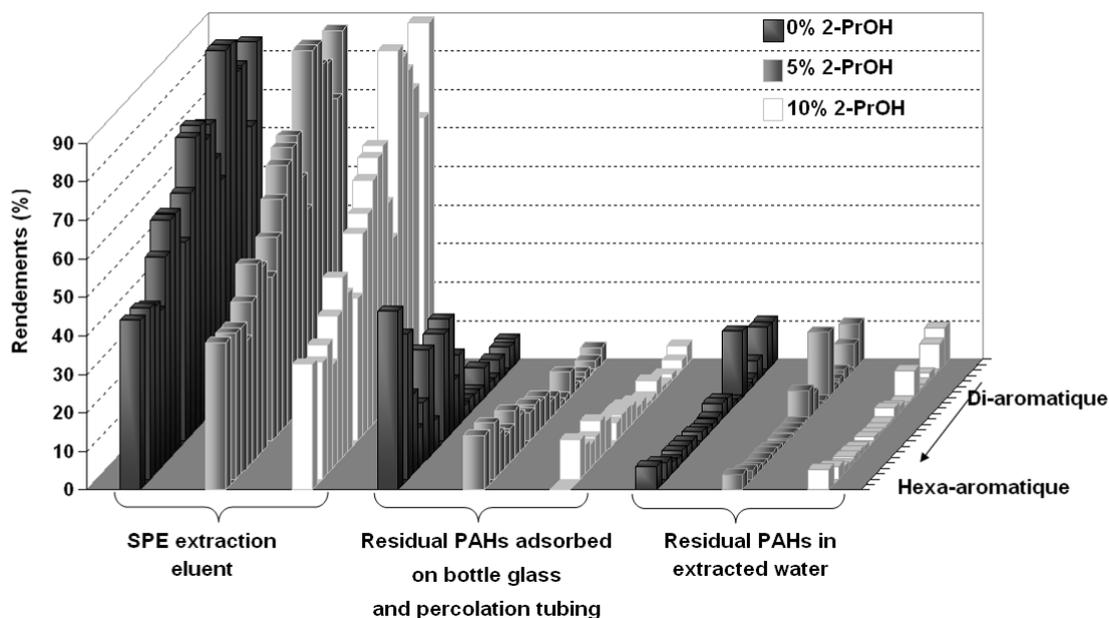


Figure 3. Effect of isopropanol addition to PAH spiked water.

III.1.4. Avoiding heavy PAH losses: addition of internal standards

When native and perdeuterated PAHs (9 internal standards; see Table 1) are added simultaneously to water, excellent recoveries (> 90%) for native PAHs (quantified with perdeuterated compounds) are obtained. The addition of internal standards in water seems thus to balance efficiently the sorption of bottle glass. Bercaru et al. (2006) observed similar improvement of native PAH quantification thanks to the addition of internal standards. We observed however an average 40% loss of heavy perdeuterated PAHs that were quantified with final step recovery standards (Table 1; Figure 2b). Native and perdeuterated compounds are thus lost simultaneously and the quantification of the native ones is correct.

III.2. Development of on-line SPME/GC-MS methodology in spiked ultrapure water

III.2.1. Optimization of extraction conditions

Several parameters need optimization to have a selective and sensitive SPME analysis. In order to determine the best parameters, the detection limits were compared with different extraction temperatures and times, desorption temperatures, liners... As regards extraction time, the longer it is, the better the sensitivity but the advantage of the rapidity is lost. The gain in sensitivity and repeatability from 30 min to 60 min of extraction was major, particularly for heavy PAHs which are less present in the dissolved phase. So an extraction time of 60 min was chosen which allows the quantification of one sample in 1h30 (1h for extraction – 30 min for desorption/analysis). The extraction temperature was also shown to modify sensitivity and repeatability which were improved at

40 °C in comparison with 30 °C (Figure 4a), so the first temperature was used. We did not try to exceed 40 °C not to evaporate the lightest PAHs.

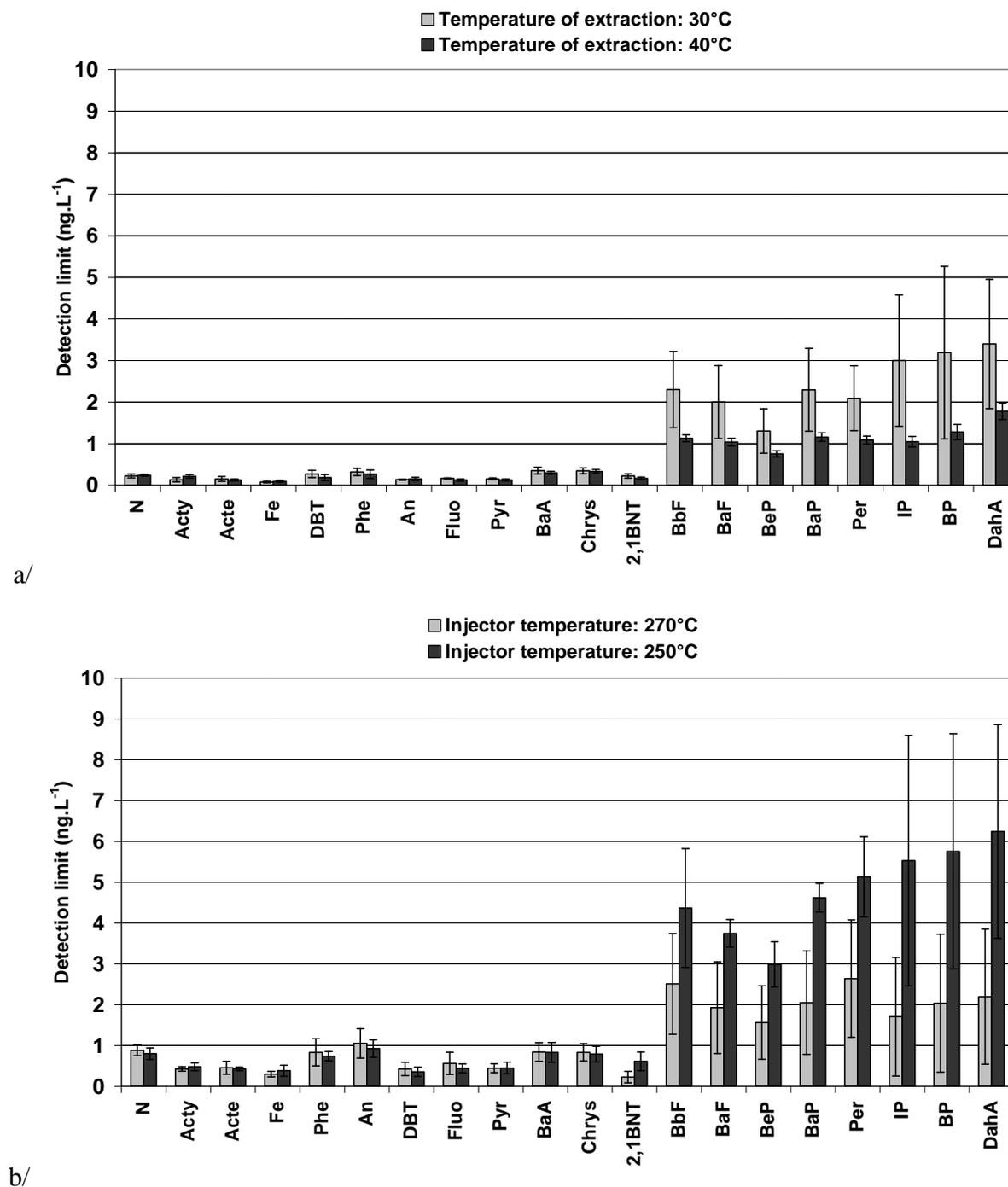


Figure 4. Optimization of temperature of a/ extraction and b/ desorption by SPME (n = 3).

a/ Conditions of analysis: PDMS 100 μm ; septum-less system injector; SPME liner; extraction time of 60 min, injector temperature of 250 °C.

b/ Conditions of analysis: PDMS 100 μm ; septum-less system injector; SPME liner; extraction time of 60 min, temperature extraction of 30 °C.

III.2.2. Optimization of desorption conditions

Once the optimization of extraction done, the parameters of the injector system were investigated. Even though desorption is a fast phenomenon (Lord and Pawliszyn 2000), the desorption time was programmed to be 30 min in order to condition the fiber between each sample. A conditioning temperature of 250 °C was advised by the supplier but desorption at 270 °C provided better efficiency (Figure 4b) so this temperature was used for conditioning and desorption. The shape of inserts can also affect the analysis; narrow inserts were advocated by authors (e.g. Lord and Pawliszyn 2000) but our tests did not show any improvement compared with splitless liners (results not shown). As liquid injections of control PAHs were performed before each SPME series to check the GC-MS system, classical liners were preferentially used in order to be able to do these liquid injections in the automatic mode.

III.2.3. Performance of SPME for spiked ultrapure water - comparison with LLE and SPE

Based on spiked ultrapure water, excellent sensitivities are achieved by LLE, SPE and SPME since detection limits are relatively homogeneous and $< 1 \text{ ng.L}^{-1}$ for di- to hexa-aromatic PAHs (analyzed in SIR mode; Table 3). These values are highly interesting since PAH concentrations in low impacted natural water generally range over a few ng per liter.

Spiked ultrapure water Detection limits (ng.L ⁻¹)	LLE & SIR mode	SPE & SIR mode	SPME & SIR mode	SPME & MRM mode
Naphthalene Acenaphthylene Acenaphthene Fluorene Phenanthrene Anthracene Dibenzothiophene Fluoranthene Pyrene	0.1 – 3	0.2 – 2	0.2 - 0.5	0.5 - 3
Benzo(a)anthracene Chrysene	0.2 - 0.3	0.1 - 0.2	0.5 - 0.9	0.5 - 0.7
Benzo(b,k)fluoranthene Benzo(e)pyrene Benzo(a)pyrene Perylene Benzo(g,h,i)perylene Indeno(1,2,3-cd)perylene Dibenz(a,h)anthracene	0.2 - 0.7	0.3 - 0.8	0.1 - 1	2 - 6

a/

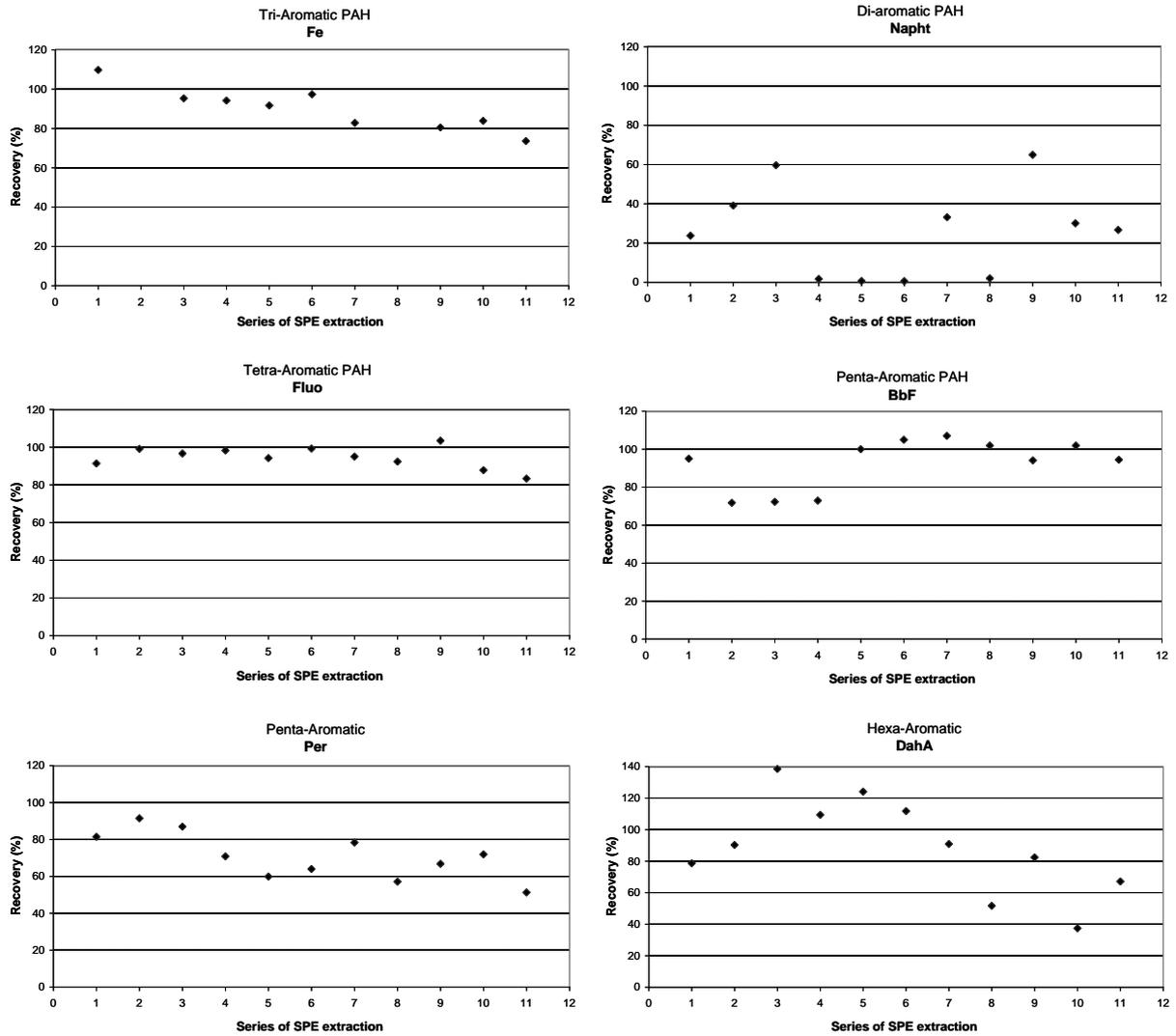
Natural waters Detection limits (ng.L ⁻¹)	Marine water SPE & SIR mode	Marine water SPME & SIR mode	River water SPE & SIR mode	River water SPME & SIR mode	Wastewater SPME & SIR mode	Wastewater SPME & MRM mode
Naphthalene Acenaphthylene Acenaphthene Fluorene Phenanthrene Anthracene Dibenzothiophene Fluoranthene Pyrene	0.1 - 0.8	0.2 - 0.5	0.1-0.7	0.1	0,5-7	1-5
Benzo(a)anthracene Chrysene	0.2 – 0.3	0.5 - 1	0.2	0.5 - 1	3	6-8
Benzo(b,k)fluoranthene Benzo(e)pyrene Benzo(a)pyrene Perylene Benzo(g,h,i)perylene Indeno(1,2,3-cd)perylene Dibenz(a,h)anthracene	0.3 - 0.5	0.5 - 1	0.2-0.4	0.5 - 1	5-42	19-46

b/

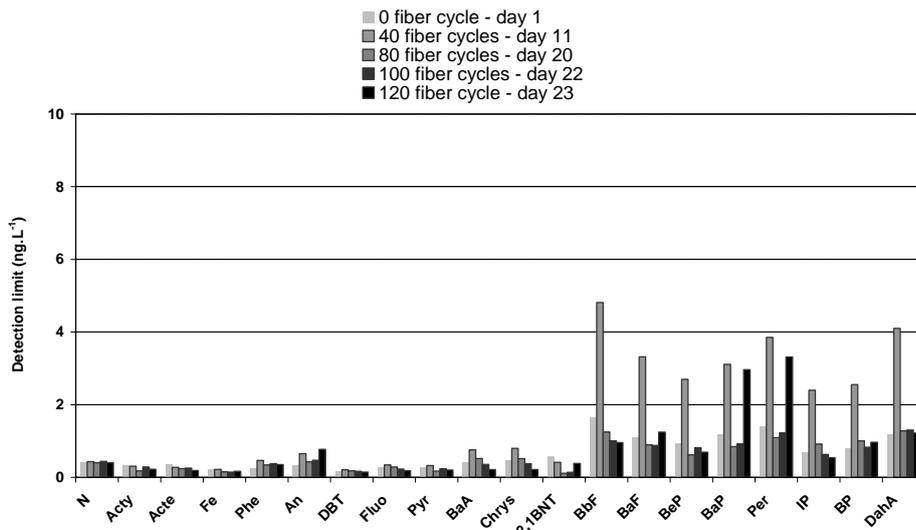
Table 3. Detection limits (signal/noise = 3) for SPE and SPME methodology for a/ spiked waters and b/ filtered natural waters. Marine water DOC < 2 mg.L⁻¹; river water DOC = 11.5 mg.L⁻¹; wastewater DOC = 23 mg.L⁻¹. Detection limits for natural waters were determined thanks to perdeuterated compounds.

The good robustness of analytical methodologies is highly essential to get high accuracy for any series of analysis. SPE and SPME robustness are thus compared. The robustness of SPE and SPME was controlled *via* spiked ultrapure water samples, added to each series of natural samples. Robustness of SPE is based on PAH quantification recovery results, whereas detection limits are used in SPME. Critical points are physical losses of compounds by SPE, and losses of instrumentation sensitivity for SPME. Control cards of SPE are shown in Figure 5a for a compound by aromaticity class. They illustrate a good robustness (variability = 5-20%; except for Acte and BaA: 27-32%) of the SPE method for tri- to penta-aromatic PAHs, whereas high variability is obtained for the lightest compounds (N, Acty) and the heaviest ones (hexa-aromatic PAHs). For lighter compounds, the drying of the sorbent and/or evaporation of the organic eluent are the critical steps where they may be lost. Low robustness for SPE analysis of heavy PAHs is due to glassware adsorption as previously shown.

The SPME technique presents good robustness (variability = 5-30%) for PAHs with molecular weight less or equal to 202 g.mol⁻¹, whereas detection limits of heavier compounds vary greatly with time (mean variability = 65%; Figure 5b). This technique shows excellent reproducibility as tested with another GC-MS instrument (data not shown). In order to maintain a good sensitivity of SPME, daily check ups are required, as well as frequent cleaning of injector system. SPME does not require days of technical manipulations, but needs frequent short periods for instrumentation controls and cares.



a/



b/

Figure 5. Robustness of a/ SPE and b/ SPME methodologies (with spiked ultrapure water).

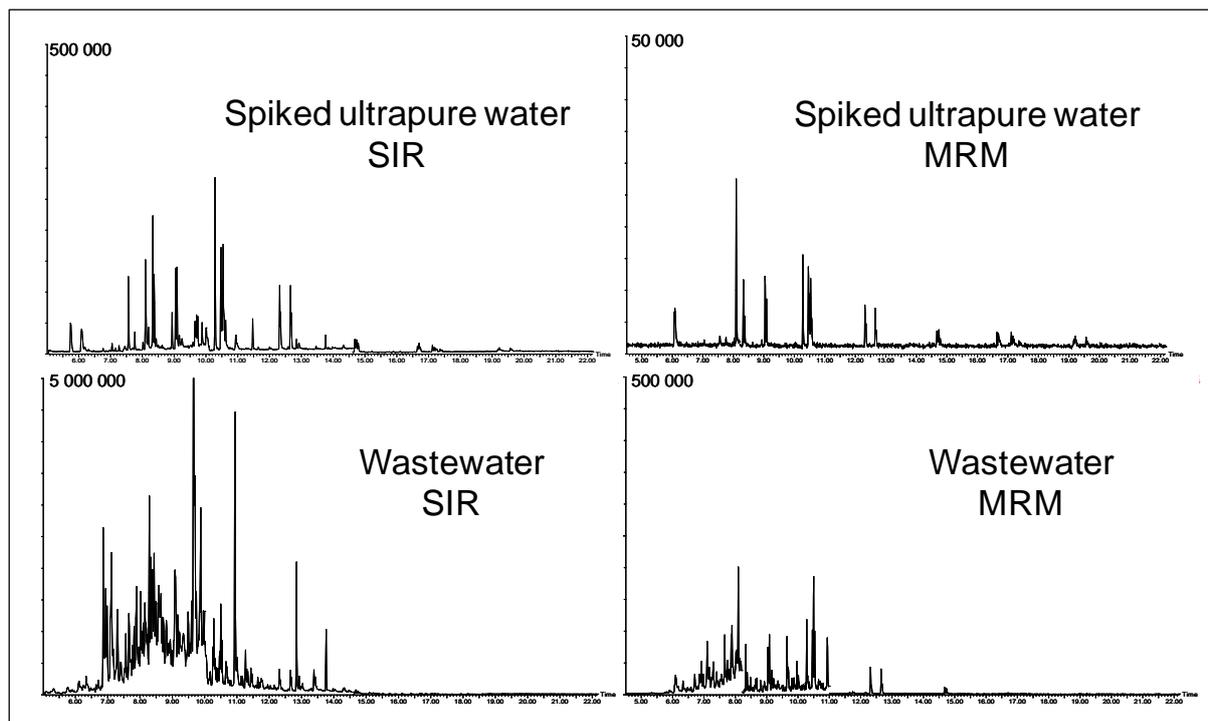
III.2.4. Performance of SPME-GC-MS and MS/MS for samples with complex matrix

Once SPME was developed and validated on spiked ultrapure water, analyses of complex matrix samples were investigated. Indeed, the advantage with on-line SPME-GC-MS is the possibility to play on three tools (SPME, GC and MS) to achieve the sensitivity and selectivity needed. Indeed, even though SPME can be highly selective with the use of the appropriate fiber polymer, PDMS absorbs more compounds than the desired analytes. So, in order to achieve a better selectivity (and potentially a better sensitivity), analyses were also performed thanks to tandem mass spectrometry.

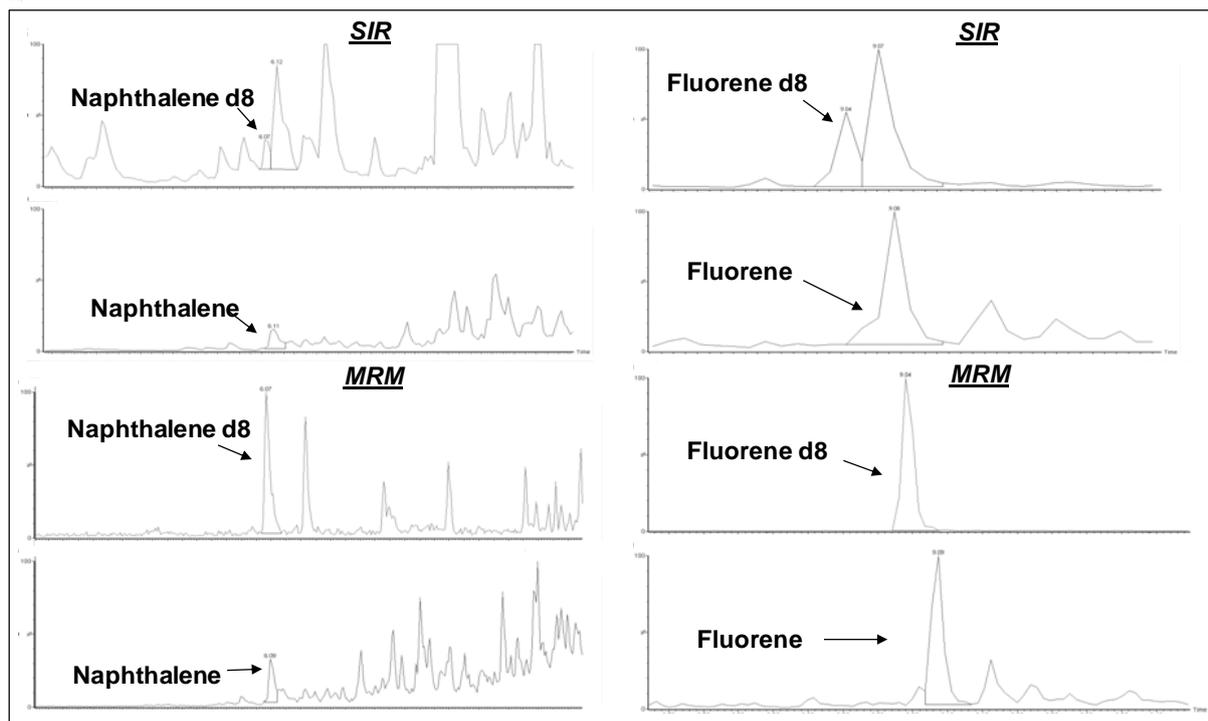
Thus, the MRM mode has been tested as an alternative tool to limit matrix interferences. PAHs are not highly fragmentable molecules, so the molecular ions are still predominant after collision chamber. The MRM method is thus based on transitions parent ions towards daughter ions corresponding to molecular ions towards molecular ions. The interest of this mode is to decrease noise and interferences in complex matrix chromatograms. Optimal collision energies are determined by a compromise between wanted noise decrease and unwanted signal fragmentations and range from 15 eV for lighter PAHs to 25 eV for heavier ones (Table 2). As it could be predicted, a loss of sensitivity is obtained with this mode (in comparison with the SIR mode), but detection limits range between 0.5 and 6 ng.L⁻¹ for spiked ultrapure water. However, in these samples, noise and interferences were very low and could not be decreased more but the MRM mode should be more interesting in the case of complex matrix samples.

Thus the use of the MRM mode was investigated on wastewater samples. According to Figure 6, SPME extracts a part of the matrix but this latter is mostly eliminated thanks to the MRM mode. Indeed, the background noise is higher for wastewaters than for spiked ultrapure waters and in both cases is lower in the MRM mode. Interferences of naphthalene and fluorene have therefore been able to be removed from the most charged matrix of wastewaters allowing to confirm the presence of these two PAHs. These interferences have caused overestimation of naphthalene when quantified by the SIR mode, showing that the MRM mode brings additional selectivity for very complex matrix. However, this last mode can only be applied in the case of high PAH concentrated samples since detection limits are far higher (Table 3). Consequently, the use of combined MS and MS/MS modes in the same analysis may thus be very useful to quantify PAHs with the first mode and to confirm the ions thanks to the second one.

SPME-GC-MS was then used to quantify PAHs in natural waters and compared to SPE. As samples contained little or medium concentrations of DOM, the MRM mode was not used. Moreover, the effect of DOM on SPE was investigated thanks to affluent water samples.



a/



b/

Figure 6. Interest of analysis in the MSMS mode in the case of complex matrices: a/ total ion current windows for SIR or MRM modes, b/ ion or transition recording windows.

III.2.5. Performance of SPE and SPME-GC-MS with low and high DOM samples

Whereas it seems preferable to add internal standards directly into spiked waters for SPE (see 3.1.4), it is not obvious that such a practice may provide accurate data in case of natural samples.

Indeed, PAH partition between water and glassware or matter may be different when compounds are naturally present or if they are spiked in water through an organic medium. In order to check the accuracy of IS spiking in natural waters, comparative extraction tests *via* SPE and SPME were performed on natural aqueous matrices.

In order to deconvolute the potential negative effects of glass adsorption from DOM interactions, purifications on NH_2 sorbent (thanks to "PAH aqua" cartridges) and with ionic exchanges ("SAX") were also tested. Indeed, these sorbents could bring a more efficient PAH extraction since amino groups of SAX and NH_2 sorbents could remove negatively charged humic material (Jacobsen et al. 2004).

Firstly, high DOM and high PAH content water was required in order to observe maximal effects. River water containing 11.5 mg.L^{-1} of dissolved organic carbon was used. However, since the water presents only traces of light PAHs ($< 1 \text{ ng.L}^{-1}$ from di- to tetra-PAHs), it was unavoidable to increase PAH concentration at around ten ng of PAH per liter. We thus opted to spike natural matrices but with respect to our objectives to minimize the ratio water/ethanol (v/v 0.006‰). That is why a large volume of natural water (4L) was spiked thanks to a small volume of ethanol dissolved PAH solution and then aliquots of this sample were transferred into SPE and SPME flasks before addition of IS. In this manner, the different samples are better homogenized and similar each other even if they are not fully in agreement with nominal concentration. This technique is another guarantee to reduce ethanol trace effects and better mimic natural PAHs. For SPE, perdeuterated PAHs were added into water with a volume ratio around 0.04‰.

This comparative test allowed us to observe a good accuracy of SPME characterization relatively to spiked theoretical concentration, whereas from 40 to 60% of overestimation were obtained with SPE (data not shown). These overestimations were inferred to the loss of internal standards (40-60%) without losing native PAHs. The water/ethanol volume ratio influences thus greatly the partition of native or perdeuterated standards between water and glass surfaces, since it is the only different parameter between native and IS spiking. Increasing ethanol percentage in water seems thus to promote the formation of an organic layer on the water surface that may migrate by capillarity and/or evaporation to bottle glass. Since similar volume ratios cannot be technically respected for spiking IS in natural water and as native PAHs are not lost during SPE, IS should therefore be added to SPE organic eluents. Moreover, SPE quantification was not improved with purification on NH_2 (PAH aqua sorbent) or ionic exchange (SAX sorbent) (discrepancy in accuracy $< 10\%$; data not shown). We have also tested the extraction of samples whose equilibrium between PAH and DOM should be achieved (IS spiking the day before the SPE; De Perre et al., in preparation, Bercaru et al. 2006) but without any improvement in quantification. We can thus conclude that PAH interactions with DOM have lower effects than PAH glass adsorption on SPE efficiency.

Secondly, as natural waters have low concentrations of PAHs, their SPE analysis requires to extract a higher volume of water than for spiked water. Therefore, breakthrough effect was investigated on spiked natural matrices. No breakthrough effect is observed on PAH recoveries (variability < 1%; data not shown) for 1- to 4-liter samples with low DOC content (< 2 mg.L⁻¹); this is an expected result since the strong hydrophobicity of PAHs and their affinity for octadecyl chains make them strongly adsorbed to the sorbent (Marcé and Borrull, 2000). In case of PAH trace levels, large volumes of samples can thus be extracted.

SPE and SPME methodologies were finally applied and compared in the case of marine waters with low DOM/PAH content (Figure 7). For SPE, internal standards were added in the organic elution fraction in order to validate the accuracy of this method. SPE and SPME characterizations are highly consistent. Heavy PAHs could moreover be detected thanks to SPE, whereas they were not with SPME. With the addition of internal standards at the end of the extraction, marine waters were therefore accurately quantified.

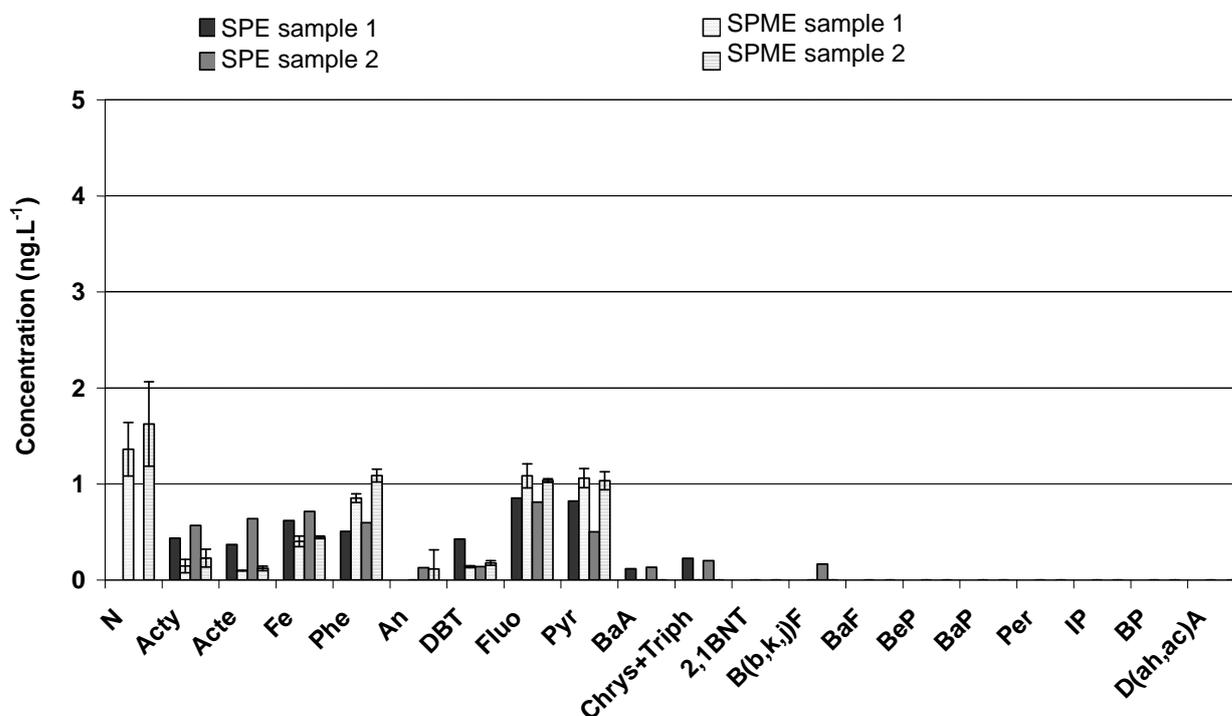


Figure 7. Characterization of PAH contamination of two different marine waters (n = 3 for each) by SPE and SPME.

Chrys+Triph = Chromatographic co-elution of chrysene and triphenylene.

B(b,k,j)F = Chromatographic co-elution of benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene and benzo(j)fluoranthene isomers.

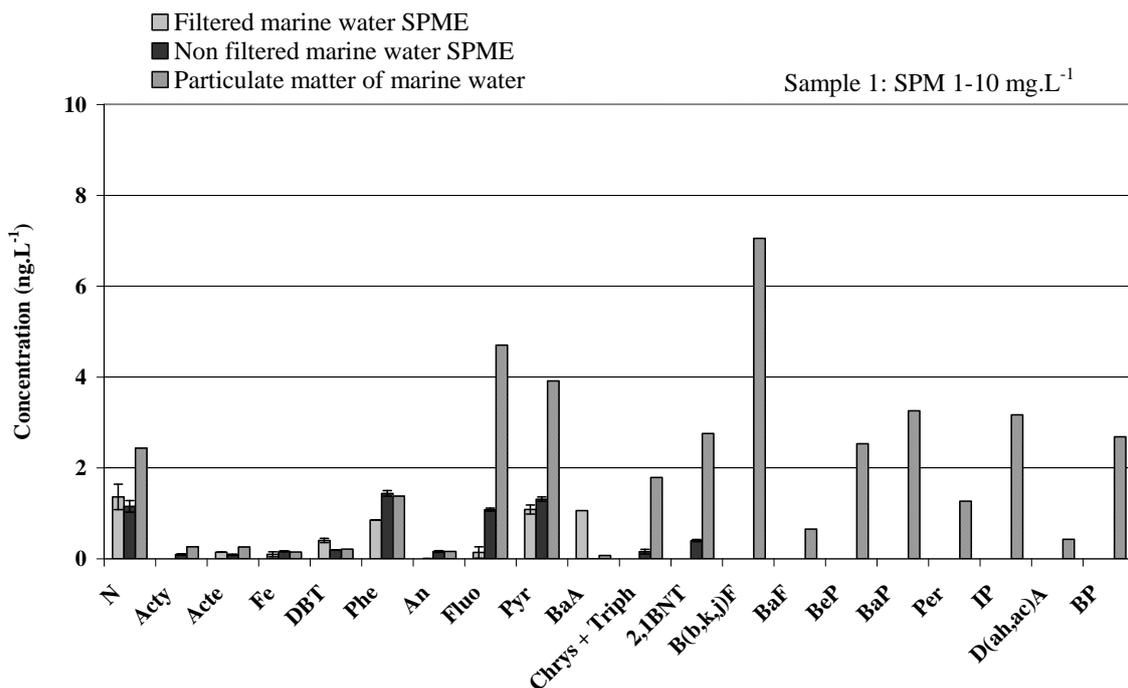
D(ah,ac)A = Chromatographic co-elution of dibenz(ah)anthracene and dibenz(ac)anthracene.

Water PAH contamination screening requires sample filtration in order to quantify on the one hand dissolved PAHs and on the other hand those adsorbed on suspended particulate matters (SPM). Both fractions of PAHs could not be simultaneously analyzed until recently. With the objectives to limit steps, and thus potential compound losses and costs, Werres et al. (2009) developed a disk SPE protocol for non-filtered waters allowing to extract at the same time both dissolved and particulate

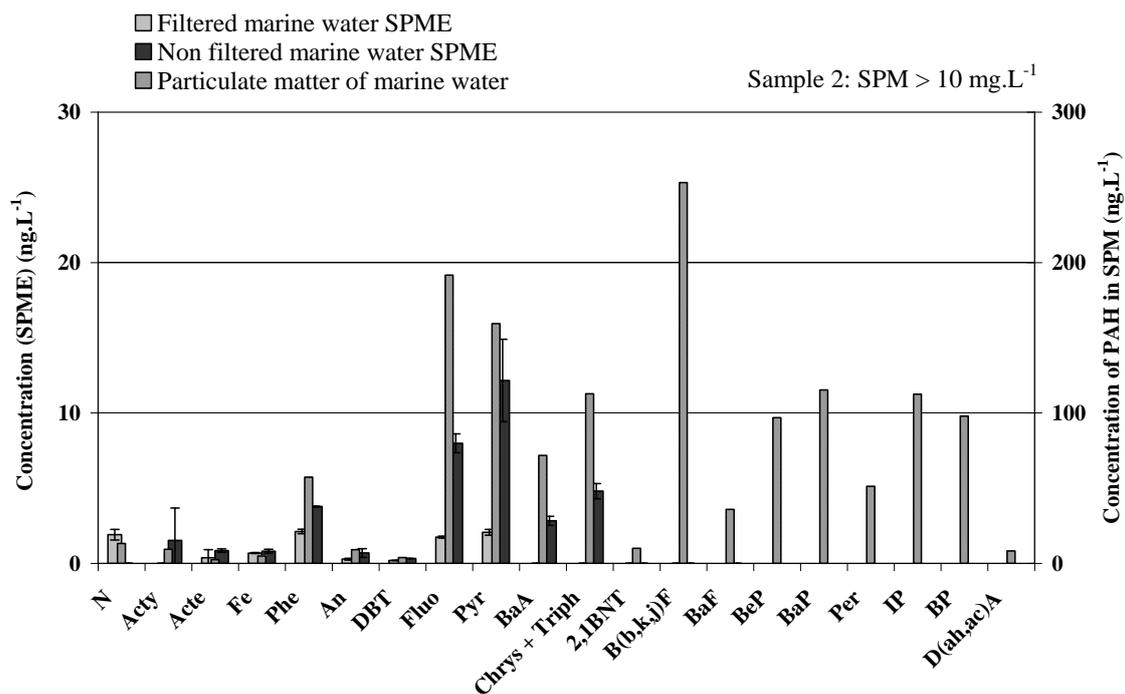
PAHs without any problem of clogging of the disk. Furthermore, since SPME extracts free analytes only, the extraction of a non-filtered sample could provide both freely dissolved (by external calibration) and total PAH concentrations (thanks to the addition of internal standards) in the same analysis; it might at least allow to manage the determination of the PAH dissolved concentration with a minimum of manipulation. We thus preliminarily investigated whether this technique might provide an interesting and easier alternative to off-line SPE. Two different marine waters were thus extracted by SPME, and comparisons were made between characterizations of filtered and non-filtered fractions (Figure 8). SPM PAH concentrations were analyzed by microwave extraction (procedure of Letellier et al. (1999)) on dried GF/F filters.

Filtered and non-filtered water characterizations are similar for di- and tri-aromatic PAHs, which is coherent with their low content on SPM relatively to heavier PAHs. For tetra-aromatic PAHs, slightly higher concentrations are observed when waters have high SPM content and are not filtered. This result suggests that IS are partitioned between dissolved and solid phases allowing to dose a part of SPM (about 10%) and dissolved PAHs simultaneously. This may be due to PAH equilibrium time between water and particulates which could be not achieved leading to an underestimation of total PAH concentrations. However, light dissolved PAHs can be analyzed without filtration, when SPM content is relatively low; with higher SPM content, a part of particulate PAHs are simultaneously dosed and cause an overestimation. Moreover, heavy PAHs could not be detected by SPME because of detection level limitations ($> 15 \text{ ng.L}^{-1}$). Indeed, internal standards, like native PAHs, have a far greater affinity for the particulate rather than for the dissolved phase, so it is necessary to add a high amount of compounds to obtain a detectable signal by SPME, increasing the detection limit. These results allow moreover to highlight the gap between light/heavy native PAH concentrations in some SPM samples (factors 100 to 2,000), suggesting the need to spike at different level concentrations the various perdeuterated PAHs in order to respect the linearity range.

Because SPME has shown its advantages in terms of low time-consuming and high sensitivity, its application to field monitoring studies offers the possibility to increase the number of samples. However, even if SPME is a fast analytical technique, the accumulation of many samples could occur and, as extractions cannot always be performed on the day of collection, their storage may become a necessity. Moreover, whereas SPE and LLE extracts can be stored in organic solvent before analyses, it is not possible for SPME. Thus, the best conditions to preserve aqueous samples were investigated for a week.



a/



b/

Figure 8. SPME on filtered and non-filtered natural waters and comparison to PAH concentration of suspended particulate matter (SPM) (microwave extraction; Letellier et al., 1999), a/ for low SPM content water and b/ high SPM content water. PAH concentrations on SPM are described by the right y axis. PAH concentrations of filtered and non-filtered waters (obtained by SPME) are described by the left y axis.

III.3. Optimization of preservation conditions of marine waters

Because of their organic nature, environmental aqueous samples are delicate matrices that may evolve with time, especially during their storage between sampling time and analyses. Most

PAHs can undergo abiotic and biotic degradations owing to oxidation, light radiations or the presence of micro-organisms. Moreover, these degradations can be direct or indirect; these latter occurring when organic or mineral matter is first affected and these changes affect PAHs. The most hydrophobic PAHs can also be lost by adsorption on glass surface and the lightest ones by evaporation. In order to prevent such phenomena, water samples are generally stored under cooling and opaque conditions just after collection, during the transport and before analyses. Some chemical treatments may also be performed to improve conservation like poisoning, acidification or addition of an organic modifier.

First, the storage of filtered and non-filtered (Figure 9) spiked marine water samples in SPME flasks was investigated at different temperatures (4 °C and -20 °C). Internal standards were added before storage for some samples (called « with IS ») and on the day of analysis (48h or 7d after initial time) for the others (called « without IS »). The storage without IS shows a loss of most PAHs after 2 days whatever the temperature. Indeed, storage without IS induces an underestimation of the concentration ranging from 10 to 35% for filtered and non-filtered waters, except for heavy PAHs in non-filtered waters stored at -20 °C. The addition of IS before storage (at 4 and -20 °C) improved quantification of lighter PAHs (from Acty to Pyr) for filtered and non-filtered waters (underestimation usually < 10%). However, for the heaviest PAHs, an over-estimation occurs especially for non-filtered samples and/or storage at -20 °C. Naphthalene, the lightest PAH, shows a particular pattern. It is slightly overestimated at 4 °C without IS and the addition of IS does not improve the quantification. Moreover, whatever the moment of IS addition, underestimation occurs at -20 °C.

Aqueous samples were stored in SPME flasks in the dark and were directly analyzed without any manipulation (except IS addition). Despite this storage condition, as shown by results on samples without IS, a certain amount of all PAHs (until 35%) is lost within 48h; likely owing to degradation/photolysis. Despite the low number of studies and discrepancies between experimental designs, experimental PAH half-lives in an aqueous medium range from a few minutes (for most of the heaviest PAHs) to a few days under simulated solar radiations in the aqueous medium (Kochany and Maguire, 1994; Bertilsson and Widenfalk, 2002; Huang et al., 1995; Jacobs et al., 2008). In our study, BaP, An and maybe DahA (its high variability requires caution for this compound) present a higher extent of losses than other compounds. These compounds figuring among the most reactive PAHs (Zepp and Schlotzhauer, 1979; cited by Payne and Phillips, 1985), they may be lost by photodegradation. However, all other PAHs are lost in a quite similar percentage; the photodegradation cannot thus fully explain the observed patterns. We can also presume that glass adsorption (for heavy PAHs) and volatilization (for the lightest ones) may be responsible for losses. Furthermore, freshly added perdeuterated PAHs (just before analysis) may not be at equilibrium (with glass, dissolved and particulate matter) as well as 48h and 7d aged native PAHs so the correction thanks to IS cannot be complete and underestimation of native PAHs occurs. Deuterated PAHs are added to water by the means of an ethanol solution (v/v 2‰) that may increase their aqueous solubilities; they may be thus less exposed to glass adsorption than native PAHs that were not directly spiked in SPME flasks, and whose ethanol/water volume ratio is greatly lower (0.1‰). Native PAHs

may also be trapped in matter and/or “strongly” adsorbed on glass; increasing deuterated PAH solubility with ethanol may induce lower affinity for matter. However underestimations are not generally higher for non-filtered waters relatively to filtered ones. Since the particulate content in marine water is relatively low ($< 5 \text{ mg.L}^{-1}$), its influence on equilibrium time may be low.

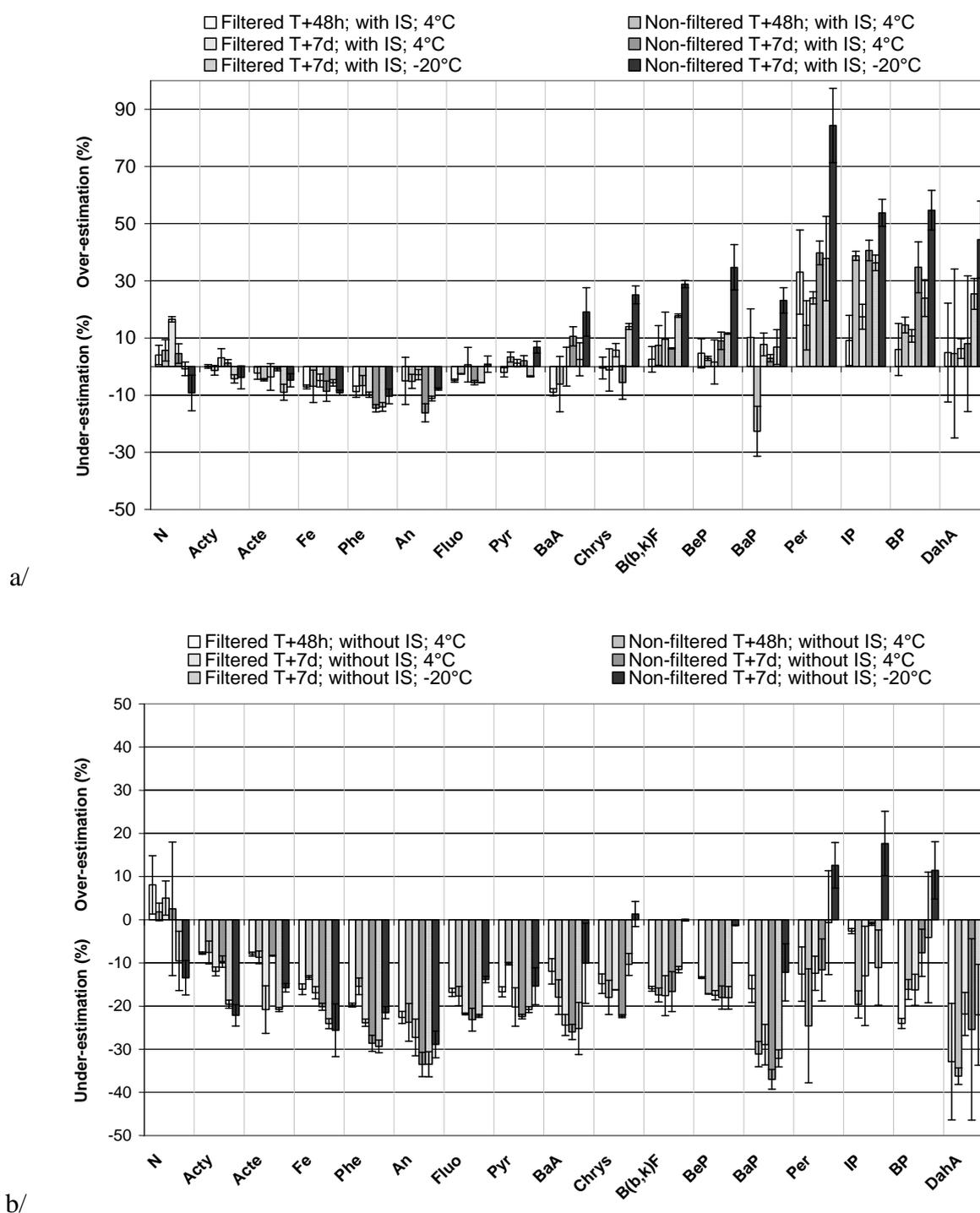


Figure 9. Error quantification for filtered and non-filtered samples a/stored without IS and b/initially spiked with IS: expressed as percentage difference between T_x and T_0 concentrations. T_0 analyses were realized just after IS spiking; perdeuterated PAH equilibrium between dissolved phase and matter was therefore not achieved.

When IS are immediately spiked in samples before storage, partitions of deuterated and native PAHs are more equal between each other. Therefore, no underestimation is done on the quantification of PAHs at T48h and T7d. However, the underestimation occurring at T0 causes an over-estimation of PAHs in samples “with IS”, especially for heavy PAHs, in the presence of particles and at -20 °C, which are the less favorable conditions to achieve equilibrium quickly. Consequently, the over-estimation of PAHs when IS are added before the storage is only apparent and to have an accurate quantification, it is necessary to add IS just after the sampling and to wait for equilibrium before analyses.

Therefore, the best conditions are the addition of IS before the storage in the dark and at 4 °C since it allows quantification with errors less than 10% even after 7 days. However, the storage of non-filtered samples is unadvisable, especially for heavy PAH quantification. These conditions were tested on non-spiked marine water in order to determine their benefit at trace level. The results have shown that quantification errors on tri- to tetra-aromatic PAHs are below 0.5 ng.L⁻¹ (for filtered and non-filtered samples) but naphthalene is largely overestimated for filtered waters (+200%). Moreover, the use of an organic modifier has been tested but there is no benefit to add methanol or formol to aqueous samples. As a preliminary test in our laboratory showed a loss of most sensitive PAHs (Acty, An, BaA, BaP, Per) in acid waters at pH 3 (Figure 10) during SPME extraction (PDMS 100 µm), acidification of samples was not considered here to be a useful method to store them and has not been tested. However, the PAH loss seems to be a particular case observed with PDMS 100 µm since PAH abundances do not change at pH 3 with PDMS-DVB. Finally, since samples waiting for extraction for a few hours on the GC rack may evolve, conservation in ambient conditions (22 °C, natural light) has also been investigated. Natural light in the GC room was however greatly reduced thanks to permanent UV filters on window glass and curtains. The ambient temperature was maintained at 22 °C (± 2 °C) thanks to air conditioning. When samples are waiting on the GC rack, losses of tri- to tetra-PAHs are lower than 1 ng.L⁻¹ for filtered waters but higher for non-filtered water (< 5 ng.L⁻¹). These losses may not induce error on quantification when they are IS spiked, but will influence detection limits. Since detection limits are lower than 0.7 ng.L⁻¹, one can consider that better storage conditions on the GC rack are not required if samples are waiting for less than one day in these ambient conditions.

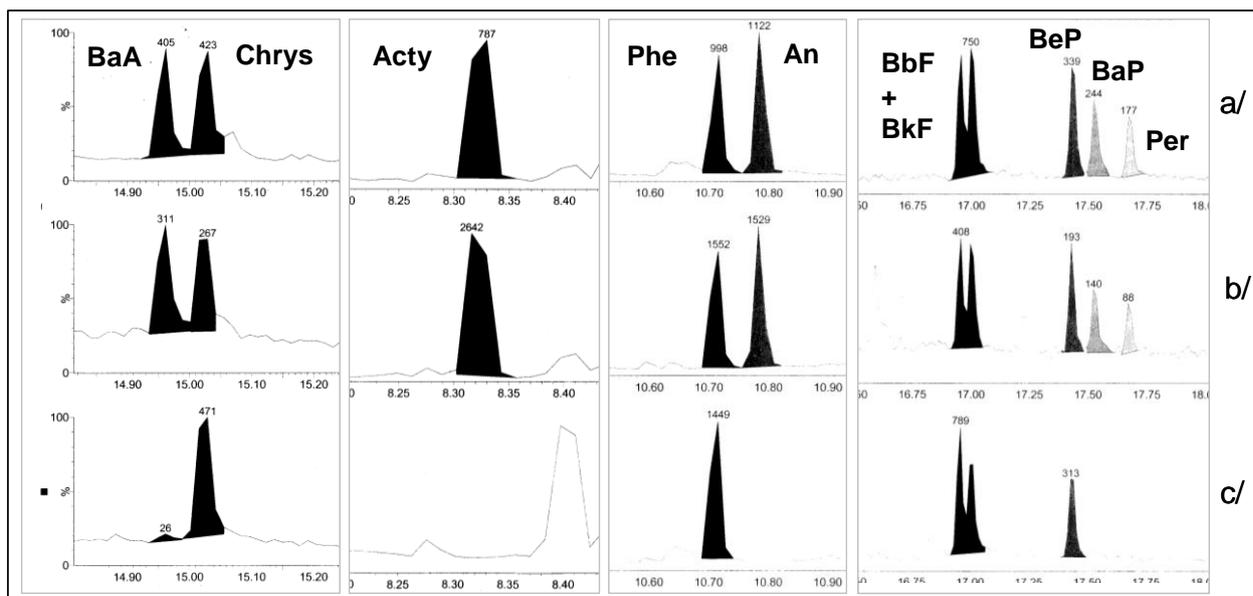


Figure 10. Chromatogram of several PAHs extracted a/ with a PDMS 100 μm fiber at $\text{pH} \approx 7$, b/ with a PDMS-DVB 65 μm fiber at $\text{pH} 3$, c/ with a PDMS 100 μm fiber at $\text{pH} 3$.

IV. Conclusion

SPE and SPME are two efficient methodologies available to dose dissolved PAHs in an aqueous medium. Good accuracy and sensitivity were demonstrated for both, although each one shows some limitations. Although SPME shows greater limitations for heavy PAH analysis than SPE does, this technique offers an easy and accurate tool highly interesting for environmental monitoring. The efficiency of the methods is based on the use of perdeuterated homologues or isomers as internal standards that well mimic partition of native PAHs between water and matter. Furthermore, the selectivity of SPME was high but can be improved by coupling to tandem mass spectrometry, making analyses of very complex matrices possible. Regarding SPE, it is interesting to note that, contrary to expectations, the addition of internal standards can disturb the quantification which is more accurate when they are added after the extraction. Moreover, the presence of DOM did not modify the extraction and the use of purifying cartridges is not necessary for river waters of intermediate dissolved organic matter content (around 10 mg.L^{-1} of carbon).

With the objectives to simplify methodology and to gain on accuracy and analysis cost, preliminary tests of non-filtered water analyses were performed. Even though the analysis of total heavy PAHs in water requires further developments to improve their sensitivity, the efficiency of SPME to dose total low molecular weight PAHs in both dissolved and particulate phases has been shown. SPME offers thus a remarkable tool able to dose accurately dissolved major PAHs in waters. After further improvements, this tool could be able to dose total concentrations from light to heavy PAHs without any sample preparation. Moreover, if analyses need a delay, SPME samples can be simply stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for one week thanks to the initial addition of these perdeuterated compounds. SPME

requires however recurrent instrumentation controls and cares. SPE provides moreover an accurate alternative tool.

Acknowledgements

“Région Aquitaine”, ORQUE program, ANR Emestox, CPER A2E are acknowledged.

Literature

- Arthur C. L. & Pawliszyn J.** (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* **62**(19), 2145-2148.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., Narbonne J. F., Burgeot T., Michel X. & Bellocq J.** (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research* **47**(5), 415-439.
- Bercaru O., Ulberth F., Emons H. & Vandecasteele C.** (2006) Accurate quantification of PAHs in water in the presence of dissolved humic acids using isotope dilution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **384**(5), 1207-1213.
- Bertilsson S. & Widenfalk A.** (2002) Photochemical degradation of PAHs in freshwaters and their impact on bacterial growth - influence of water chemistry. *Hydrobiologia* **469**, 23-32.
- Busetti F., Heitz A., Cuomo M., Badoer S. & Traverso P.** (2006) Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography A* **1102**(1-2), 104-115.
- Fernandes M. B., Sicre M. A., Boireau A. & Tronczynski J.** (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* **34**(11), 857-867.
- Huang X. D., Dixon D. G. & Greenberg B. M.** (1995) Increased Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Toxicity Following Their Photomodification in Natural Sunlight: Impacts on the Duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **32**(2), 194-200.
- Jacobs L.E., Weavers L. K. & Chin Y.-P.** (2008) Direct and indirect photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in nitrate-rich surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**, 1643-1648.
- Jacobsen A. M., Halling-Sørensen B., Ingerslev F. & Honoré Hansen S.** (2004) Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1038**(1-2), 157-170.
- Junk G. A. & Richard J. J.** (1988) Solid phase extraction on a small scale. *Journal of research of the National Bureau of Standards* **93**(3), 274-276.
- Kiss G., Varga-Puchony Z. & Hlavay J.** (1996) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography. *Journal of*

- Chromatography A* **725**(2), 261-272.
- Kochany J. & Maguire R. J.** (1994) Abiotic transformations of polynuclear aromatic hydrocarbons and polynuclear aromatic nitrogen heterocycles in aquatic environments. *The Science of The Total Environment* **144**(1-3), 17-31.
- Law R. J., Dawes V. J., Woodhead R. J. & Matthiessen P.** (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seawater around England and Wales. *Marine Pollution Bulletin* **34**(5), 306-322.
- Letellier M., Budzinski H., Bellocq J. & Connan J.** (1999) Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks. *Organic geochemistry* **30**(11), 1353-1365.
- Li N. & Lee H. K.** (2001) Assessment of colloid formation and physical state distribution of trace polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Analytical Chemistry* **73**(21), 5201-5206.
- Lord H. & Pawliszyn J.** (2000) Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* **885**(1-2), 153-193.
- Luo X., Mai B., Yang Q., Fu J., Sheng G. & Wang Z.** (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides in water columns from the Pearl River and the Macao harbor in the Pearl River Delta in South China. *Marine Pollution Bulletin* **48**(11-12), 1102-1115.
- Maldonado C., Bayona J. M. & Bodineau L.** (1999) Sources, Distribution, and Water Column Processes of Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Northwestern Black Sea Water. *Environmental Science and Technology* **33**(16), 2693-2702.
- Marcé R. M. & Borrull F.** (2000) Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *Journal of Chromatography A* **885**(1-2), 273-290.
- Maskaoui K., Zhou J. L., Hong H. S. & Zhang Z. L.** (2002) Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Jiulong River Estuary and Western Xiamen Sea, China. *Environmental Pollution* **118**(1), 109-122.
- Mitra S. & Bianchi T. S.** (2003) A preliminary assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in the lower Mississippi River and Gulf of Mexico. *Marine Chemistry* **82**(3-4), 273-288.
- Olivella M. À.** (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and surface waters of Lake Maggiore, a subalpine lake in Northern Italy. *Chemosphere* **63**(1), 116-131.
- Pawliszyn J. & Pedersen-Bjergaard S.** (2006) Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends. *Journal of Chromatographic Science* **44**(6), 291-307.
- Payne J. & Phillips C.** (1985) Photochemistry of petroleum in water. *Environmental Science and Technology* **19**(7), 569-579.
- Røe Utvik T. I., Durell G. S. & Johnsen S.** (1999) Determining produced water originating polycyclic aromatic hydrocarbons in North Sea waters: comparison of sampling techniques. *Marine Pollution Bulletin* **38**(11), 977-989.
- European Union (EU)** (1998) Water framework directive 98/83/CE.
- European Union (EU)** (2005) Common implementation strategy for the water framework directive:

environmental quality standards (EQS), substance data sheet, Priority substance No.28: Polycyclic Aromatic Compounds.

Urbe I. & Ruana J. (1997) Application of solid-phase extraction discs with a glass fiber matrix to fast determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Chromatography A* **778**(1-2), 337-345.

Werres F., Balsaa P. & Schmidt T. C. (2009) Total concentration analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with high suspended particulate matter content. *Journal of Chromatography A* **1216**(12), 2235-2240.

Development of Solid-Phase Microextraction (SPME) and its Application to the Study of Dissolved Organic Matter (DOM) - Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Interactions in Aquatic Environment

Chloé de Perre, Karyn Le Ménach, Fabienne Ibalot, Edith Parlanti, Hélène Budzinski

Abstract

SPME-GC-MS was developed for the study of interactions between PAHs and DOM. After the determination of the best conditions of extraction, the tool was applied to spiked water to calculate the dissolved organic carbon – water distribution coefficient (K_{DOC}) in presence of different mixtures of PAHs and Aldrich humic acid. For the first time, K_{DOC} values of 18 PAHs were calculated thanks to SPME-GC-MS and fluorescence quenching; they were in agreement with the ones available in the literature. Competition between PAHs, deuterated PAHs and DOM was shown, pointing out the non-linearity of PAH-DOM interactions.

Développement de la Micro-Extraction sur Phase Solide (SPME) et application à l'étude des interactions Matière Organique Dissoute (MOD) - Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans l'environnement aquatique

Résumé

La SPME-GC-MS a été développée dans le but d'étudier les interactions entre les HAP et la MOD. Après la détermination des conditions optimales d'extraction, l'outil a été appliqué à des eaux supplémentées afin de quantifier les coefficients de partition eau – carbone organique dissous (K_{DOC}) en présence de différents mélanges de HAP et d'acide humique Aldrich. Pour la première fois, des valeurs de K_{DOC} ont été calculées pour 18 HAP grâce à la SPME-GC-MS et/ou à l'extinction de fluorescence ; les valeurs obtenues étaient de l'ordre de grandeur de celles disponibles dans la littérature. Des phénomènes de compétition entre les HAP, les HAP deutérés et la MOD ont pu être mis en évidence, ainsi que la non-linéarité des interactions HAP-MOD.

I. Introduction

Natural organic matter is a complex mixture of macromolecules originating from the biological and chemical degradation of plants or animals. In aquatic systems, organic macromolecules smaller than 0.45 μm constitute the Dissolved Organic Matter (DOM). This fraction is well known for being able to modify the distribution (Haitzer et al. 1998, Yates et al. 1997), the bioavailability (Akkanen et al. 2001), the degradation (Seibel et al. 1996, Wang et al. 1995) or the toxicity (Haitzer et al. 1998) of organic compounds, and particularly of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). PAHs are hydrophobic organic compounds coming mainly from petroleum and incomplete combustion of organic matter. They are introduced into surface waters via atmospheric fallout, municipal effluents, leaching or by oil spills. They are of concern for the environment since some of them are mutagenic or carcinogenic (Abrajano et al. 2003).

To quantify the impact of DOM on the PAH fate, it is necessary to study the strength of interactions occurring between them. A few techniques can be used to study the interactions between DOM and PAHs, each of them with advantages and drawbacks. One of them, the fluorescence quenching, does not require the separation of free compounds from those associated with DOM. However, this technique seems to be hardly applicable to natural environment (Gauthier et al. 1986). Other techniques, in particular extraction or separation methods, can be used associated with analytical techniques: dialysis, ultrafiltration, reverse phase chromatography or more recently Solid-Phase Microextraction (SPME). However, reverse phase chromatography was shown to disturb the equilibrium (Kukkonen and Pellinen 1994), ultrafiltration and dialysis could raise sorption problems for hydrophobic compounds due to adsorption on the membrane that makes it difficult to analyze free analytes (Woolgar and Jones 1999, Heringa and Hermens 2003). SPME seems to be the most promising technique since it appears to be faster, more sensitive and simple than other techniques and it is solvent free (Lord and Pawliszyn 2000, Heringa and Hermens 2003). SPME was developed by Pawliszyn at the beginning of the 1990s. It consists in a fiber coated with a polymer that adsorbs or absorbs analytes in a liquid, solid or gas sample. Then analytes are transferred into a liquid or gas chromatograph before being analyzed after thermal or solvent desorption.

The aim of this study was to develop SPME coupled to Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS) and to compare it with dialysis and fluorescence quenching methodologies to get to know the applicability domain of these three techniques and to characterize interactions between DOM and PAHs.

II. Materials and methods

II.1. Organic compounds

Four PAHs (phenanthrene, fluoranthene, chrysene, benzo[a]pyrene) were used as model compounds for analytical developments and their corresponding perdeuterated PAHs as internal standards for quantitative calibration in SPME (Table 1).

PAHs	Purity (%)	Supplier	m/z	Deuterated PAHs	Isotopic purity (%)	Supplier	m/z
Naphthalene (N)	99+	Aldrich	128	N d8	98	EGA-Chemie	136
Acenaphthylene (Acy)	99+	Aldrich	152	Acy d8	98	Promochem (CIL)	160
Acenaphthene (Ace)	99	Aldrich	154	Ace d10	99	Promochem (CIL)	164
Fluorene (Flu)	99+	Aldrich	166	Flu d10	98	Promochem (CIL)	176
Dibenzothiophene (DBT)	99	Acros	184	DBT d8	99	MSD Isotopes	192
Phenanthrene (Phe)	99	Aldrich	178	Phe d10	98	CIL	188
Anthracene (An)	98	Labosi	178	An d10	98	CIL	188
Fluoranthene (Fluo)	99	Aldrich	202	Fluo d10	99.2	MSD Isotopes	212
Pyrene (Pyr)	99+	Fluka	202	Pyr d10	98	CIL	212
Benzo[a]anthracene (BaA)	99	Aldrich	228	BaA d12	98	Promochem (CIL)	240
Chrysene (Chrys)	99+	Fluka	228	Chrys d12	98	MSD Isotopes	240
Benzo[b]fluoranthene (BbF)	99	Aldrich	252	BbF d12	98	CIL	264
Benzo[k]fluoranthene (BkF)	98	Aldrich	252	BkF d12	98	Promochem (CIL)	264
Benzo[e]pyrene (BeP)	99	Aldrich	252	BeP d12	98	CIL	264
Benzo[a]pyrene (BaP)	97	Aldrich	252	BaP d12	98	CIL	264
Perylene (Per)	99+	Aldrich	252	Per d12	99.5	MSD Isotopes	264
Indeno[1,2,3-cd]pyrene (IP)	99	Promochem	276	IP d12	98+	Promochem (CIL)	288
Benzo[g,h,i]perylene (BP)	99.7	Promochem	276	BP d12	98	CIL	288
Dibenz[a,h]anthracene (DahA)	97	Aldrich	278	DahA d14	98	Promochem (CIL)	292

Table 1. Model compounds and internal standards

After development, interactions were studied for the 19 PAHs listed in Table 1. Solutions of PAHs were prepared in ethanol and then 50 μL of a solution of 25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ were added to 1L of ultrapure water (MilliQ, Millipore, Molsheim, France) to get an aqueous solution of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for each PAH. To have a good homogenization of this aqueous solution, it was ultrasonicated for 5 min but no magnetic agitation was performed to avoid the adsorption of PAHs on the stirring bar (that could reach 20% for BaP, results not shown). These aqueous solutions were experimentally characterized thanks to Liquid-Liquid Extraction (LLE) with dichloromethane followed by GC-MS analysis. Deuterated PAHs were dissolved in ethanol at a concentration of 250 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ and diluted in ethanol if necessary. Solvents used were ethanol absolute HPLC grade (Scharlau Chemie S.A, Sentmenat, Spain) and dichloromethane for residue and pesticide analysis (Acros Organics, Geel, Belgium).

DOM used for this study was Aldrich humic acid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). This humic acid was added to 500 mL of pure water to obtain an aqueous solution of DOM and then this latter was filtered on a GF/F (Whatman, Maidstone, England) glass fiber filter (0.7 μm). The concentrations of Dissolved Organic Carbon (DOC) were measured using a Shimadzu TOC-V CSN (Shimadzu, Duisburg, Germany). Several aqueous solutions of Aldrich humic acid were prepared for the experiment but all were around 11 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and then characterized precisely.

II.2. Experimental protocols and analytical tools

II.2.1. SPME-GC-MS

SPME analyses of the 10 mL spiked water samples were performed with commercially available PDMS (polydimethylsiloxane) and PDMS-DVB (divinylbenzene) coated fibers from Supelco (Bellefonte, USA). Different sizes of PDMS coating were compared (7 μm and 100 μm) and various parameters (extraction and desorption times, temperature, liner type...) had to be optimized. After the immersion of the fiber in the sample, it was immediately desorbed into the GC-MS injection port. Analyses were performed in automated mode thanks to a Combipal (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland).

The GC was an Agilent 6890 model (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a mass selective detector, model 5972, with an energy of ionization of 70 eV (electronic impact). The column used was a HP-5MS ((5%-phenyl)-methylpolysiloxane; 30 m \times 0.25 mm i.d.; 0.25 μm film; Agilent Technologies, Chromoptic, Courtaboeuf, France). Both SPME and direct liquid injection (after LLE) were performed in the pulsed splitless mode - the pulse pressure was 30 psi for 1 min, after 2 min the purge flow to split vent was 55 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the gas saver was set at 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ after 15 min - and the inlet temperature was 250 $^{\circ}\text{C}$. The carrier gas was helium (purity 5.6, Linde Gas, Toulouse, France) with a constant flow rate of 1.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and a linear velocity of 42 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. The column temperature was held initially at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, increased to 150 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, then to 250 $^{\circ}\text{C}$ at 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and to 310 $^{\circ}\text{C}$ at 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and finally held on for 3 min. For the determination of PAHs, GC/MS was operated in the Selected Ion Monitoring (SIM) acquisition mode and only the molecular ions were sought (Table 1). A dwell time of 80 ms was used for each ion and the scan rate was 1.31 $\text{cycle}\cdot\text{s}^{-1}$.

Interactions between PAHs and the dissolved Aldrich humic acid were first studied by changing the concentration of DOM (ranging from 0 to 5.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of DOC) and keeping the total concentration of PAHs constant (1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of each) by both SPME and fluorescence quenching. Natural waters can be more concentrated in DOC since concentrations usually vary from 0.5 to 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, depending on the source of DOM (Haitzer et al. 1998). However, commercial humic acid was shown to have stronger interactions with PAHs than natural waters (Durjava et al. 2007), so a high concentration of Aldrich humic acid was not necessary and caused troubles in fluorescence analysis

due to the “inner filter effect”. All samples contained the same volume of water, of solvent and the same concentration of PAHs; only the concentration of DOM varied. Then, the concentration of DOM was kept constant (3 mg.L^{-1} of DOC) whereas the concentrations of PAHs varied from 0.01 to $1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (by SPME only). To quantify the free and total concentrations, standards were made with spiked waters at known concentrations of PAHs and deuterated PAHs to calculate the response factors using the SPME-GC-MS for the various studied PAHs. As these aqueous standards provided the same response factors on the range $0.1 - 1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$, they were eventually made at only one concentration ($50 - 100 \text{ ng.L}^{-1}$). Two aqueous standards were extracted at the beginning and at the end of each SPME-GC-MS sequence and the mean value of the four response factors was used. Moreover, before each sequence, the sensitivity of the GC-MS system was checked thanks to manual direct liquid injection of deuterated PAHs.

Because pH can play an important part in the nature and the force of interactions between DOM and PAHs (Schlautman and Morgan 1993), it was controlled for all experiments and it slightly varied from 6.8 to 7.1 between the lowest and the highest Aldrich humic acid concentrations.

II.2.2. Fluorescence analysis

Interactions were also studied by analysis of the quenching of PAH fluorescence thanks to the addition of DOM to the samples. Indeed, the fluorescence quenching technique is based here on the decrease of PAH fluorescence when DOM is added, due to the formation of a non-fluorescent PAH-DOM complex (static quenching) (Gauthier et al. 1986).

Absorption measurements were recorded with a Jasco V-560 spectrophotometer (Jasco, France) equipped with deuterium and tungsten iodine lamps and fluorescence spectra with a Fluorolog FL3-22 spectrofluorometer (Jobin Yvon, France) equipped with a xenon lamp (450 W). Analyses were made with 1 cm quartz cells (Hellma, France). All the fluorescence spectra were obtained at a constant temperature of $20 \text{ }^\circ\text{C}$, with an integration time of 0.5 s, an increment of 1 nm, excitation and emission band paths of 4 nm and in the Sc/R mode (the sample signal (S) is automatically multiplied by the emission correction (c) factors and normalized by the lamp reference signal (R)).

The samples used were at the same concentrations of PAHs and DOM as the SPME ones but PAHs were studied individually because of the fluorescence emission spectra overlapping in mixture. Moreover, fluoranthene was replaced by pyrene since the fluorescence intensity of fluoranthene is low and overlaps with Aldrich humic acid fluorescence and SPME showed that these two compounds have a similar fate in terms of interactions. For each PAH, the fluorescence spectrum was registered for the sample with DOM and PAH, and so was the sample with DOM only. These two samples were strictly identical in their composition and concentration of DOM but one was spiked with $15 \text{ }\mu\text{L}$ of EtOH whereas the other was spiked with $15 \text{ }\mu\text{L}$ of one PAH dissolved in EtOH (weighed to find out the exact

PAH concentrations). After that, the two spectra were subtracted to recover only the PAH spectrum and to eliminate DOM fluorescence background. Finally, the spectra of PAHs were normalized to a PAH concentration of $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ to be able to compare spectra for exactly the same PAH concentrations. Before the interaction study, the best excitation and emission wavelengths were determined for each PAH; excitation/emission couples were 251/347 nm for phenanthrene, 230/373 nm for pyrene, 269/400 nm for chrysene and 296/405 nm for benzo[a]pyrene. These wavelengths were chosen to maximize their intensities and to minimize the overlap with Aldrich humic acid fluorescence. In addition to the fluorescence analysis, the UV-visible absorption of the samples was measured to know the absorbance values at excitation and emission wavelengths to correct the “inner filter effects”, as described by MacDonald et al. (1997) in their mathematical correction. The correction factors varied from 1 to 2.3 depending on the compound and the DOM concentration and were thus less than the maximal factor of 3 recommended by Parker (1968).

Additionally, fluorescence quenching was also used to determine the equilibrium time of PAH-DOM interactions. Analyses of phenanthrene and benzo[a]pyrene fluorescence in presence of 1 mg.L^{-1} of DOC were compared at different times during a 24h period and it appeared that equilibrium was reached in less than 5h for both PAHs without any agitation (Figure 1). Therefore, in order to be sure all the experiments were performed at the equilibrium point, each sample was agitated manually for a few seconds and then left in the dark at 4°C overnight before fluorescence quenching and SPME analyses.

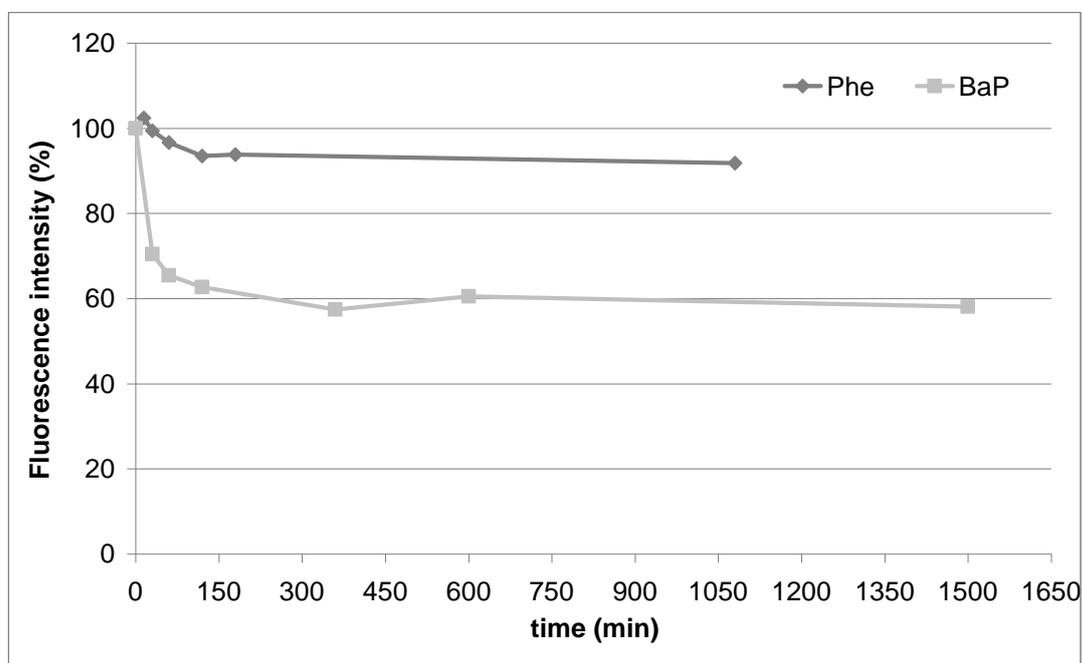


Figure 1. Time course of quenching of phenanthrene and benzo[a]pyrene fluorescence. Fluorescence intensity is expressed in percentage in relation to the fluorescence at $t = 0 \text{ min}$, $[\text{Phe}] = 2 \mu\text{g.L}^{-1}$ with $[\text{COD}] = 1.5 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{BaP}] = 1 \mu\text{g.L}^{-1}$ with $[\text{COD}] = 0.8 \text{ mg.L}^{-1}$.

II.2.3. Dialysis experiment

The third technique used to study the interactions was dialysis coupled to an extraction of PAHs by LLE and an analysis by GC-MS for quantification. The dialysis membranes were in cellulose ester (Spectra/Por® Biotech, wet in 0.1% sodium azide, Spectrum Europe, the Netherlands) with molecular weight cut-offs of 500 and 1000 Da. The membranes were cut and washed before use. Many solvents (ultrapure water, EtOH 10% or HCl 5%) were tested in order to get the best blank but neither EtOH nor HCl improved the dialysis bag cleaning (regarding fluorescence intensity due to membrane bleeding). Consequently, the membranes were rinsed thoroughly and soaked overnight in ultrapure water and then rinsed thoroughly again. After that, they were knotted and filled either with 10 mL of the sample and plunged into a 500 mL bottle of ultrapure water, or with 10 mL of MilliQ water and plunged into 500 mL of sample. First, the sample was made with only ultrapure water spiked with PAHs at $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in order to determine the time required to achieve equilibrium of PAH concentrations inside and outside the bag. To study interactions with DOM, this latter was added to PAHs in the dialysis bag. Once the equilibrium is reached, free PAHs are theoretically in the same concentration inside and outside the bag whereas DOM-bound PAHs are only in the bag. Thus, the concentration of bound PAHs is equal to the difference between the total concentration of PAHs inside the bag and the concentration outside the bag. During all the dialysis experiments, the samples were agitated thanks to a shaking table.

II.3. Experimental precautions

All the glassware, after a careful cleaning with detergent (TFD 7, Franklab, France) and rinsing with ultrapure water, was heated at $450 \text{ }^\circ\text{C}$ overnight before using it for PAH analyses and it was also rinsed with ultrapure water before DOC and spectrofluorometry analyses. For the SPME and LLE experiments, blanks were made to check the PAH ambient pollution and to be aware of a possible contamination of the samples. In SPME, blanks were performed by extracting an empty flask for 10 seconds to check the good desorption of the previous analysis. Generally, blanks represented less than 1% of the PAH areas of samples. For spectrofluorometry experiments, blanks of ultrapure water were made to test the cleanness of cells and to correct spectra for the Rayleigh and Raman scattering bands.

II.4. K_{DOC} calculations

In order to study the interactions of PAHs with DOM, it is necessary to define the partition coefficient of PAHs. First, we assumed that PAHs can interact with DOM in this way: $\text{DOM} + \text{PAH} \leftrightarrow \text{DOM} - \text{PAH}$ (1). So, the equilibrium coefficient, also called partition coefficient, was

$$K_{\text{DOM}} = \frac{[\text{DOM} - \text{PAH}]}{[\text{DOM}][\text{PAH}]} \text{ or } K_{\text{DOM}} = \frac{[\text{PAH}]_{\text{DOM}}}{[\text{DOM}][\text{PAH}]_{\text{free}}}$$

with $[\text{PAH}]_{\text{DOM}}$ the concentration of PAHs bound to DOM, $[\text{PAH}]_{\text{free}}$ the concentration of freely dissolved PAHs in water and $[\text{DOM}]$ the concentration of

DOM in water. However, DOM concentration is hard to quantify, so the DOC concentration was used and the partition coefficient took the shape of $K_{\text{DOC}} = \frac{[\text{PAH}]_{\text{DOC}}}{[\text{DOC}][\text{PAH}]_{\text{free}}}$ (2).

SPME-GC-MS and dialysis-LLE-GC-MS give free and total PAH concentrations, so $[\text{PAH}]_{\text{DOC}}$ was deduced by the equation : $[\text{PAH}]_{\text{DOC}} = [\text{PAH}]_{\text{total}} - [\text{PAH}]_{\text{free}}$ (3). It follows the Stern-Volmer equation: $\frac{[\text{PAH}]_{\text{total}}}{[\text{PAH}]_{\text{free}}} = K_{\text{DOC}} [\text{DOC}] + 1$ (4). To be able to compare K_{DOC} values with other studies, they were expressed in $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$.

With the technique of fluorescence quenching, PAH concentrations were not calculated. The intensities of PAHs in absence and in presence of DOM were used to calculate the K_{DOC} by means of the Stern-Volmer equation: $\frac{F_0}{F} = K_{\text{DOC}} [\text{DOC}] + 1$ (5), with F_0 the fluorescence intensity of PAHs without DOM and F in presence of DOM.

III. Results and discussion

III.1. Optimization of SPME-GC-MS conditions

First, optimizations of the SPME-GC-MS were performed with 4 PAHs (phenanthrene, fluoranthene, chrysene, benzo[a]pyrene). As far as the fiber is concerned, a non polar PDMS coating is recommended for the analysis of non polar compounds in a complex matrix. For the more polar compounds, PDMS-DVB can improve the fiber capacity of retention thanks to π - π interactions with aromatic DVB. Moreover, the fiber thickness is also important since the thicker the coating is, the more sensitive it is. Three kinds of fiber have therefore been tested: PDMS 100 μm , PDMS-DVB 65 μm and PDMS 7 μm and then PDMS 100 μm with a thicker gauge (23g instead of 24g) and one with the core in metal alloy (instead of fused silica). The thicker gauge fibers and the metal alloy one were tested since they should reduce breakage of the fibers thanks to the better solidity and flexibility of the needle respectively. Moreover, these kinds of fiber are advised to be used with a septum-less seal (Merlin Microseal[®] system), so that no problem of septum coring can occur (Pawliszyn and Pedersen-Bjergaard 2006). The areas of GC-MS peaks (obtained with the same extraction time) are reported in Figure 2.

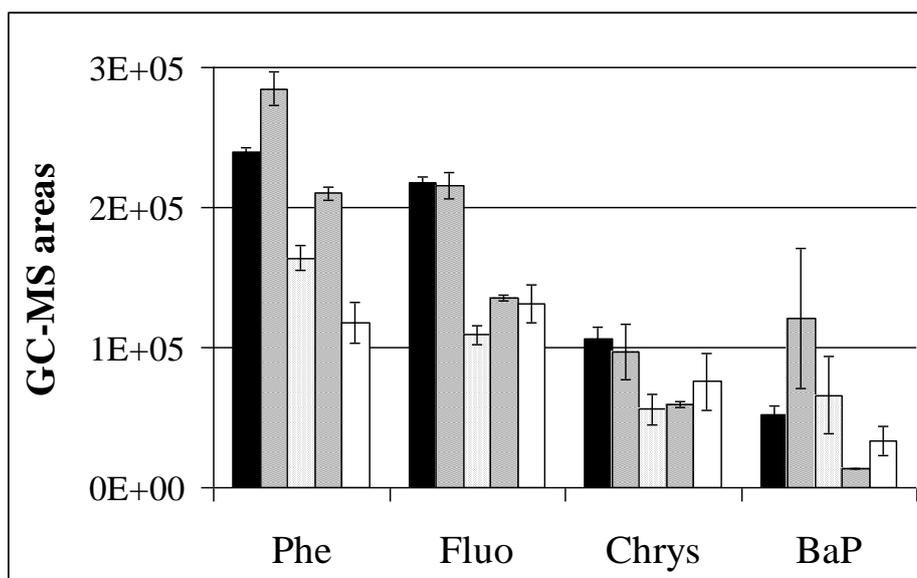


Figure 2. Sensitivity and reproducibility with different fibers. Extraction time = 30 min, [PAH] = 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, n=3.
 ■: PDMS 100 μm 24g, ▨: PDMS 100 μm 23g, ▩: metal alloy PDMS 100 μm 23g, ▩: PDMS-DVB 65 μm 24g,
 □: PDMS 7 μm 24g.

All the fibers tested were neither new nor too old (between 25 and 70 extractions had already been performed with them). Indeed, the newest fibers (25- and 30-extractions) appeared to be the least reproducible for heavy PAHs. The optimum age appeared to be about 50 extractions: they seemed less reproducible before and less sensitive after 130 - 150 extractions, or 200 - 250 for the PDMS 100 μm 23g. The most sensitive fibers were the PDMS 100 μm 23g and 24g but the 23g benefited from a longer durability. Contrary to expectations, the metal alloy fiber was far less sensitive than the other PDMS 100 μm ones. It seemed to be due to a bad desorption of compounds since the fiber blanks represent up to 20% in the area of the samples at 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (instead of < 1% for the fused silica PDMS fibers). Moreover, an increase of desorption temperature from 250 °C to 280 °C did not solve these problems of contaminated blanks. Therefore, the classical PDMS 100 μm 23g fiber was kept for the extraction of samples since it provided good sensitivity and reproducibility for all PAHs.

After the choice of the fiber, it was necessary to choose the most appropriate liner. Actually, two sorts of injectors can be employed: standard GC or SPME ones. Indeed, narrower inserts especially made for SPME should increase the linear flow around the fiber, resulting in an efficient removal of desorbed compounds (Lord and Pawliszyn 2000). Nevertheless, a few studies have shown that direct injection (DI) inserts improve the transfer of sample molecules onto the chromatographic column even for SPME analysis (Ouyang et al. 2005). Therefore, these two kinds of inserts were tested. There was no significant difference between the two inserts when comparing the average areas but chromatographic peaks seemed to be a little thinner with the SPME liner so this latter was finally chosen.

Once the fiber and injector determined, it was necessary to find out the best conditions of extraction. First, the most important factor is the extraction time. This parameter has been tested from

10 to 300 min and no equilibrium between PDMS and water was achieved. However, the duration of fiber immersion can be lower than the time necessary to reach an equilibrium between the sample and the fiber if it is perfectly reproducible (Lord and Pawliszyn 2000). A short time of extraction can thus be applied and is advised for interaction studies (Ramos et al. 1998), but a longer extraction time provides a better sensitivity. A compromise was done with an immersion time of 30 min, which made it possible to obtain a sufficient sensitivity for a good quantification of analytes and a relatively short time of analysis.

As the influence of temperature on the PAH-DOM equilibrium is not negligible (Lüers and Ten Hulscher 1996), a temperature of 40 °C was chosen and maintained constant through all experiments. Desorption of the absorbed compounds by the fiber in the GC injector also plays an important part on analytical performance. Indeed, it is necessary that all absorbed compounds be desorbed from the fiber, on the one hand, to obtain the best possible sensitivity and on the other hand, not to distort the successive extractions. The time necessary for a complete desorption is short (a few minutes) when the temperature of the injector is rather high (Lord and Pawliszyn 2000). However, in order to condition the fiber before each extraction, this one was maintained in the injector for 30 min at 250 °C while compounds were eluted from GC column and analyzed during the GC run. Thus, each sample was analyzed in one hour (30 min of extraction and 30 min of desorption-analysis). As regards the temperature of desorption, no statistical difference was observed between 250 and 270 °C (results not shown), even though variability seemed to be a little bit better at 270 °C. However, the variability in SPME-GC-MS areas can be due to several factors: variability of the fiber sensitivity, variability of the GC-MS, variability of the sample concentration during the time of analysis... This last variability may be due to evaporation (especially for light PAHs) or adsorption and photodegradation during the SPME analysis, since the samples can be left on the tray for more than 24h. Setkova et al. (2007) suggested placing an aluminum foil on the top of the septum as a barrier layer to minimize or eliminate evaporation. Tests were made but no true enhancement of recoveries and reproducibility were observed (results not shown). So the variability of concentrations in the flasks may be due not only to evaporation and a loss less than 5% was considered satisfactory without any aluminum foil. To determine which part of the system was responsible for the variability, the same solution of PAHs was diluted in isoctane and injected directly into the GC-MS in automated mode (n = 27). It appeared that the variability of the GC-MS system was from 5 to 15% (increasing with the molecular weight of PAHs). It was also shown that the sensitivity of the fiber tends to decrease within time so the fiber variability needs also to be taken into account. Finally, a SPME sequence had usually variabilities on areas from 10 to 35% for phenanthrene to benzo[a]pyrene with a PDMS 100 µm fiber, a concentration of 1 µg.L⁻¹ per PAH, an extraction time of 30 min and a SPME liner.

After determining the best parameters for the SPME of these four PAHs, the limits of detection (LOD) were measured with a 10 ng.L⁻¹ solution of 19 PAHs using the expression:

$LOD = \frac{\text{signal}}{\text{noise}} = 3$ (Table 2). These limits of detection were satisfactory since all of them were lower than 10 ng.L^{-1} and consequently this technique could be applied to some natural samples.

PAH	ng.L ⁻¹	PAH	ng.L ⁻¹
N	2.3 ± 0.5	BaA	2 ± 1
Acy	1.9 ± 0.1	Chrys	2 ± 1
Ace	1.1 ± 0.3	BbF + BkF	5 ± 2
Flu	2.0 ± 0.1	BeP	2 ± 1
Phe	0.7 ± 0.2	BaP	4 ± 2
An	1.1 ± 0.3	Per	4 ± 3
DBT	1.9 ± 0.2	IP	9 ± 4
Fluo	1.9 ± 0.6	BP	7 ± 3
Pyr	2.0 ± 0.6	DahA	8 ± 4

Table 2. Limits of detection of PAHs by SPME-GC-MS. PDMS 100 µm fiber, extraction time = 30 min, n = 3.

To quantify PAHs by SPME, two methods can be used. On the one hand, a calibration curve can be drawn with different known PAH concentrations in ultrapure water; it is the external calibration. On the other hand, deuterated standards of known concentrations can be added to the samples to deduce the analyte concentrations. In DOM-PAH interaction studies, the internal standards can be used to quantify the total analyte concentrations (free and DOM-bound analytes) since the internal standards that were in our case perdeuterated PAHs have the same behavior in presence of DOM as the corresponding analytes (Figure 3), while external calibration can be used to quantify the free analytes (Poerschmann et al. 1997). Moreover, the use of deuterated internal standards allows to decrease the variabilities on quantification to 5-10%, even for heavy PAHs like benzo[a]pyrene. That is why it would be interesting to be able to use internal calibration to quantify free analytes. Hawthorne et al. (2005) suggested using a deuterated standard that would not bind DOM to quantify the freely dissolved concentrations. Indeed, this compound would have the same behavior towards SPME whatever the quantity of DOM and so the possible variation of its chromatographic area would only be due to the analytical technique. Naphthalene-d8 was chosen to be this standard because its response was the same with or without DOM (Figure 3). These three calibrations (external, internal with corresponding perdeuterated PAHs and internal with naphthalene d8) were validated on spiked waters quantified as if the concentrations of PAHs were unknown. To do that, the recoveries were calculated (ratios of calculated concentrations to theoretical concentrations) for the four PAHs. They ranged from 90 to 110% (variabilities of 2-8%), from 100 to 120% (variabilities of 6-14%) and from 60 to 75% (variabilities of 10-15%) for internal with corresponding perdeuterated PAHs, internal with naphthalene d8 and external calibrations respectively (n = 10).

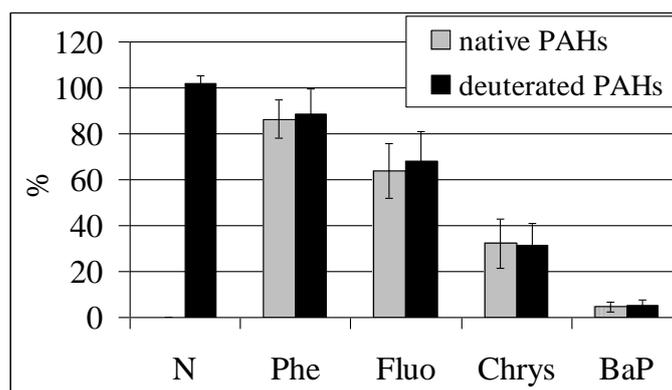


Figure 3. Ratios (expressed in %) of areas between samples with 20 mg.L⁻¹ of DOM (Aldrich Humic acid) and in absence of Aldrich humic acid for native and deuterated PAHs. Extraction time = 30 min, PDMS 100 µm fiber, n=3.

III.2. DOM – PAH interaction studies

III.2.1. By SPME

According to Oomen et al. (2000), two conditions have to be fulfilled to perform freely dissolved contaminant quantification by SPME: 1) the freely dissolved concentrations should not be depleted by the SPME extraction; 2) the matrix should not interfere with the analyte uptake by the fiber. To check that an extraction time of 30 min did not disturb the PAH-DOM equilibrium, an extraction time of 120 min was applied. Indeed, a longer immersion of the fiber could shift bounded PAHs to the free fraction because of depletion of freely dissolved PAHs (Oomen et al. 2000, Gomes et al. 2009). For identical samples and conditions, K_{DOC} values obtained with an extraction of 30 min were lower than the ones at 120 min of extraction (Figure 4). However, statistical tests (two sample t-test, Origin Pro 7.5) showed that this difference was significant only for the three heaviest PAHs at $p = 0.05$.

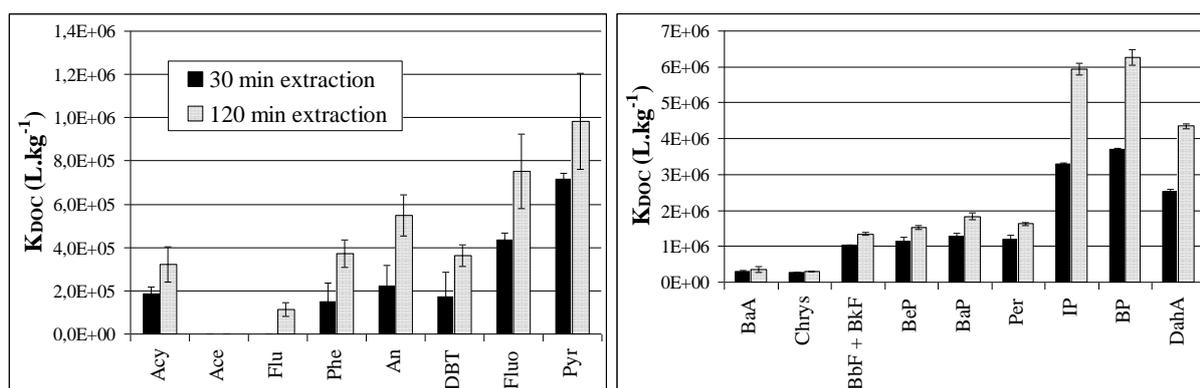


Figure 4. K_{DOC} with 30 and 120 min extraction, $[DOC] = 3.6 \text{ mg.L}^{-1}$, $[PAH]_{total} = 100\text{-}200 \text{ ng.L}^{-1}$ each, n=3.

A shift of PAHs to the free fraction would result in an overestimation of free PAHs and thus an underestimation of the K_{DOC} values at 120 min of extraction. The K_{DOC} values obtained were actually the opposite. Consequently, the PAH-DOM equilibrium was not more disturbed with 120 min than with 30 min of extraction, so it could be assumed that it was not or slightly modified at 30 min. Furthermore,

lower K_{DOC} values at 30 min of extraction could be explained by either an underestimation of the free fraction at 120 min or an overestimation at 30 min. The first hypothesis could be the result of a blocking of the PAH absorption by the fiber due to absorption or adsorption of DOM on it. However, as adsorption is a fast phenomenon, it is unlikely to be higher at 120 min than at 30 min of extraction. Moreover, according to Urrestarazu Ramos et al. (1998), the binding of DOM to the fiber would result in an overestimation of the free fraction because of the extra amount of chemical associated with the humic acids that are bound to the fiber. Absorption/adsorption of DOM could increase with the time of extraction, like for PAHs, but it would let suppose that the fiber would be saturated with DOM to obstruct the PAH absorption at 120 min, which is unlikely to occur. The second hypothesis of an overestimation of the free fraction with a 30 min extraction seems more realistic. It could be explained by an increase of PAH kinetics towards the fiber when DOM is added which could result in an overestimation of the free fraction since we were not in sample-fiber equilibrium condition (Haftka et al. 2008). This hypothesis can be supported thanks to the comparison of GC-MS areas obtained with 30 and 120 min of extraction, with and without DOM. Indeed, for compounds which have achieved equilibrium within 30 min, areas are the same at 30 and 120 min of extraction, whereas for the other compounds, areas are higher after 120 min than after 30 min. Therefore, the higher the ratio area at 120 min over area at 30 min (A_{120}/A_{30}), the farther from the equilibrium at 30 min. As this fact is true in absence as well in presence of DOM, the comparison of the ratios A_{120}/A_{30} with and without DOM allows to determine if the presence of DOM affects the kinetics of PAH absorption by the fiber. Indeed, if DOM enhances PAH absorption as described by Haftka et al. (2008), equilibrium is reached faster in presence of DOM and thus the ratio A_{120}/A_{30} is lower in presence than in absence of DOM. The Figure 5 illustrates this hypothesis and shows that the bigger the A_{120}/A_{30} ratio without DOM, the higher the overestimation at 30 min of extraction.

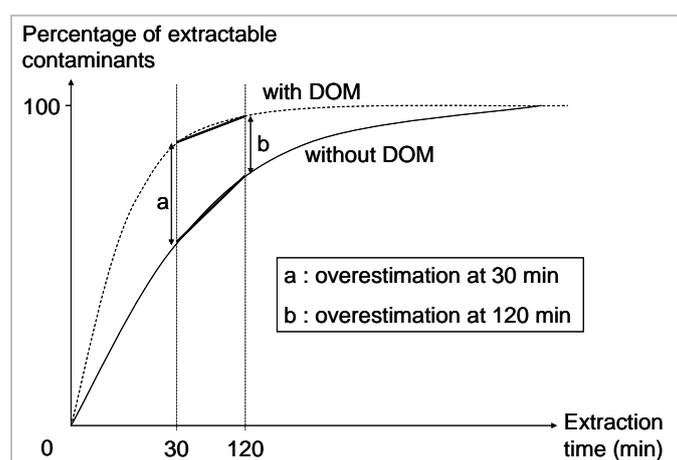


Figure 5. Schema of PAH absorption by SPME in presence and in absence of DOM with increasing extraction time (adapted from Haftka et al. 2008)

For a concentration of Aldrich humic acid of 3.5 mg.L^{-1} of C and a total concentration of PAHs of $100 - 200 \text{ ng.L}^{-1}$ each, the overestimation of free PAHs was calculated to be lower than 5% for PAHs with m/z from 128 to 166, from 10 to 20% for m/z from 178 to 228, from 30 to 45% for m/z 252 and from 75 to 90% for the three heaviest PAHs. However, when K_{DOC} values are calculated thanks to

equations 2 and 3, so with the difference between the total and the freely dissolved PAH concentrations, the lower the free PAH concentrations, so the stronger the interactions, the lower the error on the bounded PAH fraction. Therefore, the heavier the PAHs are, the higher the error on the free fraction is and the lighter the PAHs are, the higher the error on the bounded fraction is. Consequently errors due to the presence of DOM on K_{DOC} values are nearly the same for every PAH and a little lower on medium PAHs. Nevertheless, this error remains acceptable since no statistically significant differences between 30 and 120 min were shown. So we have chosen an extraction time of 30 min for the following studies of interactions, especially since being at sample-fiber equilibrium is impossible for heavy PAHs because it can be necessary to extract during several days (Poerschmann 2000) and this must disturb the PAH-DOM equilibrium.

To study interactions between PAHs and Aldrich humic acid, K_{DOC} values were measured for each of the four PAHs, individually, in a mixture of 4 PAHs (Phe, Fluo, Chrys, BaP) and in a mixture of 19 PAHs using equation 4 and the Stern-Volmer graph. The most unexpected result was obtained by the comparison of K_{DOC} values for each PAH individually with the corresponding ones in both mixtures. For the 4 PAHs studied, K_{DOC} values were slightly higher or equivalent when the contaminant was alone in the sample in comparison with the mixture of 4 PAHs and generally lower in the mixture of 19 PAHs (Table 3).

	Constant total PAH concentration						Constant DOM concentration			
	PAH separately		4 PAHs together		19 PAHs together		19 PAHs		19 PAHs with light PAHs more abundant than heavy ones	
	Log K_{DOC}	R ²	Log K_{DOC}	R ²	Log K_{DOC}	R ²	Log K_{DOC}	R ²	Log K_{DOC}	R ²
Phe	4.2 ± 0.1(8)	0.53	4.3 ± 0.1(9)	0.55	3.7 ± 0.4(9)	0	3.4 ± 0.1(6)	0.73	4.5 ± 0.1(6)	0.84
Fluo	4.9 ± 0.1(9)	0.06	5.0 ± 0.1(9)	0.77	4.6 ± 0.1(9)	0.68	4.0 ± 0.1(7)	0.87	4.9 ± 0.1(8)	0.98
Pyr					4.6 ± 0.1(9)	0.66	4.3 ± 0.1(7)	0.96	4.9 ± 0.1(8)	0.95
Chrys	5.4 ± 0.1(9)	0.78	5.5 ± 0.1(9)	0.91	5.3 ± 0.1(9)	0.89	4.9 ± 0.1(8)	0.97	5.2 ± 0.1(8)	0.74
BaP	6.7 ± 0.1(9)	0.93	6.4 ± 0.1(9)	0.93	6.2 ± 0.1(9)	0.95	5.7 ± 0.1(8)	0.94	6.3 ± 0.1(8)	0.96

Table 3. Log K_{DOC} for five PAHs calculated thanks to Stern-Volmer equations for experiments with constant total PAH concentration and isotherm equations with constant DOM concentrations; the number of points is indicated in brackets. *Stern-Volmer graphs were used when possible (with variation of DOM concentrations) to minimize error on K_{DOC} values. Indeed, as it is not necessary to subtract the free concentration from the total concentration of PAHs in the Stern-Volmer equation, the error is minimized in comparison with isotherm graphs.*

For phenanthrene, which was the PAH the less associated to DOM, the decrease of interactions in presence of 19 PAHs was such that the addition of 20 mg.L⁻¹ of DOM did not cause a significant decrease of the free fraction of phenanthrene. The effect of the presence of PAHs was all the more significant that the PAH was heavy (Figure 6 for benzo[a]pyrene).

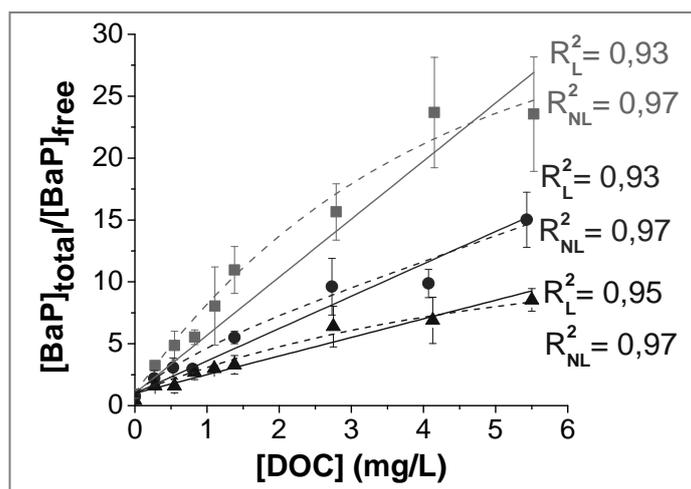


Figure 6. Stern-Volmer graph for benzo[a]pyrene, $[\text{PAH}] = 1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ each, $n=3$. ■: benzo[a]pyrene only, ●: 4 PAH mixture, ▲: 19 PAH mixture, $R_L^2 = R^2$ for the linear fit and $R_{NL}^2 = R^2$ for the non-linear fit

These results showed that competition must occur between PAHs towards DOM since no competition or saturation occurred in the PDMS fiber at the studied PAH concentration. This conclusion was comforted by another experiment: chrysene-DOM interactions were studied thanks to Stern-Volmer plots for this PAH individually but in one series, a mixture of 5 deuterated PAHs was added whereas in the other series, a mixture of 19 deuterated PAHs was added. Log K_{DOC} values were 5.4 ± 0.1 in the first series and 5.1 ± 0.1 in the second one. This finding shows that the effect of the presence of other PAHs and maybe of other contaminants can thus be significant for the quantification of interactions. Moreover, it also shows that the addition of deuterated standards, which is necessary for the internal quantification of total PAH concentrations, can disturb PAH-DOM equilibrium, so the internal standards must be added at the lowest concentrations as possible. Pan et al. (2007a) also found that competition occurs between PAHs by studying the behavior of pyrene with and without phenanthrene. However, the concentrations in their work ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for pyrene and phenanthrene respectively) and to a lesser extent in this study were high ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 19 native PAHs and 19 deuterated PAHs in our case) and not representative of natural environments since usually PAHs are far less concentrated and the light PAHs are more present in water than the heavier ones. So, to confirm the competition between PAHs, it was undertaken to study the evolution of K_{DOC} when the concentration of DOM remained constant (around $3.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) while the concentration of PAHs varied on a wide scale (8 triplicates from 10 to $1000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, mixture of 19 PAHs). Moreover, the comparison between the presence of 19 PAHs at the same concentrations and another series with concentrations of heavy PAHs lower than light PAHs was also performed to bring information about the interactions in natural environments. To make the comparison between the two series possible, total concentrations of benzo[a]pyrene were kept strictly the same (8 triplicates from $0.02 - 0.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in both cases (PAHs at the same concentrations versus light PAHs more concentrated than heavy PAHs) while light PAHs were approximately tenfold more concentrated and heavier PAHs fourfold less concentrated. These two series supported the theory of competition since

all of each PAH had K_{DOC} values higher when light PAHs were more abundant than heavy ones with a factor of about 10 for phenanthrene and 2 to 4 for fluoranthene, chrysene and benzo[a]pyrene K_{DOC} values (Table 3). Moreover, for these 2 series and the Stern-Volmer plots, it seemed that a plateau was formed at high concentrations of PAH and DOC (Figure 6). A decrease of partition coefficient with humic acid concentration was previously reported by Carter and Suffet (1982) and Landrum et al. (1984) while interactions were studied thanks to dialysis and reverse phase techniques respectively. They attributed their results to possible conformational differences of the humic acids altering the pollutant binding and/or competition of the humics for binding sites on other humics. These conclusions could also explain our results in addition to the competition between PAHs themselves towards DOM. The non linear trends of interaction were also demonstrated by the Stern-Volmer graphs since non linear fitted better than linear curves, even though quite large uncertainties (Figure 6). However, if we used linear fits to calculate K_{DOC} values to compare them with literature values, they appear to be in good agreement for phenanthrene and pyrene with commercial humic acids (Table 4). However, data about heavier PAHs were not reported in literature and cannot be discussed.

Humic acid	This study (with linear fits)			Perminova et al. (1999)	Gauthier et al. (1987)	Doll et al. (1999)		Kopinke et al. (2000)	
	Aldrich			Aldrich	Aldrich	Aldrich		Roth	
Technique	FQ	R^2	SPME	FQ	FQ	FQ	SPME	FQ	SPME
Phe	4.51 ± 0.03	0.93	3.3-4.5			5.11 ± 0.03	4.02 ± 0.03	4.7 ± 0.1	4.3 ± 0.1
Fluo			4.0-4.9	5.26 ± 0.05					
Pyr	5.48 ± 0.01	0.99	4.3-4.9	5.36 ± 0.06	5.02			5.5 ± 0.1	4.9 ± 0.1
Chrys	6.03 ± 0.01	0.99	4.9-5.5						
BaP	6.87 ± 0.02	0.95	5.7-6.7						

Table 4. $\log K_{\text{DOC}}$ values for commercial humic acids in this study and in literature, FQ = fluorescence quenching

As shown by many papers (Burkhard 2000, Mott 2002), the DOM-PAH partition coefficient and the hydrophobicity of PAHs are well correlated. In this study, the relationships obtained are the following: $\log K_{\text{DOC}} = 0.9 \pm 0.1 \log K_{\text{OW}}$ for both series with all PAHs in the same proportions and $\log K_{\text{DOC}} = 1.0 \pm 0.1 \log K_{\text{OW}}$ with light PAHs more abundant (Figure 7), which are in good agreement with the relationships from the literature (Burkhard 2000, Mott 2002).

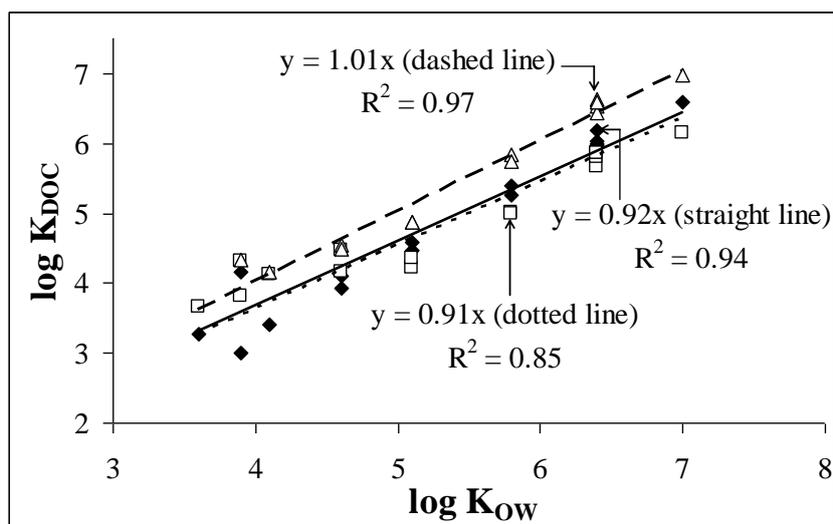


Figure 7. Correlation between DOM-PAH partition coefficients and hydrophobicity of PAHs. \square : constant [DOC] (fitted by dotted line), \blacklozenge : constant [PAHs] (fitted by straight line), \triangle : constant [DOC] with light PAHs more abundant (fitted by dashed line)

III.2.2. By fluorescence quenching

The Stern-Volmer equations were plotted for the four PAHs according to equation 5 - with the corrected fluorescence (F_{corr}) instead of the fluorescence F - to calculate the K_{DOC} . It appeared that, for the four PAHs, the ratio F_0/F_{corr} increased linearly with DOM concentrations (Figure 8).

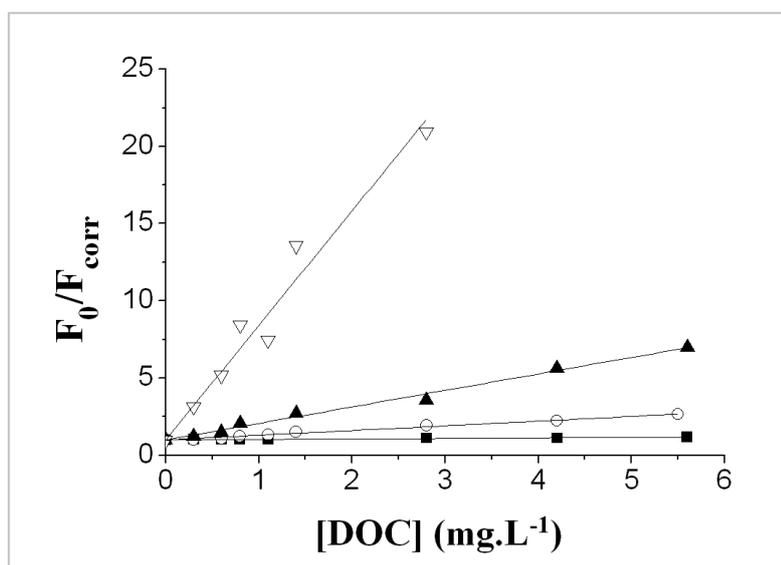


Figure 8. Stern-Volmer graph of the PAH fluorescence quenching. \blacksquare : phenanthrene, \circ : pyrene, \blacktriangle : chrysene, ∇ : benzo[a]pyrene

The K_{DOC} values and regression coefficients are given in Table 4. The good regression coefficients ($R^2 \geq 0.93$) of the linear fits imply that the observed quenching is either static or dynamic, but not both (Borisover et al. 2006). Indeed, the quenching can also be dynamic if a quencher collides

with the fluorophore during the lifetime of its excited state and nonradiatively deactivates this state (Gauthier et al. 1986). Usually, this quenching occurs with dioxygen molecules which have a diffusion rate in water of $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Albani 2007). Consequently, the bimolecular quenching rate constant (K_q) was calculated for each PAH and compared with the molecular oxygen K_q value. To do that, it is necessary to know both the molecular mass of the quencher and the lifetime fluorescence of PAHs in the absence of a quencher. A value of 4000 Da was used for the average molecular weight of Aldrich humic acid (Pitois et al. 2008), and the fluorescence decay times used were the ones measured by Karlitschek et al. (1998) in aqueous samples. It follows that K_q were here from $3.5 \cdot 10^{12}$ to $1.1 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, which are largely more than the maximal K_q observed for dioxygen in aqueous solution. As a result, the observed quenching is confirmed to be static quenching, due to the formation of a complex between PAHs and Aldrich humic acid and interaction appeared to be linear for each PAH. The K_{DOC} values are in the same range as the ones found in the literature by the same technique for the same commercial humic acid (Table 4), but the comparison remains difficult, especially for heavy PAHs, for which very few or no data are available.

III.2.3. By dialysis

Dialysis was first performed with PAHs in ultrapure water only (without DOM) to check the time necessary to achieve equilibrium in PAH concentrations inside and outside the bag. The problem was that the mass recoveries after 48h were very low: from 1 (BaP) to 8% (Phe) when PAHs were added outside the bag and from 0 (BaP) to 50% (Phe) when they were added inside the bag. So extractions of the two compartments, the membrane and the inner surface of the bottles were made. The results showed that more than 90% of PAHs were generally adsorbed on the dialysis membrane.

Another test was performed with naphthalene at high concentration ($6.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) added inside the bag to check the equilibrium time and the adsorption rate by fluorescence (instead of LLE-GC-MS). Results showed that after 24h the naphthalene concentrations were pretty much the same inside and outside the bag and the fluorescence intensities were equivalent to initial intensities divided by the dilution factor. This showed that the adsorption of naphthalene was negligible, but, because of the high concentration of naphthalene, to be significant the loss should be approximately $1 \mu\text{g}$ (which is equivalent to a decrease of 1% of fluorescence intensity). However, at environmental concentrations, a $1 \mu\text{g}$ adsorption could represent an important loss and recoveries could be very bad. Nevertheless, for the heavier PAHs, this test at high concentrations was not possible due to the aqueous solubility of compounds which is less than $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for chrysene and benzo[a]pyrene. In these conditions, it seemed impossible to continue any studies of interactions of PAHs with DOM with this technique at environmentally relevant concentrations.

III.2.4. Comparison of techniques

Among the three techniques studied here, dialysis was the least useful for the study of the interactions of DOM with PAHs because of adsorption problems of PAHs on the membrane. Many works have been done with PAHs by dialysis but most of the time PAHs were quantified by radioactivity (de Paolis and Kukkonen 1997, Akkanen and Kukkonen 2001, Lou et al. 2006), which is a more sensitive technique than a traditional liquid-liquid extraction and a GC-MS analysis. Moreover, concentrations of PAHs were rarely in the range of the ones found in natural waters (Landrum et al. 1984, Akkanen et al. 2005). Dialysis may thus be applicable to the study of DOM-PAH interactions but not in environmental conditions (in terms of PAH concentrations) and only with light PAHs.

The fluorescence quenching is a high-performance technique for the study of interactions between PAHs and DOM. It is a very useful technique since it is fast, needs only small quantities of sample, requires neither separation between PAHs and DOM nor calculation of free and total PAH concentrations. Nevertheless, it is limited to low DOM concentrations because of the inner filter effect. Furthermore, the stronger the interactions, the faster the PAH fluorescence is inhibited; so the most hydrophobic PAHs cannot be studied with a high concentration of DOM (more than 3 mg.L⁻¹ of DOM inhibited totally the benzo[a]pyrene fluorescence). On the other hand, the lightest interactions (e.g. phenanthrene) were fully visible with this technique and the regression coefficient of the Stern-Volmer equation was quite good.

Fluorescence quenching and SPME seem to be the best techniques but only SPME is able to analyze the interactions on samples directly taken from the field (without DOM or PAH addition). Indeed, by fluorescence quenching, it is necessary to know the fluorescence intensity of PAHs in the presence and absence of DOM, so PAHs have to be added to natural DOM to calculate the K_{DOC} values. Whereas, with SPME, it is possible to calculate the K_{DOC} values of PAHs “naturally” present in the environmental samples. Moreover, the sensitivity of SPME is far better than that of fluorescence quenching, especially for PAHs which have strong interactions, since a signal was obtained for 1 µg.L⁻¹ of BaP in presence of 5 mg.L⁻¹ of DOC in SPME-GC-MS but not with the fluorescence technique. Last but not least, fluorescence quenching is mainly applicable to fluorescent contaminants given that for other compounds, the quenching of DOM fluorescence can occur only if the complex contaminant-DOM is formed with fluorescent groups of DOM.

As far as K_{DOC} values are concerned, the ones measured by fluorescence quenching are generally higher than the ones calculated by other methods (Doll et al. 1999, Kopinke et al. 2000). This was also shown in this study when individual PAHs with linear approximations were used for the calculation of the K_{DOC} value by SPME. However, if we consider only the first part of the Stern-Volmer curve (before the plateau), the K_{DOC} values (ranging from 4.5 to 6.8) are closer to fluorescence quenching ones (ranging from 4.51 to 6.87, Table 4). The linearity of interactions observed with fluorescence quenching is hard to explain whereas the non-linearity was shown for SPME in the same

conditions. The addition of deuterated standards in SPME samples could justify the slight differences of K_{DOC} values with fluorescence quenching and perhaps the modification of the linearity. To confirm this, it would be necessary to analyze samples without deuterated PAHs to study interactions by SPME, but without internal standards the total PAH concentrations could not be measured accurately and the free PAH concentrations could not be calculated thanks to deuterated naphthalene, which help to improve the reproducibility of data. The non-linearity observed by fluorescence quenching can also be due to the insensitivity of Stern-Volmer plot to detect non-linearity since Pan et al. (2007b) have shown that an apparently linear Stern-Volmer plot does not necessarily reflect a linear interaction between PAHs and DOM. Moreover, higher values of K_{DOC} measured by spectrofluorometry could be due to the temperature since fluorescence spectra were acquired at 20 °C while SPME measurements were performed at 40 °C. Unfortunately, SPME could not be used at 20 °C and fluorescence spectra could not be acquired at 40 °C due to technical limitations with our apparatus. However, SPME at 30 °C showed an increase of K_{DOC} values in comparison with measurements at 20 °C; therefore temperature could partly explain the discrepancies.

IV. Conclusion

In this study three techniques for the study of PAH-DOM interactions were developed and, except for dialysis experiments, allowed the comparison of K_{DOC} values obtained for the same samples. SPME appeared to be the most appropriate tool to study interactions between organic contaminants and DOM: it is fast, sensitive, solvent free, permits the study of PAH-DOM interactions in great detail since it does not disturb interaction equilibrium. Moreover, this technique requires only a few milliliters of samples and no separation of free and bound contaminants is required; thus it is easily applicable to environmental samples. The fluorescence quenching is also useful to the study of interactions but its application to natural samples is less easy. Finally, these two techniques are well complementary since SPME is more adapted to the study of strong interactions with low PAH and high DOC concentrations while the fluorescence quenching is helpful for weak interactions and high PAH and low DOC concentrations. These techniques permitted the calculation of many K_{DOC} values for 18 PAHs and it was the first time for some of them (especially for heavy PAHs).

This study showed that competition occurs between PAHs, deuterated PAHs and DOM, and thus maybe with other contaminants potentially present in samples. Therefore, the conditions of concentrations of PAHs, deuterated PAHs and DOM are very important to take into consideration when studying PAH-DOM interactions, which implies that the comparison between different studies require detailed information about sample conditions.

Acknowledgements

"Region Aquitaine", FEDER, ORQUE program (CPER) and INSU (IMOTOX project) are acknowledged for financial support and the French Ministry of Research for the PhD grant of C. de Perre.

References

- Abrajano Jr, T.A., Yan, B., Song, J., Bopp, R., O'Malley, V., Heinrich, D.H. & Karl, K.T.** (2003) 9.13 High-Molecular-Weight Petrogenic and Pyrogenic Hydrocarbons in Aquatic Environments. In *Treatise on Geochemistry*, Vol. 9, pp. 1-50. Oxford: Pergamon.
- Akkanen, J. & Kukkonen, J.V.K.** (2001) Effects of water hardness and dissolved organic material on bioavailability of selected organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(10), 2303-2308.
- Akkanen, J., Penttinen, S., Haitzer, M. & Kukkonen, J.V.K.** (2001) Bioavailability of atrazine, pyrene and benzo[a]pyrene in European river waters. *Chemosphere* **45**(4-5), 453-462.
- Akkanen, J., Lyytikäinen, M., Tuikka, A. & Kukkonen, J.V.K.** (2005) Dissolved organic matter in pore water of freshwater sediments: Effects of separation procedure on quantity, quality and functionality. *Chemosphere* **60**(11), 1608-1615.
- Albani, J.R.** (2007) *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Blackwell Publishing.
- Borisover, M., Laor, Y., Bukhanovsky, N. & Saadi, I.** (2006) Fluorescence-based evidence for adsorptive binding of pyrene to effluent dissolved organic matter. *Chemosphere* **65**(11), 1925-1934.
- Burkhard, L.P.** (2000) Estimating Dissolved Organic Carbon Partition Coefficients for Nonionic Organic Chemicals. *Environmental Science and Technology* **34**(22), 4663-4668.
- Carter, C.W. & Suffet, I.S.** (1982) Binding of DDT to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology* **16**(11), 735-740.
- De Paolis, F. & Kukkonen, J.** (1997) Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere* **34**(8), 1693-1704.
- Doll, T.E., Frimmel, F.H., Kumke, M.U. & Ohlenbusch, G.** (1999) Interaction between natural organic matter (NOM) and polycyclic aromatic compounds (PAC) – comparison of fluorescence quenching and solid phase micro extraction (SPME). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **364**(4), 313-319.
- Durjava, M.K., ter Laak, T.L., Hermens, J.L.M. & Struijs, J.** (2007) Distribution of PAHs and PCBs to dissolved organic matter: High distribution coefficients with consequences for environmental fate modeling. *Chemosphere* **67**(5), 990-997.
- Gauthier, T.D., Shane, E.C., Guerin, W.F., Seitz, W.R. & Grant, C.L.** (1986) Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology* **20**, 1162-1166.

- Gauthier, T.D., Seitz, W.R. & Grant, L.** (1987) Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on Pyrene Koc values. *Environmental Science and Technology* **21**(3), 243-248.
- Gomes, R., Nogueira, R., Oliveira, J., Peixoto, J. & Brito, A.** (2009) Determination of total and available fractions of PAHs by SPME in oily wastewaters: overcoming interference from NAPL and NOM. *Environmental Science and Pollution Research* **16**(6), 671-678.
- Haftka, J.J.H., Parsons, J.R., Govers, H.A.J., Ortega-Calvo, J-J.** (2008) Enhanced kinetics of Solid-Phase Microextraction and biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the presence of Dissolved Organic Matter. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(7), 1526-1532.
- Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W. & Steinberg, C.** (1998) Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – a review-. *Chemosphere* **37**(7), 1335-1362.
- Hawthorne, S.B., Grabanski, C.B., Miller, D.J. & Kreitinger, J.P.** (2005) Solid-Phase Microextraction Measurement of Parent and Alkyl Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Milliliter Sediment Pore Water Samples and Determination of K_{DOC} Values. *Environmental Science and Technology* **39**(8), 2795-2803.
- Heringa, M.B. & Hermens, J.L.M.** (2003) Measurement of free concentrations using negligible depletion-solid phase microextraction (nd-SPME). *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**(9), 575-587.
- Karlitschek, P., Lewitzka, F., Bünting, U., Niederkrüger, M. & Marowsky, G.** (1998) Detection of aromatic pollutants in the environment by using UV-laser-induced fluorescence. *Applied Physics B: Lasers and Optics* **67**(4), 497-504.
- Kopinke, F.-D., Georgi, A. & Mackenzie, K.** (2000) Sorption and Chemical Reactions of PAHs with Dissolved Humic Substances and Related Model Polymers. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **28**(7), 385-399.
- Kukkonen, J. & Pellinen, J.** (1994) Binding of organic xenobiotics to dissolved organic macromolecules: comparison of analytical methods. *The Science of the Total Environment* **152**, 19-29.
- Landrum, P.F., Nihart, S.R., Eadie, B.J. & Gardner, W.S.** (1984) Reverse-phase separation method for determining pollutant binding to Aldrich humic acid and dissolved organic carbon of natural waters. *Environmental Science and Technology* **18**(3), 187-192.
- Lord, H. & Pawliszyn, J.** (2000) Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* **885**(1-2), 153-193.
- Lou, T., Xie, H., Chen, G. & Gagne, J.-P.** (2006) Effects of photodegradation of dissolved organic matter on the binding of benzo(a)pyrene. *Chemosphere* **64**(7), 1204-1211.
- Lüers, F. & ten Hulscher, T.E.M.** (1996) Temperature effect on the partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons between natural organic carbon and water. *Chemosphere* **33**(4), 643-657.

- MacDonald, B.C., Lvin, S.J. & Patterson, H.** (1997) Correction of fluorescence inner filter effects and the partitioning of pyrene to dissolved organic carbon. *Analytica Chimica Acta* **338**(1-2), 155-162.
- Mott, H.V.** (2002) Association of hydrophobic organic contaminants with soluble organic matter: evaluation of the database of Kdoc values. *Advances in Environmental Research* **6**(4), 577-593.
- Oomen, A.G., Mayer, P. & Tolls, J.** (2000) Nonequilibrium Solid-Phase Microextraction for Determination of the Freely Dissolved Concentration of Hydrophobic Organic Compounds: Matrix Effects and Limitations. *Analytical Chemistry* **72**(13), 2802-2808.
- Ouyang, G., Chen, Y., Setkova, L. & Pawliszyn, J.** (2005) Calibration of solid-phase microextraction for quantitative analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1097**(1-2), 9-16.
- Pan, B., Ghosh, S. & Xing, B.** (2007a) Nonideal Binding between Dissolved Humic Acids and Polyaromatic Hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* **41**(18), 6472-6478.
- Pan, B., Xing, B., Liu, W., Xing, G. & Tao, S.** (2007b) Investigating interactions of phenanthrene with dissolved organic matter: Limitations of Stern-Volmer plot. *Chemosphere* **69**(10), 1555-1562.
- Parker, C.A.** (1968) *Photoluminescence of solutions*. Amsterdam - London - New York: Elsevier Publishing Company.
- Pawliszyn, J. & Pedersen-Bjergaard, S.** (2006) Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends. *Journal of Chromatographic Science* **44**(6), 291-307.
- Perminova, I., Grechishcheva, N. & Petrosyan, V.** (1999) Relationships between Structure and Binding Affinity of Humic Substances for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relevance of Molecular Descriptors. *Environmental Science and Technology* **33**, 3781-3787.
- Pitois, A., Abrahamsen, L.G., Ivanov, P.I. & Bryan, N.D.** (2008) Humic acid sorption onto a quartz sand surface: A kinetic study and insight into fractionation. *Journal of Colloid and Interface Science* **325**(1), 93-100.
- Poerschmann, J., Zhang, Z., Kopinke, F.D. & Pawliszyn, J.** (1997) Solid Phase Microextraction for Determining the Distribution of Chemicals in Aqueous Matrices. *Analytical Chemistry* **69**(4), 597-600.
- Poerschmann, J.** (2000) Sorption of hydrophobic organic compounds on nonpolar SPME fibers and dissolved humic organic matter - Part III: Application of the solubility parameter concept to interpret sorption on solid phase microextraction (SPME) fiber coatings. *Journal of Microcolumn Separations* **12**(12), 603-612.
- Schlautman, M.A. & Morgan, J.J.** (1993) Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology* **27**(5), 961-969.
- Seibel, F., Heidenreich, S. & Frimmel, F.H.** (1996) Interactions of humic substances and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) during the biodegradation of PAHs. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **24**(6), 260-266.

- Setkova, L., Risticvic, S., Linton, C.M., Ouyang, G., Bragg, L.M. & Pawliszyn, J.** (2007) Solid-phase microextraction-gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry utilized for the evaluation of the new-generation super elastic fiber assemblies. *Analytica Chimica Acta* **581**(2), 221-231.
- Urrestarazu Ramos, E., Meijer, S.N., Vaes, W.H.J., Verhaar, H.J.M. & Hermens, J.L.M.** (1998) Using Solid-Phase Microextraction To Determine Partition Coefficients to Humic Acids and Bioavailable Concentrations of Hydrophobic Chemicals. *Environmental Science and Technology* **32**(21), 3430-3435.
- Wang, C.X., Yediler, A., Peng, A. & Kettrup, A.** (1995) Photodegradation of phenanthrene in the presence of humic substances and hydrogen peroxide. *Chemosphere* **30**(3), 501-510.
- Woolgar, P.J. & Jones, K.C.** (1999) Studies on the Dissolution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Contaminated Materials Using a Novel Dialysis Tubing Experimental Method. *Environmental Science and Technology* **33**(12), 2118-2126.
- Yates, L.M.I., Engerbretson, R.R., Haakenson, T.J. & Wandruszka, R.V.** (1997) Immobilization of aqueous pyrene by dissolved humic acid. *Analytica Chimica Acta* **356**, 295-300.

Factorial designs for better understanding of the interactions between Dissolved Organic Matter (DOM) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

Chloé de Perre, Karyn Le Ménach, Anne-Marie Dorthe, Christian Béchemin, Edith Parlanti, Hélène Budzinski

Abstract

Dissolved organic matter (DOM) in aquatic environments is well known to play an important role in the fate of organic pollutants. In this study, the role of environmental parameters (salinity, pH, DOM and contaminant concentrations) on interactions between DOM and 15 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) was investigated. Three different DOM types were used: Aldrich humic acid, a sample from a river and DOM coming from algae culture to model respectively humified terrigenous DOM, aquatic DOM with mainly fulvic acids and fresh material. The partitioning coefficients (K_{DOC}) of each pollutant to DOM were calculated thanks to Solid Phase Microextraction coupled to Gas Chromatography and Mass Spectrometry (SPME-GC-MS). DOM samples were characterized by their optical properties by means of excitation-emission matrix (EEM) spectroscopy and UV-visible absorption. Full and fractional factorial designs were performed to correlate environmental parameters to K_{DOC} values and optical properties of DOM.

It was shown that the strength of interactions highly depends on DOM origin and structure and on type of PAHs. Humification and aromaticity of DOM were not the driving factors of interactions and fresh material of aquatic DOM could have stronger interactions with PAHs than humified aquatic fulvic acids. Salinity was not an important factor since it modified significantly neither K_{DOC} values nor optical properties of DOM. On the contrary, pH and DOC concentrations could strongly affect interactions and had appeared to be interrelated for some samples. PAH concentration was shown to affect interactions: K_{DOC} values tended to decrease at high concentrations of PAHs. A negative correlation was found between K_{DOC} variations and E_4/E_6 ratio variations (the ratio of absorbance at 465 nm (E_4) over at 665 nm (E_6)), especially for low molecular weight PAHs. A stronger relationship was also observed between K_{DOC} variations and α'/α fluorescence intensity ratio variations.

Plans d'expériences appliqués aux interactions Matière Organique Dissoute (MOD) – Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Résumé

La Matière Organique Dissoute (MOD) joue un rôle important sur le devenir des polluants organiques dans l'environnement aquatique. Dans cette étude, le rôle des paramètres environnementaux (salinité, pH, concentrations en MOD et en contaminants) sur les interactions entre la MOD et 15 composés appartenant à la classe des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) a été examiné. Trois sortes de MOD ont été utilisées : de l'acide humique Aldrich, un échantillon d'eau de rivière et de la MOD provenant d'une culture algale ; ceci afin de modéliser respectivement le comportement de la MOD terrigène humifiée, de la MOD d'origine aquatique contenant majoritairement des acides fulviques et du matériel organique récent. Les coefficients de partition eau – carbone organique dissous (K_{DOC}) ont été calculés pour chaque polluant grâce à la Micro-Extraction sur Phase Solide couplée à la Chromatographie en phase Gazeuse et à la Spectrométrie de Masse (SPME-GC-MS). Les propriétés optiques des échantillons de MOD ont été caractérisées au moyen de la spectrofluorimétrie tridimensionnelle et de l'absorption UV-visible. Des plans d'expériences factoriels complets et fractionnaires ont été utilisés pour corrélérer les paramètres environnementaux aux valeurs de K_{DOC} et aux propriétés optiques de la MOD.

Il a été montré que la force des interactions dépend fortement de l'origine et de la structure de la MOD et également du type de HAP. L'humification et l'aromaticité de la MOD n'étaient pas les facteurs contrôlant les interactions et le matériel frais de la MOD aquatique pourraient avoir des interactions plus fortes avec les HAP que les acides fulviques humifiés. La salinité ne s'est pas avérée être un facteur important puisque ni les K_{DOC} ni les propriétés optiques de la MOD n'ont été significativement modifiés. Par contre, le pH et les concentrations en Carbone Organique Dissous (COD) pourraient affecter fortement les interactions et pourraient être interdépendants pour certains échantillons. Il a été montré que les concentrations en HAP pouvaient affecter les interactions : les K_{DOC} ont tendance à diminuer à fortes concentrations en HAP. Une corrélation négative a été mise en évidence entre les variations des K_{DOC} et celles des rapports E_4/E_6 (rapport de l'absorbance à 465 nm (E_4) sur celle à 665 nm (E_6)) et α'/α (rapport d'intensités de fluorescence des maxima des bandes α' et α).

I. Introduction

Natural aqueous environments are constituted of water but also of many organic and inorganic compounds which have a natural or anthropogenic origin. The behavior of contaminants in water can be influenced by the presence of ions, organic matter or other contaminants. Organic matter, which is composed for an important part of macromolecules coming from animal and vegetable degradation, has been shown to be fundamental in the study of transport and fate of pollutants. Indeed, the presence of these organic macromolecules can modify the transport, bioavailability, degradation or toxicity of inorganic or organic contaminants by interacting with them (Haitzer et al. 1998, Wang et al. 1995, Bejarano et al. 2005). In order to improve the comprehension of these interactions, the study of properties of the organic matter is essential on the one hand, and the measurement of the contaminant partition has to be the most accurate as possible on the other hand. The study of these interactions faces multiple challenges since both analysis of organic matter and analysis of contaminants need appropriate advanced tools and on top of that, these analyses should not modify or interfere with the interactions. This challenge is far more complicated when these interactions are applied to organic contaminants, which are of the same nature as organic matter. To complicate matters further, organic matter and contaminants are both present at trace levels (of the order of mg.L^{-1} and ng.L^{-1} respectively) in aquatic environments. So, the use of sensitive and reliable tools is a strong necessity.

In this paper, we focused on the study of the effect of environmental parameters on the strength of interactions between Dissolved Organic Matter (DOM) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). We aimed at highlighting environmental parameters which influence these interactions and at understanding how they modify interactions and/or DOM properties. To achieve this knowledge, UV-visible spectrophotometry and Excitation-Emission Matrix (EEM) spectroscopy were used for the characterization of DOM and PAHs were analyzed by Solid Phase Microextraction (SPME) coupled to Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS). EEM spectroscopy is a powerful tool for the study of natural DOM at trace levels because of its high sensitivity and the low sample volume needed. For the same reasons, SPME-GC-MS was chosen for the analysis of PAHs, especially since it allows the quantification of both freely dissolved and DOM-bound PAH concentrations simultaneously, with a negligible disturbance of the equilibrium DOM-PAH (Poerschmann et al. 1997, Heringa and Hermens 2003, de Perre et al. 2009).

Among all the parameters that can be involved in the fate of organic contaminants, a few of them were shown to have an effect on their interactions with DOM. For instance, the presence of divalent and trivalent cations was demonstrated to influence interactions between pyrene and hydrophobic acids (Polubesova et al. 2007). Schlautman and Morgan (1993) observed a decrease of K_{DOC} of pyrene and anthracene when salinity increased and this diminution depended on pH and humic substances. Gauthier et al. (1986) found an opposite effect of salinity on pyrene-DOM interactions and a small effect of pH contrary to Pan et al. (2007) who observed a significant influence

of pH on PAH-DOM interactions. DOM properties (aromaticity, polarity, molecular weight, spatial conformation, concentration...) were also shown to affect these interactions (Perminova et al. 1999, Pan et al. 2008a, Kopinke et al. 2001). Contaminant properties are also important since usually more hydrophobic PAHs are considered to have stronger interactions with DOM (McCarthy and Jimenez 1985, Georgi et al. 2002). However Akkanen et al. (2001) showed that the behavior of PAHs could be more complex in natural waters since they found stronger interactions for pyrene than for benzo[a]pyrene with some specific samples. It was shown that the modification of contaminant-DOM interactions by environmental parameters was usually due to a modification of DOM structure (Schlautman and Morgan 1993, Pan et al. 2008a). Therefore, many parameters were found to affect the interactions between PAHs and DOM but they were usually studied separately and by considering only one or two molecules as model of all PAHs. In this paper, we got interested in the study of the effect of four parameters (salinity, pH, DOM and PAH concentrations) on the interaction of 15 PAHs with commercial and natural DOM with different properties.

In order to deal with so many factors, factorial designs were applied. Factorial designs are mathematical models that allow to decrease the number of experiments to study simultaneously a large set of factors that can affect the response of a system. Some of them offer the possibility to document the effect of several factors, to determine interactions between these factors and to assess the linearity of the effects.

II. Materiel and methods

Three different samples of DOM were investigated: Aldrich humic acid (AHA), river water (RW) and DOM coming from algae culture (AC). Aldrich humic acid was dissolved in ultrapure water (MilliQ, Millipore, Molsheim, France) at high concentration (around 50 mg.L⁻¹). The river water was sampled in the La Hume canal (located in Arcachon Bay, South West of France) two days after a storm. The third DOM was sampled from marine unicellular algae (*Isochrysis galbana*) cultures which were used as food for larvae of bivalves. The water sample was collected at the end of the exponential phase of growth period to have a maximum of fresh macromolecules. As this culture was not sterile, it was possible that AC had also a low bacterial content. Every sample was filtered thanks to 0.7 µm GF/F filters (Whatman, Maidstone, England) and then diluted to the appropriate DOC concentrations.

Fifteen PAHs were studied: acenaphthylene (Acy), acenaphthene (Ace), fluorene (Flu), dibenzothiophene (DBT), phenanthrene (Phe), anthracene (An), fluoranthene (Fluo), pyrene (Pyr), benzo[a]anthracene (BaA), chrysene (Chrys), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[e]pyrene (BeP), benzo[a]pyrene (BaP), perylene (Per). Their 15 perdeuterated analogues were used for the internal quantification as well as deuterated naphthalene (N d8). Native and deuterated compounds were purchased from Aldrich (for Acy, Ace, Flu, Phe, Fluo, BaA, BbF, BkF, BeP, BaP, Per, DahA), Promochem (for IP, BP, Acy d8, Ace d10, Flu d10, BaA d12, BkF d12, IP d12, DahA d14), Cambridge Isotope Laboratories (for Phe d10, An d10, Pyr d10, BbF d12, BeP d12,

BaP d12, BP d12), MSD Isotopes (for DBT d8, Fluo d10, Chrys d12, Per d12), Acros (for DBT), EGA-Chemie (for N d8), Fluka (for Pyr and Chrys) and Labosi (for An) with high isotopic and chemical purities ($\geq 97\%$). Solutions of native and deuterated PAHs were prepared in ethanol absolute from HPLC grade (Scharlau Chemie, Sentmenat, Spain). Native PAHs were mixed together at high concentrations (around $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of ethanol) and diluted at several concentrations so that the same amount of solvent ($20 \mu\text{l}$) was added to the water samples (35 ml) to produce different PAH concentrations. The deuterated PAHs were added at the same proportions to have a concentration around $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ of each PAH in each sample. After this addition, samples were sonicated for a few minutes to have a good homogenization.

Before the addition of native and deuterated PAHs, DOM samples were diluted in tap water, salinity was adjusted thanks to a NaCl (AnalaR Normapur, VWR Prolabo, Leuven, Belgium) solution ($70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and pH was adjusted thanks to NaOH (Baker analysed, Baker, Deventer, Holland) and HCl (HCl 37%, AnalaR Normapur, VWR Prolabo, Leuven, Belgium) solutions (0.1 M). Tap water was used since stabilization of pH values during several hours in MilliQ water was not possible. Moreover, sufficient concentrations of DOM were used so that DOM naturally present in tap water was not significant. Salinity, conductivity and pH were checked with the help of a multi-parameter instrument (340i, WTW, Weilheim, Germany) and DOC concentrations were measured using a TOC-V CSN (Shimadzu, Duisburg, Germany).

Fractions of samples without PAHs were studied by EEM spectroscopy and UV-visible spectrophotometry. The spectrofluorometer used was a Fluorolog FL3-22 (Jobin-Yvon, France) equipped with a xenon lamp (450 W). Samples were contained in a 1 cm path length fused silica cell thermostated at $20 \text{ }^\circ\text{C}$. All the fluorescence spectra were acquired with an integration time of 0.5 s , an emission wavelength increment of 1 nm , excitation and emission band paths of 4 nm in ratio mode (S/R) (the signal was automatically normalized by the lamp reference signal). EEM spectra were performed with emission spectra from 260 to 700 nm at excitation wavelengths from 250 to 410 nm with an increment of 10 nm . Each spectrum was corrected for the background fluorescence of ultrapure water, instrumentally corrected and expressed in Raman units as already described by Huguet et al. (2009). A Jasco V-560 spectrophotometer (Jasco, France) equipped with deuterium and tungsten iodine lamps was used to measure characteristic wavelength absorbances of DOM and to avoid inner filtering effect during fluorescence analyses (Huguet et al. 2009): every sample with a maximum absorbance higher than 0.1 was appropriately diluted. UV-visible spectra were acquired between 210 and 700 nm at $200 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ and also corrected for the absorption background of ultrapure water.

SPME analyses of 10 mL samples were performed with commercially available PDMS (polydimethylsiloxane) $100 \mu\text{m}$ 23g coated fibers from Supelco (Bellefonte, USA). The parameters optimized for the PAH analyses were an extraction temperature of $40 \text{ }^\circ\text{C}$, a desorption temperature of $270 \text{ }^\circ\text{C}$ and an extraction time of 30 min (de Perre et al. 2009). The GC was an Agilent 6890 model

(Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a mass selective detector, model 5972 operated under electronic impact (EI 70 eV). The column used was a (5% phenyl)-methylpolysiloxane (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness; Agilent Technologies, Chromoptic, Courtaboeuf, France). Analyses were performed with an injector equipped with a septum-less system (Merlin Microseal[®]) and a SPME insert in the pulsed splitless mode (with a pulse pressure of 30 psi for 1 min, after 2 min the purge flow to split vent was 55 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the gas saver was set at 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ after 15 min). The carrier gas was helium (purity 5.6, Linde Gas, Toulouse, France) with a flow rate of 1.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and linear velocity of 42 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. The column temperature was held initially at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, increased to 150 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ then to 250 $^{\circ}\text{C}$ at 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and to 310 $^{\circ}\text{C}$ at 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and finally held on for 3 min. During the GC-MS analysis and the decrease of the GC oven temperature (30 min), the SPME fiber was maintained in the injector port to be conditioned before each extraction. The first conditioning of the fiber was performed in split mode (with a ratio of 100:1 and a flow of 129 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) in order to protect the column. For the determination of PAHs, GC-MS analysis was used in the Selected Ion Monitoring (SIM) acquisition mode and only the molecular ions were sought. A dwell time of 80 ms was used for each ion and the scan rate was 1.31 $\text{cycle}\cdot\text{s}^{-1}$.

To quantify free and total PAH concentrations, spiked waters were made with known concentrations of native and deuterated PAHs to calculate the response factors of the SPME-GC-MS. Total PAH concentrations were quantified by internal calibration with perdeuterated standards corresponding to each PAH and the free PAHs were quantified by internal calibration regarding naphthalene d8 (de Perre et al. 2009), which did not interact with any of the three DOM samples (results not shown). Two spiked ultrapure waters were analyzed before the samples and two at the end of the series in order to verify the stability of the system. Before extraction of each series, the GC-MS system was previously checked by means of a manual direct liquid injection of PAH solutions into the system.

Full and fractional factorial designs were used to plan experiments. Four factors (salinity, pH, PAH concentration and DOC concentration) were investigated simultaneously thanks to fractional factorial designs that meant 8 samples (2^{4-1}) (Table 1) were prepared for AHA and RW. For AHA, 8 other samples were made to confirm results of the first series. Indeed, a full factorial design 2^4 is composed of a series of 16 samples which can be divided in two fractional designs 2^{3-1} which should give the same results. Therefore, for AHA, the complementary fractional design was performed and results of the first one were confirmed so this kind of design appeared to be sufficient to describe the observed phenomena.

	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂ X ₃ =X ₄	
sample number	salinity	pH	[PAH] (ng.L ⁻¹)	[DOC] (mg.L ⁻¹)	
1	0	5	100	1 ^a	2 ^b
2	30	5	100	12 ^a	15 ^b
3	0	9	100	12 ^a	15 ^b
4	30	9	100	1 ^a	2 ^b
5	0	5	1000	12 ^a	15 ^b
6	30	5	1000	1 ^a	2 ^b
7	0	9	1000	1 ^a	2 ^b
8	30	9	1000	12 ^a	15 ^b
Central point	15	7	550	6.5 ^a	8.5 ^b

Table 1. Theoretical experiences of the 2⁴⁻¹ fractional factorial design applied to ^a RW and ^b AHA.

Regarding AC, as the salinity was already high in the sample (around 32), it was not possible to study this factor so a full factorial design was used with only three factors, that represented 8 samples (2³) (Table 2).

	X1	X2	X3	
sample number	pH	[DOC] (mg.L ⁻¹)	[PAH] (ng.L ⁻¹)	salinity
1	5	8	100	32
2	9	8	100	32
3	5	34	100	32
4	9	34	100	32
5	5	8	1000	32
6	9	8	1000	32
7	5	34	1000	32
8	9	34	1000	32
Central point	7	21	2000	32

Table 2. Theoretical experiences of the 2³ full factorial design applied to AC.

In addition to the 8 samples of each design, central points were made and were extracted every two samples along the series to quantify the variability of the system and to determine the significance of the results. The factors were studied with parameter values chosen to be representative and environmentally realistic (Table 1 and Table 2). Theoretical values were experimentally checked and the measured values were used for the calculation. The responses were the DOM-water partition coefficient (K_{DOC}) of each PAH which was calculated as follows:

$$K_{DOC} = \frac{[PAH]_{total} - [PAH]_{free}}{[PAH]_{free} \cdot [DOC]} \quad (1)$$

(with $[PAH]_{total}$, the total concentration of PAHs, $[PAH]_{free}$, the concentration of free PAHs and $[DOC]$, the DOC concentration.)

In order to correlate effects of factors on the interactions and their effects on DOM, several characteristic fluorescence and absorbance indices or ratios were also used as responses. As these measurements were performed before the addition of PAHs, the factor concentration of PAHs was not involved and these designs were full factorial designs for each DOM. The software Modde 5.0 (Umetrics) was used for the data processing.

III. Results and discussion

III.1. DOM sample characterization

In this study, several indices and ratios coming from UV-visible absorption and spectrofluorometry measurements were used to characterize DOM. The fluorescence spectra of the three DOM types are given in the Figure 1. Several characteristic bands of fluorescence are observed on EEM spectra: the α' (Ex/Em = 250/380-480 nm) and α (Ex/Em = 370/420-480 nm) bands, which are characteristic of humic material, the γ band (Ex/Em = 280/330 nm) which is composed of protein-like material and the β band (Ex/Em = 310/400 nm), which is characteristic of autochthonous material production related to biological activity (Parlanti et al. 2000). Relative contributions of these bands were determined thanks to ratios of maximum fluorescence intensity: α'/α , β/α and γ/α . Three indices were also calculated for fluorescence measurements. First, the humification index (HIX), introduced by Zsolnay et al. (1999), is the ratio of area from 435 to 480 nm over area from 300 to 345 nm for an excitation wavelength of 250 nm. HIX increases with aromaticity, size of macromolecules, complexity and condensation of macromolecules (Kalbitz et al. 2003, Huguet et al. 2009). According to Huguet et al. (2009), this index allows to determine DOM origin: a value less than 4 was shown to characterize a biological or aquatic origin whereas a value higher than 16 indicated a strong humic character or an important terrigenous contribution. The f_{450}/f_{500} ratio introduced by McKnight et al. (2001) was also used. It is calculated as the ratio of fluorescence intensity at 450 nm over 500 nm with an excitation wavelength of 370 nm. This index allows the distinction between autochthonous aquatic DOM (with a value around 1.9 for aquatic and microbial sources) and allochthonous aquatic DOM (with a value around 1.3 for terrestrial and soil sources). Due to a shift in fluorescence emission spectra towards longer wavelength, this index varies with aromaticity, molecular weight and flocculation of DOM (Huguet et al. 2009). The third index used was the recent autochthonous contribution (BIX) introduced to determine the presence of the β fluorophore (Huguet et al. 2009). It is calculated as the ratio of the fluorescence intensity at 380 nm over the intensity at 430 nm, with an excitation wavelength of 310 nm. Its values are shown to be higher than 1 for biological or aquatic bacterial DOM and around 0.6-0.7 for DOM with low autochthonous component.

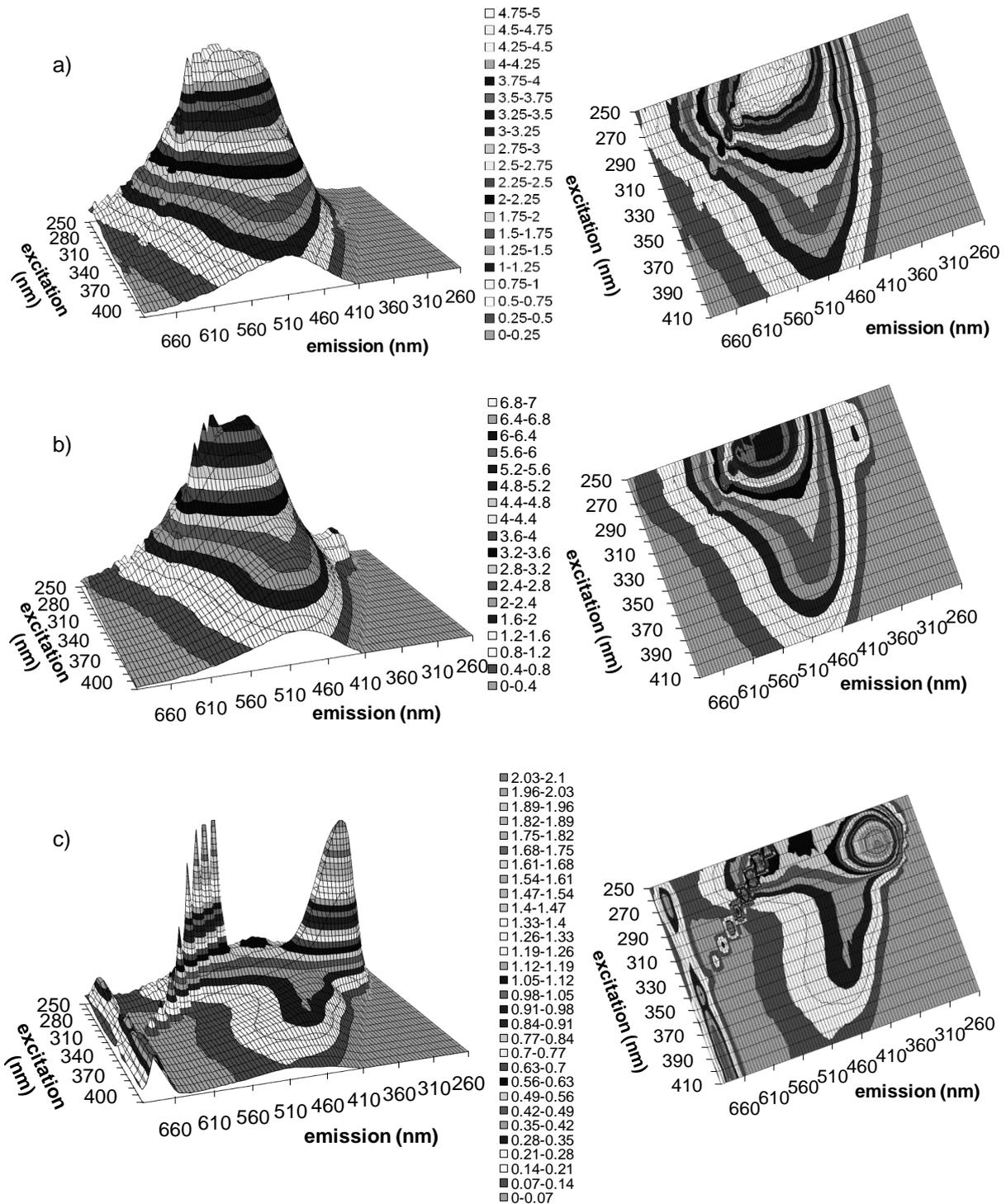


Figure 1. EEM and plot fluorescence spectra, a) AHA, b) RW, c) AC, with pH = 9 and maximal DOC concentrations. *EEM fluorescence intensities are expressed in Raman units.*

Some UV-visible parameters were also calculated. Aromaticity is usually described as the absorbance between 250 and 280 nm (Thomsen et al. 2002, Lepane et al. 2004). Here, the aromaticity percentage was calculated thanks to equation (2) introduced by Chin et al. (1994):

$$\text{aromaticity} = \frac{\text{Abs}_{280}}{[\text{DOC}]} + 6.74 \quad (2)$$

(with Abs_{280} , the absorbance at 280 nm and [DOC], the DOC concentration in mol.L^{-1} .)

In the same manner, the SUVA was calculated to characterize aromaticity thanks to equation (3):

$$SUVA = \frac{Abs_{254}}{[DOC]} \times 100 \quad (3)$$

(with Abs_{254} , the absorbance at 254 nm and [DOC], the DOC concentration in mg.L^{-1} .)

Two ratios of absorbance were also used: E_2/E_3 ratio (Abs_{254}/Abs_{365}) and E_4/E_6 ratio (Abs_{465}/Abs_{665}). The E_2/E_3 ratio usually increases when aromaticity and molecular weight decrease (Thomsen et al. 2002) and was observed to be higher than 3.5 for fulvic acids and less than 3.5 for humic acids (Minero et al. 2007). E_4/E_6 is shown to increase when molecular weight decreases or oxygen content in DOM increases (Thomsen et al. 2002). A few studies have found E_4/E_6 values less than 5 for humic acids and higher than 6 for fulvic acids (Chen et al. 2002, You et al. 1999).

The EEM spectrum of AHA is characteristic of very mature humic substances: fluorescence bands are shifted towards long wavelengths meaning it is composed of large macromolecules and numerous aromatic components, HIX is very high (47.5) and the f_{450}/f_{500} ratio < 0.5 shows a terrestrial origin. UV-visible parameters support these results and give an aromaticity around 48%. The E_2/E_3 and E_4/E_6 ratios of 2.4 and 4.6 respectively confirm the humic acid predominance (Minero et al. 2007, Chen et al. 2002).

The EEM spectrum of AC is characteristic of recent marine DOM composed essentially of fresh material as shown by a high γ band and the presence of a β band. The α and α' bands are also present but their intensities are lower. HIX is very low (1.1) and the γ/α ratio of about 7 confirms the recent origin. Even though the f_{450}/f_{500} index is higher than in AHA sample, its value is 1.3 for AC which would indicate a terrestrial origin for McKnight et al. (2001). However, they developed this index to determine the origin of fulvic acids so their index values do not seem to be applicable to AC but can be used as a comparison tool. The aromaticity of the sample is around 9%. Surprisingly, the E_4/E_6 ratio is lower (1.6) than the one of AHA meaning a higher size of macromolecules. However, as the DOC concentration is high (around 34 mg.L^{-1}), aggregation of macromolecules could explain this low value (Pan et al. 2008a). The E_2/E_3 ratio of about 2.6 also indicates the predominance of humic acids over fulvic acids.

RW is intermediate between the two other samples. RW seems to have partly a terrestrial origin as shown by its high HIX value (10.3) but this DOM is less humified than AHA. It is confirmed by its aromaticity of 24% and a E_2/E_3 ratio of about 4.2 characteristic of fulvic acids. Its E_4/E_6 ratio (4.3) indicates smaller macromolecules than the ones of AC and of the same size as the ones of AHA. However, this ratio may not be appropriated to describe the nature of DOM in natural waters since this sample, according to its origin, must be essentially composed of fulvic acids, even though a value less than 5 was obtained. So far studies of E_4/E_6 variations have focused mostly on soil organic matter and

references could not be adapted to natural waters. RW is also composed of fresh material since a γ band appears even though the γ/α ratio remains low (0.6). BIX also confirms the low recent macromolecule contribution since its value is around 0.5 while it is 0.3 for AHA and 1 for AC.

For fluorescence intensities and ratios, only visible bands will be discussed thereafter: α' , α and α'/α for AHA, α' , α , γ , γ/α and α'/α for RW and α' , α , γ , β , β/α , γ/α and α'/α for AC.

In parallel to the characterization of DOM samples, interactions of each DOM type with PAHs were studied thanks to the calculation of K_{DOC} values. However, before free and total PAH concentration measurements, it was necessary to know the effect of pH and salinity on SPME without DOM.

III.2. Optimization of SPME-GC-MS

As regards the SPME-GC-MS, it is important to study the effect of physico-chemical parameters like salinity or pH on the PAH extraction to quantify correctly PAHs and their interactions with DOM. Experiments were made to know the effect of pH and salinity at environmental relevant values on the extraction of 4 PAHs (phenanthrene, fluoranthene, chrysene and benzo[a]pyrene). According to Figure 2, salinity cannot be ignored since an increase of salinity from 0 to 35 (in concentration of NaCl) causes a significant increase of areas for PAHs. An increase of areas with salinity can be explained by the salting-out effect well-known for hydrophobic compounds which would be more adsorbed or absorbed by the fiber when water molecules are less available for their dissolution (Schwarzenbach et al. 1993, Li et al. 2006). As far as pH is concerned, its influence seems to be less obvious since a variation from 5 to 9 does not show any significant tendency (Figure 2).

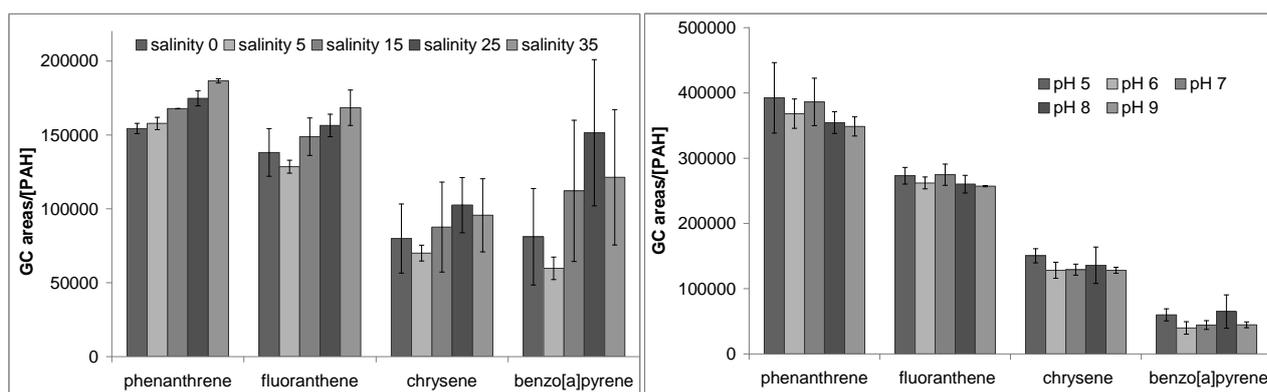


Figure 2. Effect of pH and salinity on PAH extraction, $[\text{PAH}] = 500 \text{ ng.L}^{-1}$ for pH, $[\text{PAH}] = 1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ for salinity, $n = 3$.

Although salinity and to a lesser extent pH have been proved to influence the extraction by SPME, PAHs and deuterated PAHs are affected in the same manner (Figure 3) and consequently, internal calibration can be performed in conditions of pH and salinity differing from the ones of the samples to analyze. Indeed, relative response coefficients for quantification of both total and free PAH concentrations are the same whatever the conditions of the sample. So the use of internal calibration

for the quantification of free PAH concentrations instead of external calibration is in this case very useful as it is not necessary to adjust salinity in calibration spiked waters.

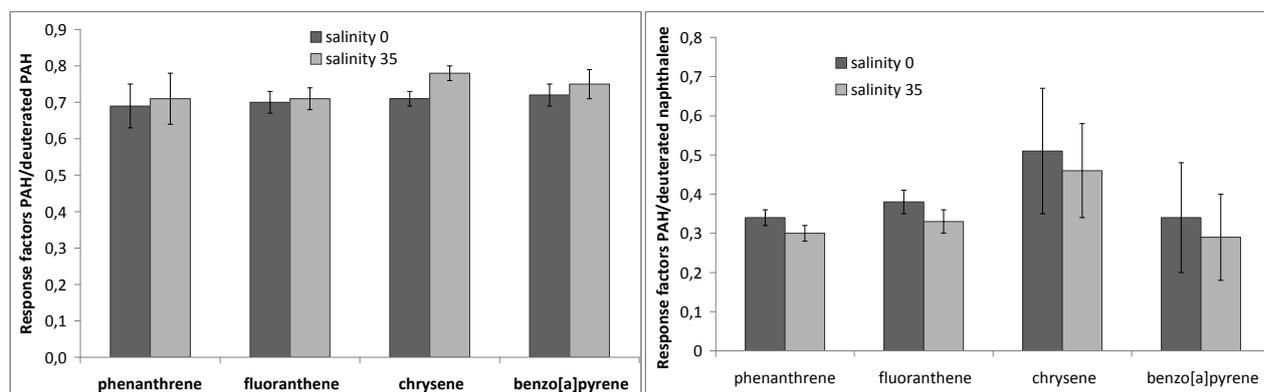


Figure 3. Response factors at different salinities for total PAH concentration (on the left) and free PAH concentration quantifications (on the right), $[PAH] = 1 \mu g.L^{-1}$, $n = 3$.

III.3. Factor effects on PAH-DOM interactions

III.3.1. Effect of DOM origin

First, K_{DOC} values of the three DOM types were compared (Figure 4). Most of average K_{DOC} values are higher for AHA than for the other DOM samples. It was already shown that commercial humic substances have stronger interactions with PAHs than natural DOM (Perminova et al. 1999, Durjava et al. 2007).

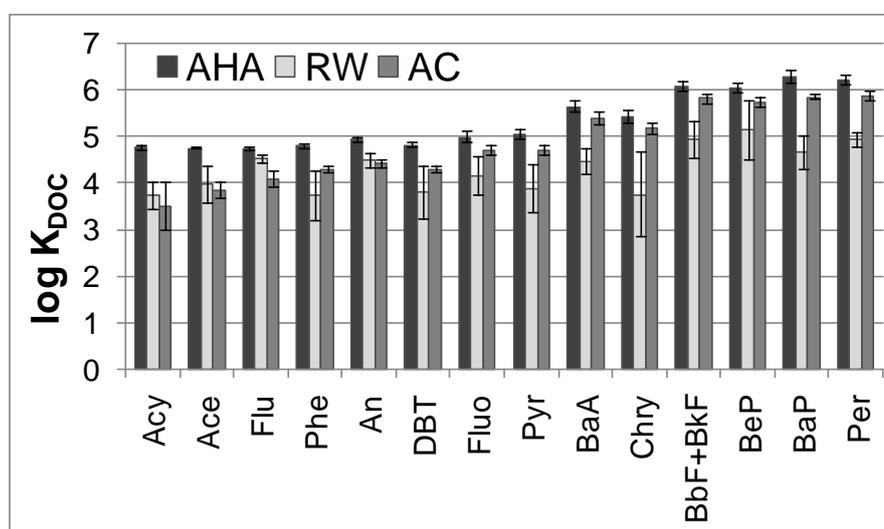


Figure 4. Average $\log K_{DOC}$ with the three DOM for each PAH for central points.

Whereas high molecular weight (HMW) PAHs have stronger interactions with AC than with RW, it is the contrary for low molecular weight (LMW) PAHs. Moreover, for HMW PAHs, K_{DOC} values are only twofold higher for AHA than for AC while they are twentyfold higher for AHA than for RW. Therefore, even though very humified DOM (AHA) has stronger interactions with PAHs, the degree of

humification and aromaticity of DOM are not the driving factors for interactions with PAHs, especially for HMW ones, and it seems that fresh material could also play a major role in these interactions. This is unexpected since several studies observed a correlation between K_{DOC} and aromaticity descriptors (Perminova et al. 1999, Chin et al. 1997, Gauthier et al. 1987). However, more recently, a few studies corroborated our results (Kopinke et al. 2001, Hur and Schlautman 2003). They attributed the increase in K_{DOC} values for pyrene with decreasing aromaticity to the increase of aliphatic content of DOM which could enhance the sorption potential for PAHs in DOM. Kopinke et al. (2001) also suggested that the flexibility of substituents and the inter- and intramolecular formation of hydrophobic domains could enhance interactions with PAHs. Unfortunately, these hypotheses cannot be verified in our study since aliphatic chains cannot be described by optical parameters.

Regarding effects of environmental parameters, it was necessary to use factorial design results to understand complex phenomena that occurred. The factorial designs used were not adapted to a perfect modeling of the studied effects since for this purpose, many more samples would have to be performed and fitted. However these simple experiments were useful to better understand how environmental parameters affect interactions and how these latter depend on PAH nature, which is very rarely studied. Despite the simplicity of these models, they have given acceptable results: the linearity hypothesis seems to be relevant on the studied range since most of central points fit with models and R^2 of correlations between environmental parameters and K_{DOC} values range from 0.3 to 0.9 depending on DOM and PAHs (with R^2 usually better for HMW PAHs, results not shown).

III.3.2. Effect of salinity

A variation of salinity between 0 and 30 did not influence significantly either K_{DOC} values or DOM characteristic parameters calculated as well by UV-visible absorption as by spectrofluorometry (results not shown). The only exception is an effect of salinity on AHA aromaticity but it may be an artifact since only this parameter is modified significantly while HIX or E_2/E_3 are not. In the literature, several effects were reported. Tremblay et al. (2005) observed an increase of suspended particulate matter - water partition coefficient for phenanthrene and fluoranthene when salinity increased. They attributed these results to the "salting-out" effect that changes PAH aqueous solubility. Gauthier et al. (1986) also observed an increase of K_{DOC} values for pyrene, phenanthrene and anthracene with increasing concentration of NaCl. While Schlautman and Morgan (1993) found opposite effects with Suwannee River humic substances and pyrene and perylene, and attributed them to the modification of the organic matter structure caused by salt ions. Although Baalousha et al. (2006) demonstrated that ionic strength could modify the macromolecule size, our results confirm that these changes do not influence optical properties of DOM as previously found (Han and Guo 2008, Fu et al. 2004). Moreover, in our experiments, it is possible that the effect of salinity on DOM structure was too low to be observed and was compensated by the small enhancement of PAH water solubility to lead to apparent constant K_{DOC} values for all PAHs.

III.3.3. Effect of PAH concentration

In these experiments, PAH concentrations have significant effects on K_{DOC} values for AC but neither for AHA nor RW. These results for AHA contradict the ones of a previous study (de Perre et al. 2009) but the concentrations used here (100 to 1000 ng.L^{-1}) are in a narrower range which corresponds to the linear domain in the previous work. For AC, the studied range is larger (100 to 2000 ng.L^{-1}) and PAH concentration effects are observed: whatever pH and DOC concentration, an increase of PAH concentration causes a decrease of K_{DOC} values. These results comfort the hypothesis of competition of PAHs towards specific association sites of DOM suggested in the previous work.

III.3.4. Effect of pH and DOC concentration

DOC concentrations and pH were studied together because their effects on interactions could be interrelated. Although their effects are dependent on DOM origin and PAH structure (Figure 5), the same tendency is observed for the 3 DOM samples. Globally, a decrease of DOC concentration leads to an increase of K_{DOC} values for LMW PAHs and a pH variation from 9 to 5 causes an increase of K_{DOC} values for HMW PAHs. For AHA, the effect of DOC concentration on LMW PAH interactions is observed from acenaphthylene to pyrene and is independent on pH while the effect of pH on HMW PAH interactions is observed from benzo[a]anthracene to perylene and is independent on DOC concentration. For RW, the same effects are observed but pH affects K_{DOC} values from phenanthrene to perylene and DOC concentration affects all PAH interactions. Moreover, pH and DOC concentration effects are dependent on each other (Figure 5b): K_{DOC} values increase when DOC concentration decreases especially at low pH whereas K_{DOC} values increases when pH decreases only for low DOC concentration. As regards AC, the effects on interactions are dependent on PAH concentrations. At low PAH concentrations, all K_{DOC} values depend on DOC concentration and not on pH whereas at high PAH concentrations, they are very low and almost independent on pH and DOC concentrations.

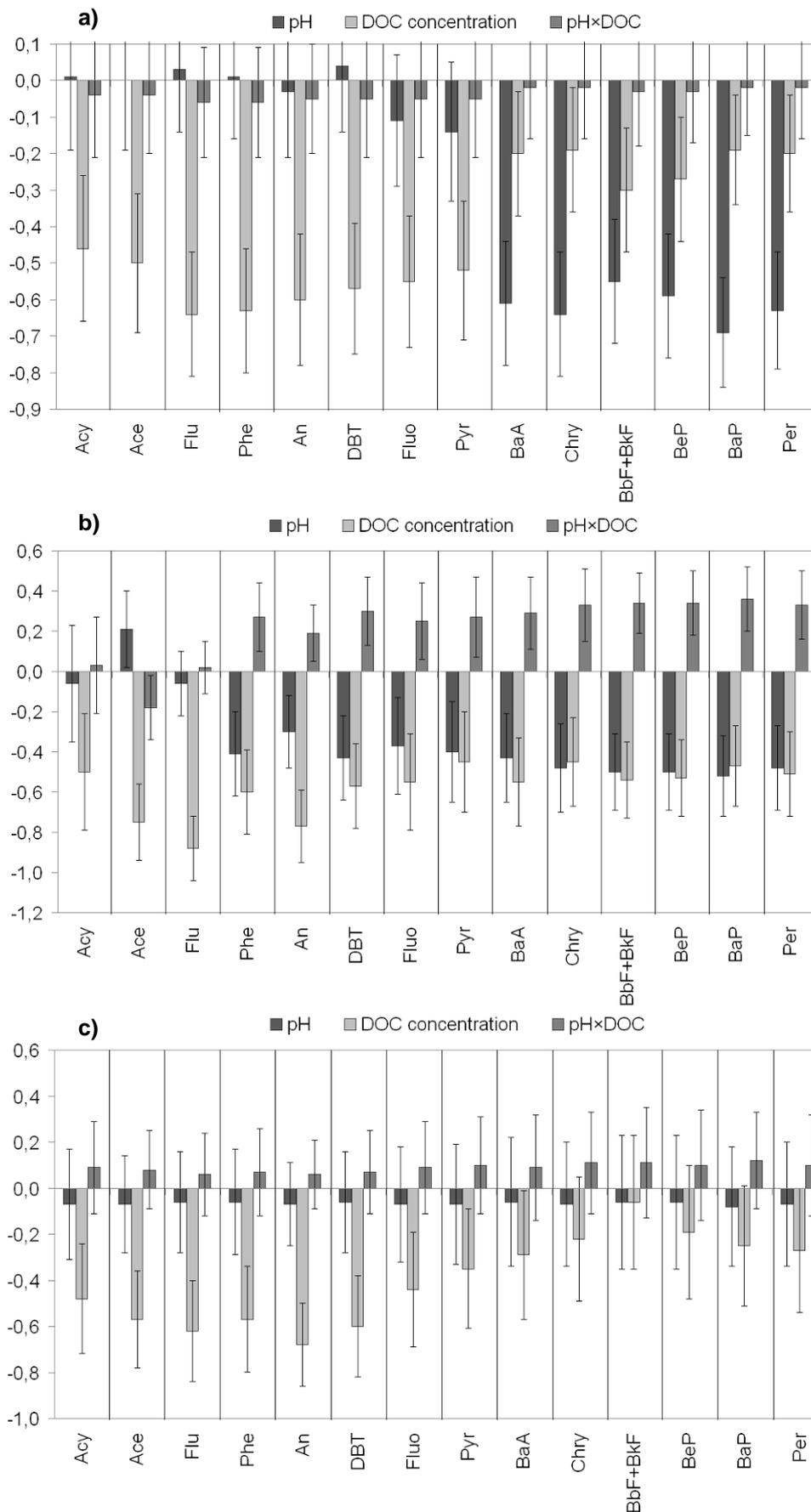


Figure 5. Normalized coefficients of effects of pH and DOC concentration on K_{DOC} values for a) AHA, b) RW and c) AC.

Similar tendency of increasing K_{DOC} values when pH decreases has already been observed in several studies. Schlautman and Morgan (1993) observed an increase of K_{DOC} of pyrene, anthracene and perylene when pH decreased for reference humic and fulvic acids (Suwannee River, IHSS). Pan et al. (2007) have shown a decrease of K_{DOC} values for pyrene and phenanthrene with Aldrich humic acid for a pH variation from 4 to 11. However, Kopinke et al. (2001) observed that almost no effect of pH occurred on K_{DOC} values for pyrene with commercial humic acid (Roth) whereas they observed an increase of interactions when pH decreases for small molecules (2000 Da) and natural aquatic humic substances. This suggestion could explain why, for natural samples, RW is the most sensitive sample to pH variations since it is of natural aquatic origin and is composed of smaller macromolecules than AC (according to E_4/E_6 parameter).

As pH cannot modify PAH solubility, the modification of partition should only be the result of modifications of DOM properties and/or structure, usually known to be due to protonation of some DOM functional groups (Pan et al. 2007, Schlautman and Morgan 1993). According to Zhu et al. (2004), several modifications of DOM due to protonation could explain an increase of PAH association with pH decrease. For instance, the protonation of ring substituents of DOM could enhance hydrophobicity and strength of π -H-bond and π - π interactions between DOM and PAHs (Zhu et al. 2004). The fact that HMW PAHs (which are the most hydrophobic and the strongest π -donor PAHs) are more influenced by pH could corroborate these hypotheses. Actually, for AHA, only interactions with stronger π -donor PAHs are affected by pH, indicating that AHA should be composed mainly of functional groups which have a more π -acceptor character (protonated aromatic amines for example) than the ones of RW (carboxylic acids for example).

In order to better understand the effect of pH on interactions we investigated the effect of pH on DOM. Interpretation of modification of DOM properties thanks to optical parameters is complicated by the fact that sometimes similar parameters gave opposite results. For instance, a decrease of pH causes a decrease of aromaticity and/or molecular weight of AHA according to the increase of E_2/E_3 ratio but an increase of aromaticity according to the SUVA and the aromaticity percentage (Figure 6). Moreover, the E_4/E_6 ratio, which is inversely proportional to molecular weight, did not vary significantly so it can be supposed that the variation of E_2/E_3 was not due to a modification of the size of macromolecules. Therefore, it is hard to determine if pH affects aromaticity. Moreover, as no other effect on AHA optical properties is observed with variation of pH while K_{DOC} values of HMW PAHs increase, it might be assumed that interactions of HMW PAHs occurred with slightly or not absorbent/fluorescent functional groups of AHA. As regards the two other DOM types, contrary to pH effect on K_{DOC} values, a pH variation from 9 to 5 affects AC optical properties greatly and to a lesser extent RW fluorescence (Figure 6). The four characteristic fluorescence bands of AC have a lower intensity as pH decreases whereas for RW only the γ band is modified. The fluorophores of the AC bands might be of the same nature as the ones of the γ band of RW but different from the ones of other bands of RW and AHA. The influence of pH on AC fluorescent bands and on the γ band of RW could be explained by the bigger proportion of ionizable groups in these fluorophores and especially

phenolic groups. Indeed, the higher the content of phenolic hydroxyl, the greater would be the dependence of the fluorescence intensity on pH (Senesi 1990). Phenolic groups become more acidic in the excited state than in the ground state (Parker 1968) so their fluorescence would mainly come from their ionized form. Thus, when pH decreases their protonation increases and their fluorescence intensity decreases. Inversely, aromatic carboxylic acids and aromatic ketones are more strongly basic in the excited state (Parker 1968) and their protonated form would be mainly responsible for their fluorescence. That is why an addition of protons should modify their fluorescence intensity only to a lesser extent. As AC is mainly composed of protein-like compounds (γ band) and non-humified fresh materials, phenolic groups could have been the major fluorophores of this sample. Given that PAH interactions with this DOM do not depend on pH, we can suggest that phenolic groups are not involved in association with PAHs. Even though we have shown that the main fluorophores of this DOM are not responsible for interactions, this sample has stronger interactions with PAHs than RW. Therefore, non pH-dependent functional groups could be involved in these interactions with AC such as ketone, aldehyde, ester, amido or quinone groups (Zhu et al. 2004).

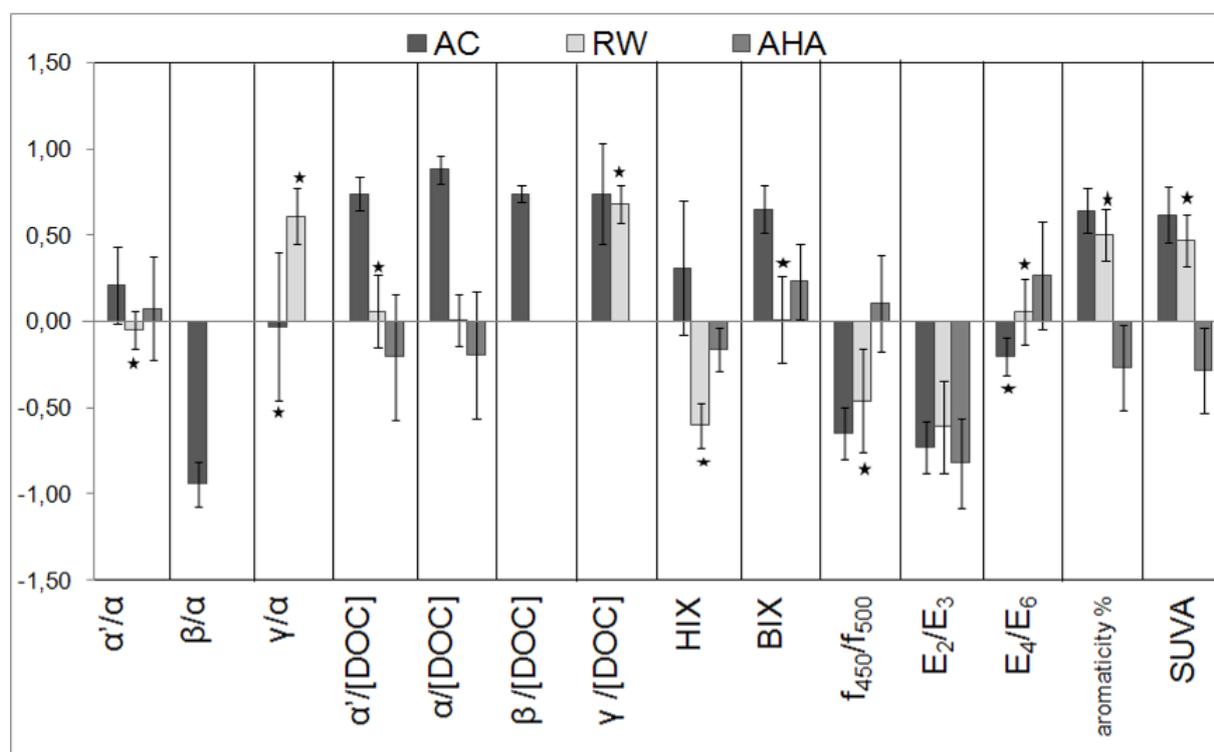


Figure 6. Effect of pH on optical properties of DOM. ★ = depends on DOC concentrations.

Moreover, given that K_{DOC} values of AC are highly dependent on DOC concentration, we can suppose that the variations of interactions are due to DOM structure modifications. Indeed, for this sample, the fluorescence intensities of the α' , α and β bands (corrected by DOC concentrations) are higher when the sample is diluted (Figure 7). That could be due to collisions at high DOC concentration since the greater proximity of fluorophores could have enhanced the probability of deactivation of excited states and quenched the fluorescence (Senesi 1990). This high proximity of macromolecules also seems to have caused agglomeration effect with an increase in DOC concentration. Indeed, a rise in macromolecule size is pointed out thanks to E_2/E_3 and E_4/E_6 ratios.

This aggregation, even at high pH, could be explained by the reduced free space for the movement of macromolecules and the decrease of intermolecular distance (Pan et al. 2008a). Furthermore, the decrease of the f_{450}/f_{500} ratio with an increase of DOC concentration is due to a significant shift of the α band of 15-20 nm towards longer wavelengths, confirming a higher size of macromolecules. This agglomeration could be unfavorable for LMW PAHs by hindering their access to DOM association sites, causing a decrease of K_{DOC} values at high DOC concentrations.

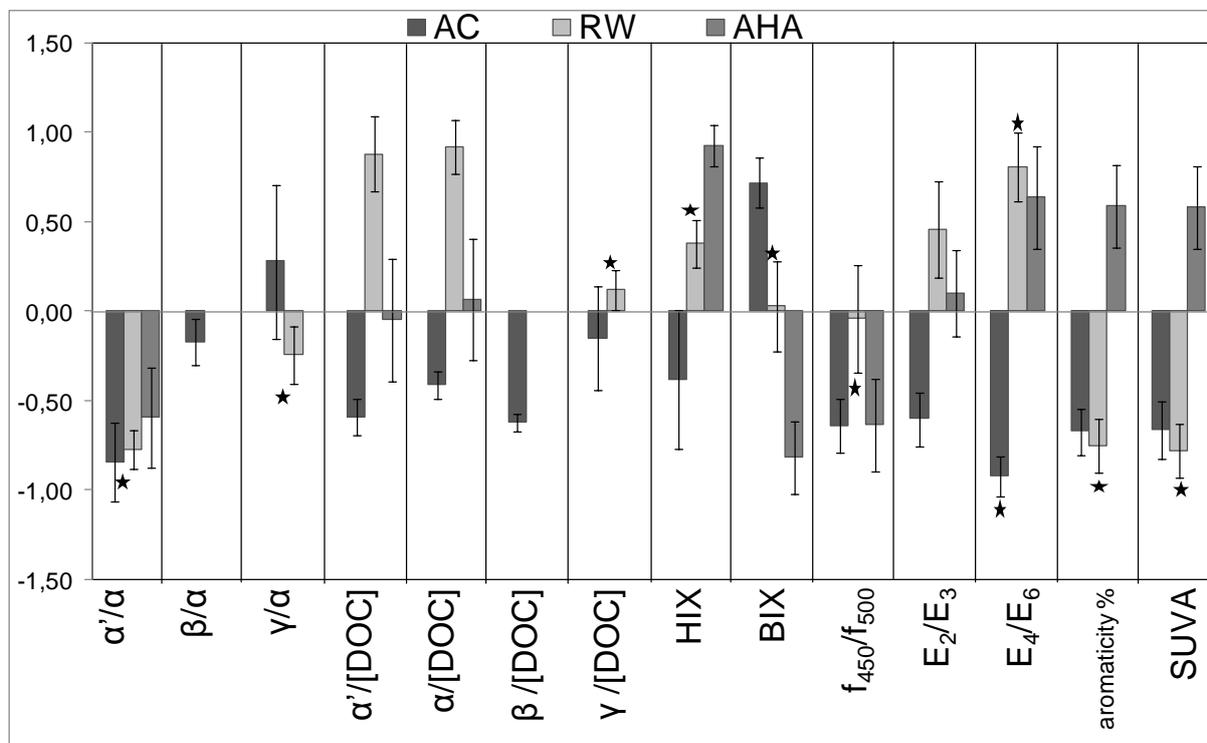


Figure 7. Effect of DOC concentration on optical properties of DOM. ★ = depends on pH.

The same effects seem to occur with AHA, but, maybe because of its larger and more humified macromolecules composition, this aggregation seems to have enhanced aromaticity and complexity of DOM (as shown by SUVA and HIX). However, this modification of aromaticity did not enhance interactions with PAHs, even for the most hydrophobic of them.

As regards RW, E_2/E_3 and E_4/E_6 ratios are higher at higher DOC concentration, meaning a decrease in macromolecule size likely owing to intramolecular withdrawal (Pan et al. 2008a). This withdrawal could reduce available binding sites for PAHs and explain low K_{DOC} values of all PAHs at high DOC concentration. At high pH, f_{450}/f_{500} shows an increase of macromolecule size which could mean that macromolecules get closer despite their ionization due to the reduced free space (Pan et al. 2008a). The most favorable configuration of this DOM sample for interactions with PAH is thus reached at low pH (macromolecules in the protonated form) and at low DOC concentrations (with no or low intramolecular withdrawal).

Consequently, it is hard to conclude about effects of pH and DOC concentration on DOM given that it depends on DOM origin and PAHs. Moreover, the characterization of DOM by just

spectroscopic techniques complicates the understanding of interactions since environmental parameters can affect DOM but not its optical properties and thus these effects could not be observed in this study.

We tried to point out a relationship between the variations of K_{DOC} values and optical parameters of DOM due to environmental parameters modification but independently of the factor causing the modification. It appears that a few correlations can be made but they depend on DOM origin. The three ratios affected the most in the same manner as K_{DOC} values among the ones observed are E_2/E_3 , E_4/E_6 and α'/α (Figure 8). The best correlations for the three DOM studied together (to model the behavior of an unknown sample, Figure 8d) are a positive relationship between variations of K_{DOC} values and the ones of α'/α ($R = 0.5$ to 1), and a negative relationship between variations of K_{DOC} values and the ones of E_4/E_6 but the latter is better for LMW PAHs ($R = -0.2$ to -0.7 from Ace to Pyr and $R = -0.1$ to -0.4 from BaA to Per). The variations of E_2/E_3 ratio fits well the ones of K_{DOC} values of HMW PAHs with AHA but are slightly related to K_{DOC} values in an unknown sample (represented here by the three DOM types together model). This low relationship between E_2/E_3 and K_{DOC} variations suggests that an increase of aromaticity and/or complexity of DOM due to environmental parameter modifications does not modify significantly the strength of interactions with PAHs. This result is confirmed by other parameters like HIX, SUVA and aromaticity percentage which variations are not correlated with K_{DOC} variations. This could be surprising since E_2/E_3 seems to be related to K_{DOC} values (K_{DOC} values are higher for samples with lower E_2/E_3 , i.e. AHA and AC). But it could mean that modifications of absorbance properties of DOM due to environmental factors does not change DOM capacity to interact with PAHs whereas the E_2/E_3 value initially measured in the sample would be more representative of the structure of DOM and of its interaction capacities. As for E_4/E_6 , its variations seem to be better correlated to K_{DOC} variations, especially for LMW PAHs: interactions seem to be stronger when E_4/E_6 decreases owing to environmental parameters. Indeed, the decrease of interactions due to condensation of large macromolecules and the increase of interactions owing to aggregation of smaller macromolecules could be well described by this ratio. This positive correlation between molecular weight of DOM and K_{DOC} values of PAHs has already been underlined in literature with other analytical techniques for the size measurement of DOM (Chin et al. 1997, Kopinke et al. 2001, Pan et al. 2008b). Therefore, it confirms both the relationship between PAH interaction strength and size of DOM (at least for LMW PAHs) and the correlation between E_4/E_6 with macromolecule size. Last but not least, the best correlation seems to occur with the α'/α ratio which suggests that modifications of humic substance optical properties due to environmental factors cause modifications of the strength of interactions. However, this is especially true for natural aquatic DOM (Figure 8b and c) since only low correlations occur for AHA (Figure 8a). Moreover, the variations of K_{DOC} values are independent of γ/α ratio variations, even for AC, although recent macromolecules play an important role on interactions with PAHs, especially with HMW PAHs (as shown by high K_{DOC} values for these compounds with AC).

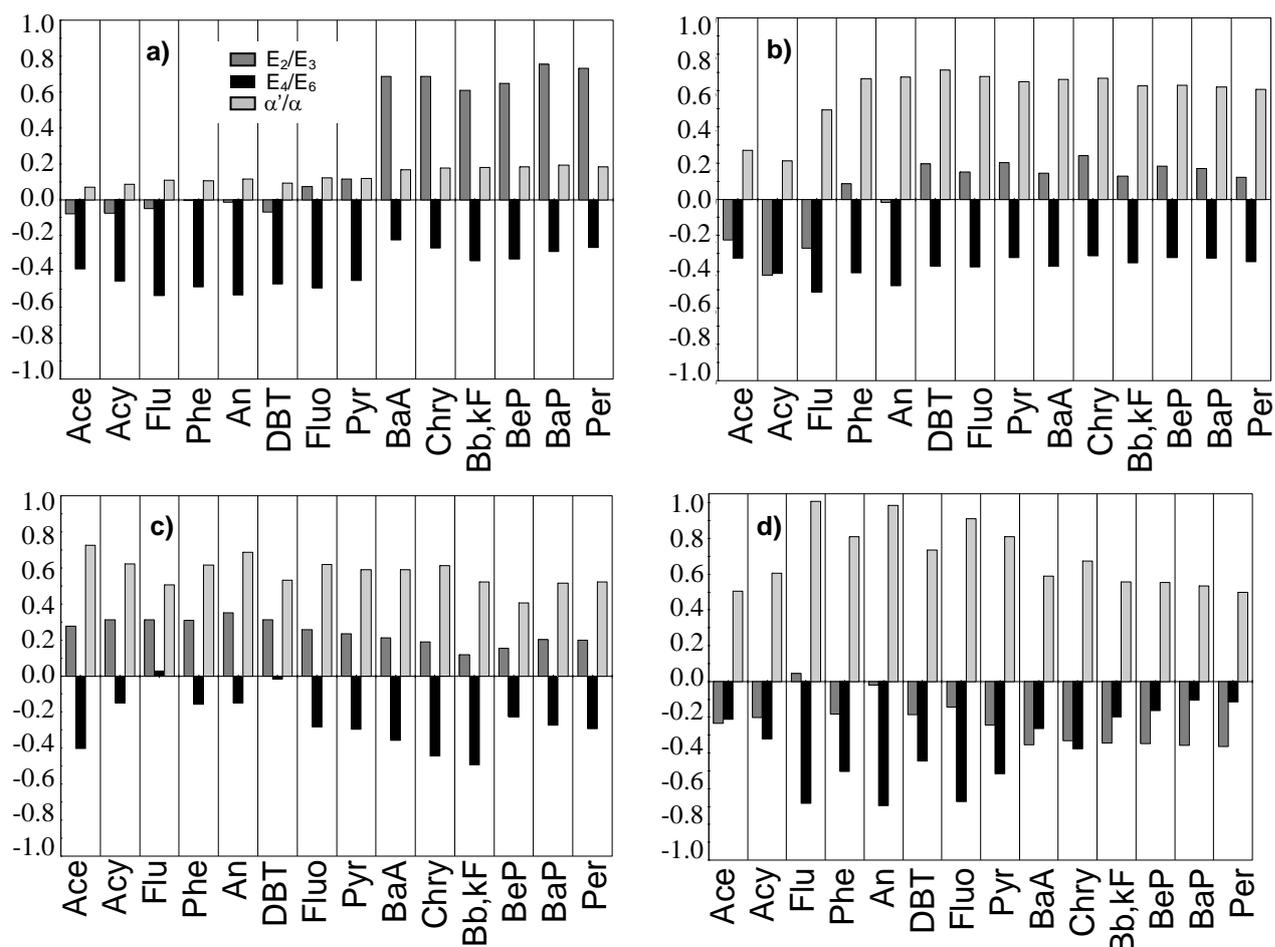


Figure 8. Normalized coefficients of the three effects the most related to K_{DOC} values, a) AHA, b) RW, c) AC, d) 3 DOM types in the same model.

IV. Conclusion

This study showed that interactions of PAHs with DOM are very complex and depend on many factors. Some of them have no effect on interactions, such as salinity, while some others highly affect K_{DOC} values such as pH and DOC concentrations. Nevertheless, interactions and environmental factor effects have been shown to depend on PAHs and DOM origin and structure and appear to be difficult to apprehend. Indeed, in this study three different DOM were studied and three different complex behaviors were pointed out, so the phenomena that occur in natural waters should be a challenge to model. However, it would be interesting to investigate the relationships between K_{DOC} values and optical properties of DOM, and especially for E_4/E_6 and α'/α , for more various natural DOM types to eventually conclude on a correlation applicable to natural waters. Moreover, it was shown that environmental parameters can modify optical properties and interaction capacities of DOM but the modification of DOM optical properties does not obligatory change interaction strength and the modification of K_{DOC} values are not always due to a change in optical properties. Finally, a (voluntary

or involuntary) modification of concentration or pH of DOM samples cannot be ignored regarding modifications of optical properties and behavior towards PAHs that must have occurred.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Céline Vérité (Ifremer) for the dissolved organic carbon analyses, Raphaël Brizard and Jean Christophe Billy (Laboratoire Génétique et Pathologie (LGP), La Tremblade) for the algae cultures and Julien Noui for his technical help. "Region Aquitaine", INSU (IMOTOX project), FEDER, CPER du Poitou Charentes and ORQUE program (CPER) are also acknowledged for financial support and the French Ministry of Research for the PhD grant of Chloé de Perre.

Literature

- Akkanen, J., Penttinen, S., Haitzer, M. & Kukkonen, J.V.K.** (2001) Bioavailability of atrazine, pyrene and benzo[a]pyrene in European river waters. *Chemosphere* **45**(4-5), 453-462.
- Baalousha, M., Motelica-Heino, M. & Coustumer, P.L.** (2006) Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **272**(1-2), 48-55.
- Bejarano, A.C., Chandler, G.T. & Decho, A.W.** (2005) Influence of natural dissolved organic matter (DOM) on acute and chronic toxicity of the pesticides chlorothalonil, chlorpyrifos and fipronil on the meiobenthic estuarine copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **321**(1), 43-57.
- Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E.J., Pan, H. & Dai, S.** (2002) Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* **48**(1), 59-68.
- Chin, Y.P., Aiken, G.R. & O'Loughlin, E.** (1994) Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology* **28**(11), 1853-1858.
- Chin, Y.P., Aiken, G.R. & Danielsen, K.M.** (1997) Binding of Pyrene to Aquatic and Commercial Humic Substances: The Role of Molecular Weight and Aromaticity. *Environmental Science and Technology* **31**(6), 1630-1635.
- De Perre, C., Le Ménach, K., Budzinski, H., Parlanti, E.,** (2009) Development of Solid-Phase Microextraction (SPME) and its Application to the Study of Dissolved Organic Matter (DOM) - Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Interactions in Aquatic Environment. *In preparation*.
- Durjava, M.K., ter Laak, T.L., Hermens, J.L.M. & Struijs, J.** (2007) Distribution of PAHs and PCBs to dissolved organic matter: High distribution coefficients with consequences for environmental fate modeling. *Chemosphere* **67**(5), 990-997.
- Fu, P., Wu, F. & Liu, C.** (2004) Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of a Commercial Humic Acid *Chinese Journal of Geochemistry* **23**(4), 309-318.

- Gauthier, T.D., Shane, E.C., Guerin, W.F., Seitz, W.R. & Grant, C.L.** (1986) Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology* **20**, 1162-1166.
- Gauthier, T.D., Seltz, W.R. & Grant, C.L.** (1987) Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene Koc values. *Environmental Science and Technology* **21**(3), 243-248.
- Georgi, A. & Kopinke, F.-D.** (2002) Validation of a modified Flory-Huggins concept for description of hydrophobic organic compound sorption on dissolved humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(9), 1766-1774.
- Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W. & Steinberg, C.** (1998) Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – a review-. *Chemosphere* **37**(7), 1335-1362.
- Han, Y. & Guo, W.** (2008) Factors influencing analysis of chromophoric dissolved organic matter in estuarine waters by excitation emission matrix spectroscopy (EEMS). *Huanjing Kexue Xuebao / Acta Scientiae Circumstantiae* **28**(8), 1646-1653.
- Heringa, M.B. & Hermens, J.L.M.** (2003) Measurement of free concentrations using negligible depletion-solid phase microextraction (nd-SPME). *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**(9), 575-587.
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.M. & Parlanti, E.** (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* **40**(6), 706-719.
- Hur, J. & Schlautman, M.A.** (2003) Using selected operational descriptors to examine the heterogeneity within a bulk humic substance. *Environmental Science and Technology* **37**(5), 880-887.
- Kalbitz, K., Schmerwitz, J., Schwesig, D. & Matzner, E.** (2003) Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* **113**(3-4), 273-291.
- Kopinke, F.-D., Georgi, A. & Mackenzie, K.** (2001) Sorption of Pyrene to Dissolved Humic Substances and Related Model Polymers. 1. Structure-Property Correlation. *Environmental Science and Technology* **35**(12), 2536-2542.
- Lepane, V., Leeben, A. & Malashenko, O.** (2004) Characterization of sediment pore-water dissolved organic matter of lakes by high-performance size exclusion chromatography. *Aquatic Sciences* **66**(2), 185-194.
- Li, Q., Xu, X., Sen-Chun, L. & Wang, X.** (2006) Determination of trace PAHs in seawater and sediment pore-water by solid-phase microextraction (SPME) coupled with GC/MS. *Science in China Series B: Chemistry* **49**(6), 481-491.
- McCarthy, J.F. & Jimenez, B.D.** (1985) Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: binding and dissociation. *Environmental Science and Technology* **19**(11), 1072-1076.

- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T. & Andersen, D.T.** (2001) Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Journal Limnology and Oceanography* **46**(1), 38-48.
- Minero, C., Lauri, V., Falletti, G., Maurino, V., Pelizzetti, E. & Vione, D.** (2007) Spectrophotometric characterisation of surface lakewater samples: Implications for the quantification of nitrate and the properties of dissolved organic matter. *Annali di Chimica* **97**(10), 1107-1116.
- Pan, B., Ghosh, S. & Xing, B.** (2007) Nonideal Binding between Dissolved Humic Acids and Polyaromatic Hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* **41**(18), 6472-6478.
- Pan, B., Ghosh, S. & Xing, B.** (2008a) Dissolved organic matter conformation and its interaction with pyrene as affected by water chemistry and concentration. *Environmental Science and Technology* **42**(5), 1594-1599.
- Pan, B., Ning, P. & Xing, B.** (2008b) Part IV - Sorption of hydrophobic organic contaminants. *Environmental Science and Pollution Research* **15**(7), 554-564.
- Parlanti, E., Worz, K., Geoffroy, L. & Lamotte, M.** (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* **31**(12), 1765-1781.
- Perminova, I., Grechishcheva, N. & Petrosyan, V.** (1999) Relationships between Structure and Binding Affinity of Humic Substances for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relevance of Molecular Descriptors. *Environmental Science and Technology* **33**, 3781-3787.
- Poerschmann, J., Zhang, Z., Kopinke, F.D. & Pawliszyn, J.** (1997) Solid Phase Microextraction for Determining the Distribution of Chemicals in Aqueous Matrices. *Analytical Chemistry* **69**(4), 597-600.
- Polubesova, T., Sherman-Nakache, M. & Chefetz, B.** (2007) Binding of Pyrene to Hydrophobic Fractions of Dissolved Organic Matter: Effect of Polyvalent Metal Complexation. *Environmental Science and Technology* **41**(15), 5389-5394.
- Schlautman, M.A. & Morgan, J.J.** (1993) Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology* **27**(5), 961-969.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M. & Imboden, D.M.** (1993) *Environmental Organic Chemistry* New York: J. Wiley & Sons.
- Senesi, N.** (1990) Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta* **232**, 77-106.
- Thomsen, M., Dobel, S., Lassen, P., Carlsen, L., Bügel Mogensen, B. & Erik Hansen, P.** (2002) Reverse quantitative structure-activity relationship for modelling the sorption of esfenvalerate to dissolved organic matter: A multivariate approach. *Chemosphere* **49**(10), 1317-1325.
- Tremblay, L., Kohl, S.D., Rice, J.A. & Gagné, J.P.** (2005) Effects of temperature, salinity, and dissolved humic substances on the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to estuarine particles. *Marine Chemistry* **96**(1-2), 21-34.

- Wang, C.X., Yediler, A., Peng, A. & Kettrup, A.** (1995) Photodegradation of phenanthrene in the presence of humic substances and hydrogen peroxide. *Chemosphere* **30**(3), 501-510.
- You, S.-J., Yin, Y. & Allen, H.E.** (1999) Partitioning of organic matter in soils: effects of pH and water/soil ratio. *The Science of The Total Environment* **227**(2-3), 155-160.
- Zhu, D., Hyun, S., Pignatello, J.J. & Lee, L.S.** (2004) Evidence for pi-pi electron donor-acceptor interactions between pi-donor aromatic compounds and pi-acceptor sites in soil organic matter through pH effects on sorption. *Environmental Science and Technology* **38**(16), 4361-4368.
- Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B. & Saccomandi, F.** (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* **38**(1), 45-50.

Interactions between Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) and Dissolved Organic Matter (DOM) in pore waters from Arcachon Bay

Chloé de Perre, Karyn Le Ménach, Hélène Budzinski, Edith Parlanti

Abstract

Interactions between Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Dissolved Organic Matter (DOM) were investigated in pore waters from Arcachon Bay (South West coast of France). Solid Phase Microextraction coupled to Gas Chromatography and Mass Spectrometry (SPME-GC-MS) was used to quantify free and total concentrations of PAHs in pore waters extracted from marine sediments coming from the Bay and two harbors. Thanks to Dissolved Organic Carbon (DOC) concentrations, it was possible to calculate K_{DOC} values (DOC - water partition coefficient) for each PAH naturally abundant in samples. These values ranged from around 5000 to 25000 mL.g⁻¹ for pyrene and fluoranthene which were the most present PAHs having interactions with DOM. Pore waters were also characterized by UV-visible absorption and Excitation-Emission Matrix (EEM) spectrofluorometry to find out relationships between K_{DOC} values and DOM characteristics. It appeared that the most reactive DOM types were the ones with high γ fluorescence band intensity and the lowest HIX and aromaticity. A lower correlation with the α'/α ratio was also observed. Fluorescence quenching experiments were also performed and confirmed these observations.

Interactions Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) – Matière Organique Dissoute (MOD) dans des eaux interstitielles du Bassin d’Arcachon

Résumé

Les interactions entre les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et la Matière Organique Dissoute (MOD) ont été examinées dans des eaux interstitielles du Bassin d’Arcachon (côte au sud-ouest de la France). La Micro-Extraction sur Phase Solide couplée à la Chromatographie en phase Gazeuse et à la Spectrométrie de Masse (SPME-GC-MS) a été utilisée pour quantifier les concentrations en HAP libres et totaux dans des eaux interstitielles extraites de sédiments marins provenant de la lagune et de deux ports. Grâce aux concentrations en Carbone Organique Dissous (COD), il a été possible de calculer les coefficients de partition eau – carbone organique dissous (K_{DOC}) des HAP naturellement présents dans les échantillons. Ces valeurs s’échelonnaient entre 5000 et 25000 mL.g⁻¹ pour le pyrène et le fluoranthène qui étaient les HAP les plus présents ayant des interactions avec la MOD. Les eaux interstitielles ont également été caractérisées par absorption UV-visible et spectrofluorimétrie tridimensionnelle dans le but de dégager une relation entre les K_{DOC} et les caractéristiques de la MOD. Il est apparu que les échantillons de MOD les plus réactifs étaient ceux dont la fluorescence de la bande γ était la plus intense et dont le degré d’humification (HIX) et l’aromaticité étaient les plus faibles. Une plus faible corrélation avec le rapport d’intensités des maxima de fluorescence α'/α a aussi été observé. Des expériences d’extinction de fluorescence ont également été menées et ont confirmé ces observations.

I. Introduction

The Arcachon Bay, France, has been regularly monitored for many years for its organic and inorganic contamination to understand consequences on the environment of the increasing urbanization, industrialization and agricultural activities (Baumard et al. 1998, Devier et al. 2005). The economic interest of this area is mainly based on activities connected to aquatic environment such as tourism, fishing and oyster-farming, so to maintain its quality is essential. The pollution of the aquatic environment in this area is mainly due to boat presence and functioning (for yachting, fishing, oyster-farming, tourism...) (Baumard et al. 1998, Devier et al. 2005), catchment area agricultural activities which bring pesticides to the bay through rivers (Manaud et al. 1997), and to a minor extent, industrial and urban inputs (Manaud et al. 1997). It has already been shown that sediments contain relatively low levels of polychlorinated biphenyls (PCBs), dichlorodiphenyltrichloroethane and metabolites (DDTs) and trace metals, whereas they can be more contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and organotin compounds (Devier et al. 2005, Baumard et al. 1998). In this study, we have focused on the PAH pollution which is mainly pyrolytic and related to anthropogenic activities (Baumard et al. 1998).

Arcachon Bay is characterized by exchange of marine waters coming from the Atlantic Ocean ($\approx 150-450 \times 10^6 \text{ m}^3$ per tide) and freshwaters coming from more than 10 rivers (annual freshwater inputs around 10^9 m^3 , with 80% of continental water coming from the Leyre river in South-East of the Bay), resulting in quite high terrestrial inputs (Manaud et al. 1997). Natural and, to a minor extent, anthropogenic organic matter is present in the Bay due to allochthonous (continental (5000 tons per year) and oceanic (174000 tons per year) organic matter) and autochthonous (40000 tons per year) inputs (Manaud et al. 1997). In sediments, autochthonous organic matter is predominant and comes from a high primary production (plankton) and from the large development of seagrass (*Zostera noltii*) in intertidal areas (El Ghobary 1983, Auby and Labourg 1996). On account of its ability to bind contaminants and to modify their transport, their distribution, their availability and their toxicity (Chiou et al. 1986, Yates et al. 1997, Haitzer et al. 1998), organic matter is an essential component to consider for the study of contaminant fate in natural environments.

Arcachon Bay sediments can be rich in organic matter (0.1 to 5% of organic carbon, depending on the particle size, Deltreil 1969) and interstitial waters can play an important role in the fate of organic matter and contaminants for many reasons. Indeed, pore waters are at the water-sediment interface and thus are an exchange area between sediments and the water column. Organic matter and hydrophobic contaminants adsorbed to sediments can be dissolved in pore waters before being transported to the water column by diffusion, bioturbation or physical movements due to tides or waves. Sediments and pore waters can thus be considered as a reservoir and a source of carbon and hydrophobic contaminants in aquatic environments.

In pore waters, concentrations of PAHs and Dissolved Organic Matter (DOM) are usually higher than in the water column and thus the interactions between themselves could be significant. Indeed, PAHs were shown to interact with natural DOM (Akkanen et al. 2005, King et al. 2007) and therefore rich DOM pore waters could be the place of such interactions and could cause modifications of the fate, transport and distribution of PAHs in aquatic environments.

Interactions between DOM and organic contaminants are not easily studied given that the separation of these two organic entities is quite difficult without the modification of organic contaminant – DOM equilibrium. Many techniques are usually used for these studies (fluorescence quenching, dialysis...) but the most applicable to natural aquatic environments seems to be Solid Phase Microextraction (SPME). Indeed, this technique allows both trace quantification of PAHs and study of their interactions with DOM in the same analysis (Hawthorne et al. 2005). The addition of PAHs or DOM to the sample is not necessary as it is with the fluorescence quenching methodology. Moreover, only a small sample (10 ml) is necessary to the quantification of PAHs that makes easier the analysis of pore waters which generally requires a large amount of sediment to extract small water volumes.

The goals of this study were to quantify PAHs and PAH – DOM interactions by SPME-GC-MS in pore waters extracted from sediments coming from the Arcachon Bay. At the same time, DOM was characterized by UV-visible absorption and excitation-emission matrix (EEM) spectrofluorometry in order to try to understand the role of DOM properties on the interactions with PAHs.

II. Materials and Methods

Arcachon Bay is situated in the South-West coast of France and covers an area of 155 km² at high tide and around 40 km² at low tide (El Ghobary 1983), depending on the amplitude of the tide. The intertidal area has a very heterogeneous sedimentation and it is frequent to find sand, muddy sand and mud in the same zone. Muddy sand and mud samplings were privileged since the organic matter and interstitial water contents vary inversely with the particle size (Deltreil 1969, King et al. 2007).

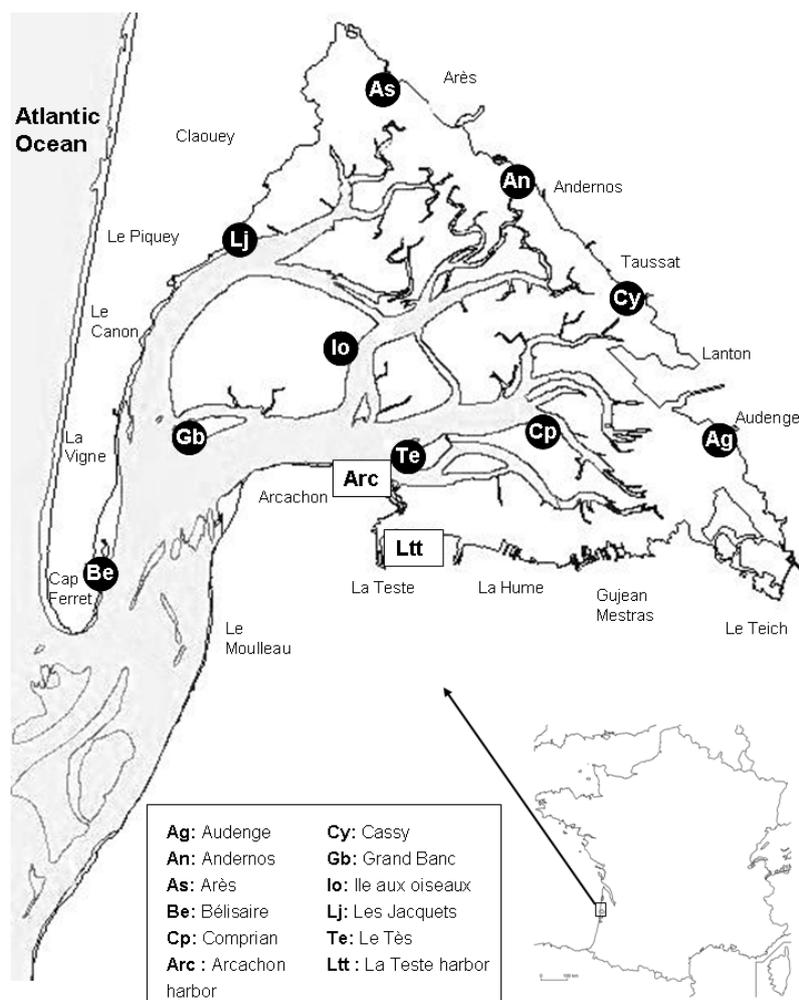


Figure 1. Map of Arcachon Bay (adapted from Ifremer).

Surface sediments were collected at low tide in 2008 and 2009 in several places of Arcachon Bay (Figure 1). Sediments from two harbors were also sampled, first from the Arcachon harbor (Arc) which is a marina, fishing harbor and boat construction place and others in the La Teste harbor (Ltt) which is mainly used for oyster-farming activities. In the Arcachon harbor, sediments were sampled in two places: one inside the harbor as far as possible from the entrance and near the shipbuilding, the other was sampled in a small area outside of the main harbor dedicated to small boats. The four Ltt samples were sampled at different places more or less near the slipway or the entrance. Samples were put into aluminum containers for the transportation back to the laboratory and stored at 4 °C if necessary less than 24h until the pore water extraction. Sediments were first centrifuged (thanks to a Universal 32R centrifuge, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) at 9000 g during 11 min at 15 °C and the extracted water was then filtered through precombusted glass fibre filters (GF/F, 0.7 µm, Whatman, Maidstone, England). Akkanen et al. (2005) showed that a high centrifugation speed (20 000 g) resulted in higher K_{DOC} values for pyrene but was sediment nature dependent. Inversely, a too slow centrifugation does not provide a good separation of particulate and dissolved phases which can cause clogging and hinders the permeation of macromolecules through the filter. Consequently, a compromise was made and a speed of 9000 g was used and filters were changed regularly to avoid

clogging. Literature does not describe the centrifugation process of pore waters in terms of tube type. It appeared here that it could be a very important parameter to take into consideration for hydrophobic contaminants. Indeed, adsorption of heavy PAHs can achieve 90% for polypropylene tubes (Corning[®], Fisher Scientific, Illkirch, France) and 45% for polycarbonate Nalgene[®] ones (Fisher Scientific, Illkirch, France) depending on the sample volume and PAH concentrations. The best solution seemed to be the use of glass tube but they appeared to be far more breakable, so the Nalgene[®] tubes were finally chosen in this study.

One part of the water (a triplicate of 10 ml when possible) was spiked with deuterated PAHs at 30 ng.L⁻¹ and directly analyzed by SPME-GC-MS. Native and deuterated compounds were purchased from Aldrich (for N, Acy, Ace, Flu, Phe, Fluo, BaA, BbF, BkF, BeP, BaP, Per, DahA), Promochem (for IP, BP, Acy d8, Ace d10, Flu d10, BaA d12, BkF d12, IP d12, DahA d14), Cambridge Isotope Laboratories (for Phe d10, An d10, Pyr d10, BbF d12, BeP d12, BaP d12, BP d12), MSD Isotopes (for DBT d8, Fluo d10, Chrys d12, Per d12), Acros (for DBT), EGA-Chemie (for N d8), Fluka (for Pyr and Chrys) and Labosi (for An) with high isotopic and chemical purities ($\geq 97\%$). The other part of the sample (at least 10 ml, depending on the moisture of the sediment) was kept for the characterization of DOM: Dissolved Organic Carbon (DOC) concentration measurements, UV-visible absorption and Excitation-Emission Matrix (EEM) spectrofluorometry. Until analyses, pore waters were stored at 4 °C in dark without poisoning or acidification. It was observed that DOM precipitated after only a few days so spectroscopic measurements were performed as soon as possible. Absorption measures were made with a Jasco V-560 spectrophotometer (Jasco, France) and EEM fluorescence spectra with a Fluorolog FL3-22 spectrofluorometer (Jobin-Yvon-SPEX, France). Fluorescence spectra were obtained after subtraction of ultrapure water (MilliQ, Millipore) blank spectrum and instrumental corrections (detailed in Huguet et al. 2009a) and were expressed in Raman units (normalization by the area of Raman band of ultrapure water). Several ratios and indices of absorbance and fluorescence intensity were used to characterize DOM: SUVA (specific UV-absorption which is the ratio of absorbance at 254 nm over DOC concentration expressed in L.mg⁻¹.M⁻¹), E₂/E₃ (absorbance at 254 nm over absorbance at 365 nm) which increases inversely with aromaticity, E₄/E₆ (absorbance at 465 nm over absorbance at 665 nm) which increases when average molecular weight decreases and polarity increases (Thomsen et al. 2002). Aromaticity percentages were also calculated (aromaticity % = 0.05 × (Abs₂₈₀/COD) + 6.74, Chin et al. (1994)), as well as fluorescence band intensity ratios and indices (Table 1).

Bands	Excitation wavelengths (nm)	Emission wavelengths (nm)	Component type	Ratios
α	370	420-480	Humic-like	f_{450}/f_{500}
α'	250-260	380-480	Humic-like + recent materials	HIX, α'/α
α''	340	420-480	Humic-like	α/α''
β	310-320	380-420	Marine humic-like	β/α , BIX
γ	280	330	Protein-like	γ/α

Table 1. Major fluorophores of seawater. *HIX is the humification index calculated as the ratio of areas between emission wavelengths 435 nm and 480 nm over area between emission wavelengths 300 nm and 345 nm for excitation at 250 nm (Zsolnay et al. 1999), f_{450}/f_{500} is the ratio of intensity at 450 nm over intensity at 500 nm for excitation at 370 nm (McKnight et al. 2001).*

DOC concentrations were measured thanks to a TOC-V CSN (Shimadzu, Duisburg, Germany). Correlations between K_{DOC} values and DOM characteristic ratios were investigated thanks to Excel (Microsoft® Office) and Modde 5.0 (Umetrics).

The development of SPME-GC-MS applied to the study of PAH – DOM interactions was previously described in de Perre et al. (2009a). Briefly, the SPME fiber was a polydimethylsiloxane (PDMS) 100 μm 23-gauge (Supelco, Bellefonte, USA) for septumless injection system (Merlin Microseal®). The extraction and desorption times were both 30 min. The extraction temperature was 40 °C and the desorption one was 270 °C. The first sample extracted was an empty flask and was desorbed at 270 °C during 30 min in split mode to condition the fiber. The GC was an Agilent 6890 model (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a mass selective detector, model 5972 operated under electronic impact (EI 70 eV). The column used was a (5% phenyl)- methylsiloxane (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness; Agilent Technologies, Chromoptic, Courtaboeuf, France). Sample analyses were performed in the pulsed splitless mode (with a pulse pressure of 30 psi for 1 min, a purge flow to split vent of 55 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ after 2 min and the gas saver set at 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ after 15 min) and the carrier gas was helium (5.6 purity grade, Linde Gas, Toulouse, France) with a flow rate of 1.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The column temperature was held initially at 60 °C for 2 min, increased to 150 °C at 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, then to 250 °C at 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and to 310 °C at 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ to be finally held on for 3 min. GC-MS analysis was used in the Selected Ion Monitoring (SIM) acquisition mode and only the molecular ions were sought. A dwell time of 80 ms was used for each ion and the scan rate was 1.31 $\text{cycle}\cdot\text{s}^{-1}$. Before each series of samples, 1 μL of a solution of native and deuterated PAHs dissolved in isooctane (HPLC grade, Scharlau Chemie, Sentmenat, Spain) was injected manually to check the GC-MS system. Extraction of ultrapure water was also done in parallel with sediments extractions to have blanks representative of the glassware and laboratory contamination. All the glassware was calcinated overnight at 450 °C before use.

The effect of physico-chemical parameters like salinity or pH on the SPME was important to decorrelate from the effect on the interactions. Like previously shown (de Perre et al. 2009b), salinity modifies the extraction of PAHs but the use of internal standards for the quantification of free and total concentrations corrects the overestimation which could occur with an external calibration. As explained in a previous work, it is possible to use an internal standard that does not interact with the sample matrix to quantify free PAHs while total PAH concentrations can be quantified thanks to their corresponding deuterated PAHs (de Perre et al. 2009a). Deuterated naphthalene was shown to be appropriate to be this internal standard of free PAHs with Aldrich humic acid and also with the pore waters of this study. Eventually, it is possible to calculate the DOM-bound PAH fraction and thus K_{DOC} (water-DOC partitioning coefficient) for each PAH, with the help of standard calibration samples in ultrapure water.

III. Results and discussion

III.1. DOM point of view

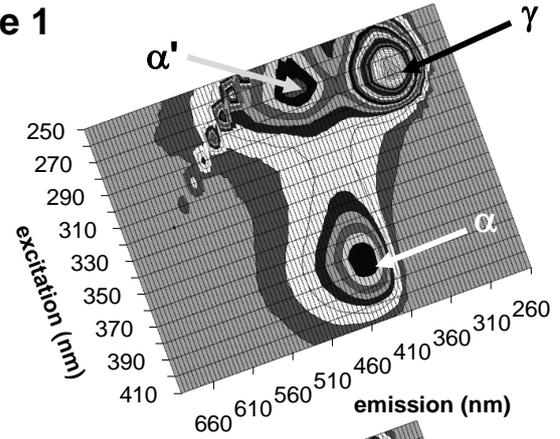
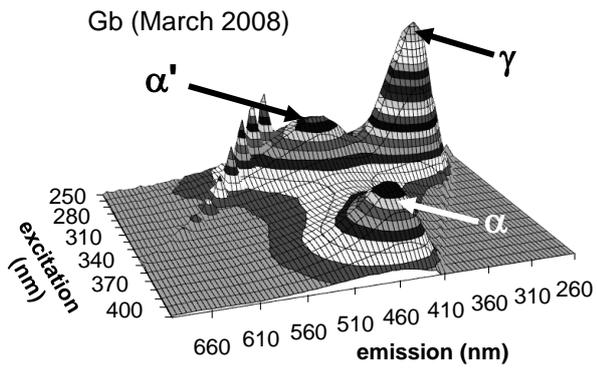
The opening of Arcachon Bay to the ocean is characterized by sandy sediments that do not contain pore water since no fine particle can be deposited due to turbulence from oceanic waters. Therefore, the more we go upstream and the more we move away from channels, the higher is the fine particle proportion in sediments and thus the bigger are the pore water and organic carbon contents. That's why, no water from Be sediments could be extracted and only a small volume of water could be extracted from Gb from a large amount of sediments which were sampled in a muddy area not representative of the site that was particularly sandy. Cp, although not on the opening to the ocean, was also too sandy to extract water. In this way, the main constraint of this study was the recovery of sufficient volume of water even though SPME and DOC analyses could be performed with only a few dozens of milliliters each. Thus, except for Gb, only muddy samples were extracted and studied. Physico-chemical parameters and DOC concentrations of pore waters are given in Table 2.

	pH	salinity	[DOC] (mg.L ⁻¹) (n=3)
Gb (march 2008)	7.4	31.9	11.4 ± 0.1
Io (march 2008)	7.4	30.8	12.8 ± 0.1
Te (march 2008)	7.6	29.8	10.2 ± 0.1
Lj (march 2008)	7.5	30.9	8.0 ± 0.1
As (july 2008)	8.0	33.5	35.2 ± 0.4
Cy (july 2008)	7.6	28.5	19.2 ± 0.2
Ag (july 2008)	7.3	22.3	21.2 ± 0.2
An (july 2008)	7.0	31.0	23.2 ± 0.2
Lj (december 2008)	7.6	24.6	10.6 ± 0.3
Te (december 2008)	7.7	27.4	16.1 ± 0.2
Io (december 2008)	7.6	28.3	11.0 ± 0.1
Arc – shipbuilding (may 2009)	7.9	29.0	14.9 ± 0.3
Arc – exterior (may 2009)	7.8	27.4	26.5 ± 0.5
Ltt – point 1 (may 2009)	7.6	25.3	16.7 ± 0.3
Ltt – point 2 (may 2009)	7.5	27.0	13.4 ± 0.1
Ltt – point 3 (may 2009)	7.6	24.7	13.1 ± 0.5
Ltt – point 4 (may 2009)	7.2	27.5	10.7 ± 0.3

Table 2. Physico-chemical properties of pore waters.

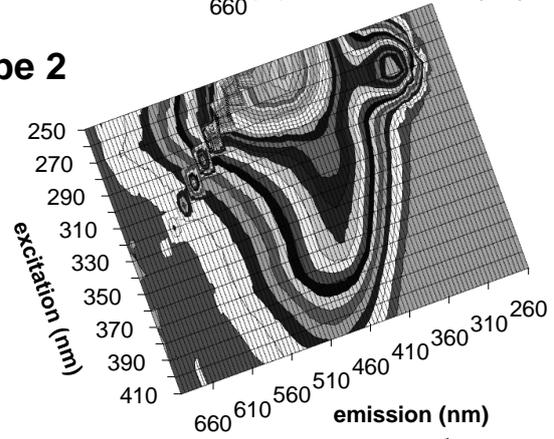
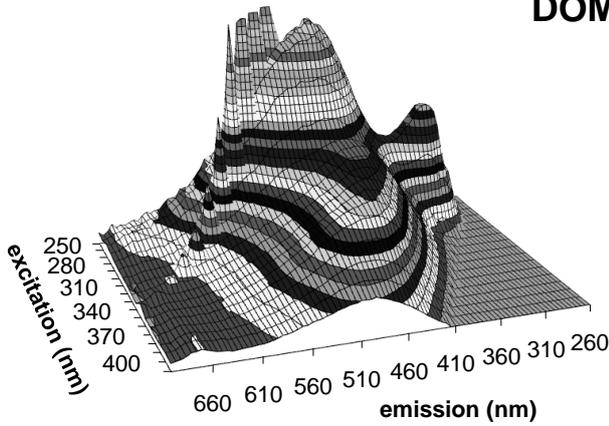
Four different types of EEM spectra are obtained and given in Figure 2. Indeed, pore waters from the Bay can be classified in four different categories. The first is representative of the sample Gb only and presents a high and well-resolved α band which has already been observed for algae culture (Parlanti et al. 2000). The value of the f_{450}/f_{500} ratio introduced by McKnight et al. (2001) (Table 1) is 2.1 for Gb, showing an aquatic or microbial origin whereas all the other samples have a ratio between 1.1 and 1.3 (terrestrially derived DOM). The second type of DOM is representative of As and An samples, which come from the northeastern part of the Bay. These two samples have high α and α' bands but their γ/α ratio is lower than in other samples, which can mean a more humified DOM. This is confirmed by the shift of fluorescence to longer wavelengths, characteristic of bigger macromolecules, and the humification index (HIX) (introduced by Zsolnay et al. 1999) which describes the maturation degree of DOM in soils. Indeed, HIX values for these two samples are the highest of the lagoon samples even though their values remain low: 5.7 for As and 7.6 for An while between 1.3 and 4.5 for other samples (Table 3). According to Huguet et al. (2009a), HIX values less than 4 are representative of marine waters and HIX values rise with the humification level of DOM (> 16 for strong humic character), meaning that As and An DOM may partly come from rivers with more terrestrial contribution.

DOM type 1



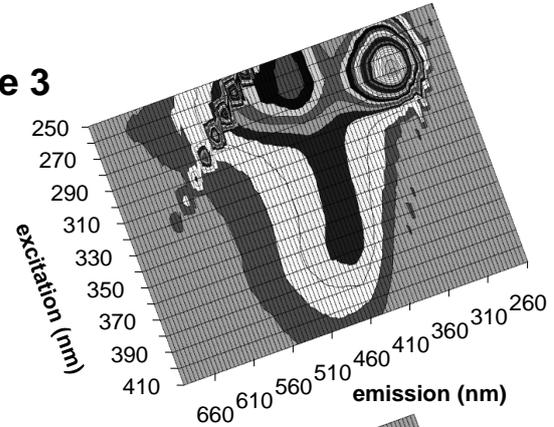
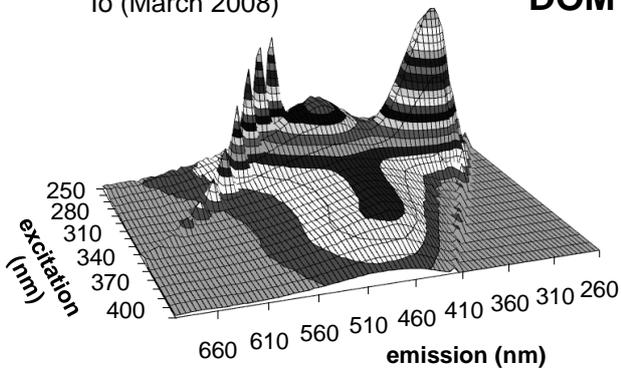
As (July 2008)

DOM type 2



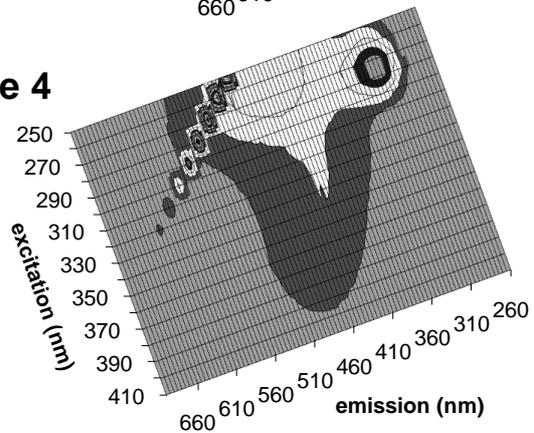
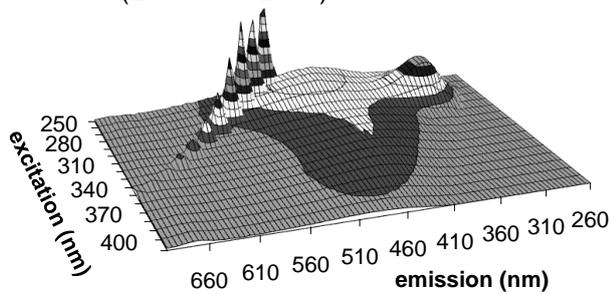
Io (March 2008)

DOM type 3



Io (December 2008)

DOM type 4



■ 0-0.2	■ 0.2-0.4	□ 0.4-0.6	□ 0.6-0.8	■ 0.8-1	■ 1-1.2	■ 1.2-1.4	□ 1.4-1.6	■ 1.6-1.8	■ 1.8-2
□ 2-2.2	□ 2.2-2.4	■ 2.4-2.6	■ 2.6-2.8	■ 2.8-3	■ 3-3.2	□ 3.2-3.4	□ 3.4-3.6	□ 3.6-3.8	□ 3.8-4
□ 4-4.2	□ 4.2-4.4	□ 4.4-4.6	□ 4.6-4.8	■ 4.8-5	□ 5-5.2	□ 5.2-5.4	□ 5.4-5.6	□ 5.6-5.8	■ 5.8-6

Figure 2. EEM and contour plot fluorescence spectra of Arcachon Bay pore waters.

	$I_{\gamma}/[\text{COD}]$	γ/α	f_{450}/f_{500}	HIX	α'/α	α/α''	SUVA	Log K_{DOC}
Gb	1.7	2.4	2.1	1.3	1.1	2.0	2.6	4.3
lo (march)	1.6	4.8	1.3	1.5	2.1	1.0	2.8	4.3
Te (march)	1.1	6.8	1.2	1.3	2.4	0.9	1.9	4.3
Lj	1.3	4.7	1.2	1.9	2.4	0.9	3.1	4.0
As	1.6	1.5	1.1	5.7	2.6	0.8	2.2	4.0
Cy	1.1	3.1	1.1	2.8	2.5	0.9	3.1	4.2
Ag	1.1	3.1	1.2	2.6	2.3	0.8	4.5	4.3
An	1.7	0.9	1.2	7.6	2.7	0.8	10.7	3.9
Te (december)	0.7	3.2	1.3	2.1	2.0	1.0	1.1	4.2
lo (December)	0.7	3.1	1.2	2.3	2.3	0.9	1.5	4.1
Arc - ship	1.4	1.5	1.1	5.5	2.5	0.9	1.3	4.2
Arc - ext	4.1	0.4	1.1	14.4	2.5	0.8	6.9	3.8
Ltt - 1	3.2	0.6	1.1	11.8	2.5	0.8	9.1	4.0
Ltt - 2	1.5	2.0	1.1	4.2	2.6	0.8	5.0	4.2
Ltt - 3	2.6	0.9	1.1	8.2	2.5	0.9	7.1	4.1
Ltt - 4	0.6	1.5	1.1	5.5	2.5	0.9	6.0	4.3

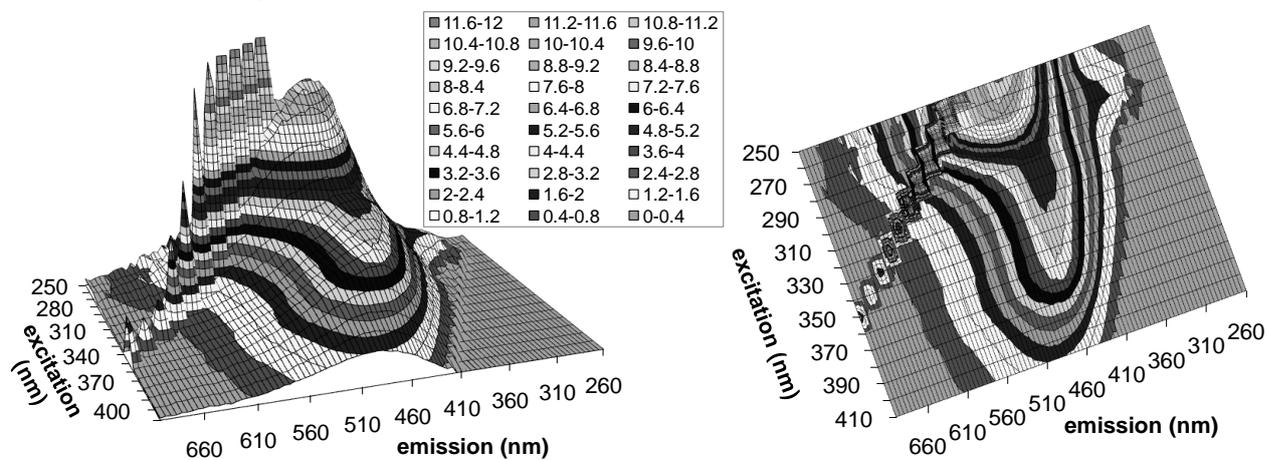
Table 3. EEM intensity ratios, SUVA and log K_{DOC} values for fluoranthene (K_{DOC} expressed in $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$).

The two previous samples, as well as Cy and Ag samples, have a high content in DOC (around $20\text{-}35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and high fluorescence intensities. However, Cy and Ag are more similar to the third type of DOM, including also lo (March), Te (March and December) and Lj (March). This type of DOM is characterized by a α'/α ratio of 2-2.5 and a γ/α ratio between 3 and 7 meaning a high biological and algal contribution with a lower content of humic substances. This indicates that this DOM is recent and may come from an algal bloom (especially for sediments sampled in early spring). The fourth type of DOM (Lj and lo of December) has actually the same characteristics as the third one but with lower fluorescence intensities. However, DOC concentrations are not so low ($10\text{-}15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for these samples so it seemed that organic carbon is more composed of non-fluorescent macromolecules than the third type.

As regards harbor interstitial waters, DOM samples are mainly of terrestrial origin. Their EEM spectra are of two sorts (Figure 3). The first type of spectra is obtained for the sample at the exterior of Arcachon harbor and the point 1 of La Teste harbor. These spectra have intensity twofold higher than the most intense of Arcachon Bay pore waters, a high HIX (14 and 12 respectively) meaning a strong terrestrial origin of DOM, confirmed by a very low γ band and a γ/α ratio around 0.5. The other spectra have lower but still high HIX (between 4 and 8), a higher γ band with a γ/α ratio between 0.9 and 2 and intensities are far lower. Even though these DOM seems to be from terrestrial origin, characteristics of an autochthonous origin are also represented. Actually, for Ltt samples, it appears that the farthest from the sea the DOM was sampled, the biggest the α and α' intensities are, so the biggest the terrestrial contribution is. It seems that, even though the harbor is recovered by water at high tide and

completely dry at low tide, the oceanic contribution of DOM is very low in relation to the terrestrial inputs into the harbor.

Exterior harbor (May 2009)



Shipbuilding (May 2009)

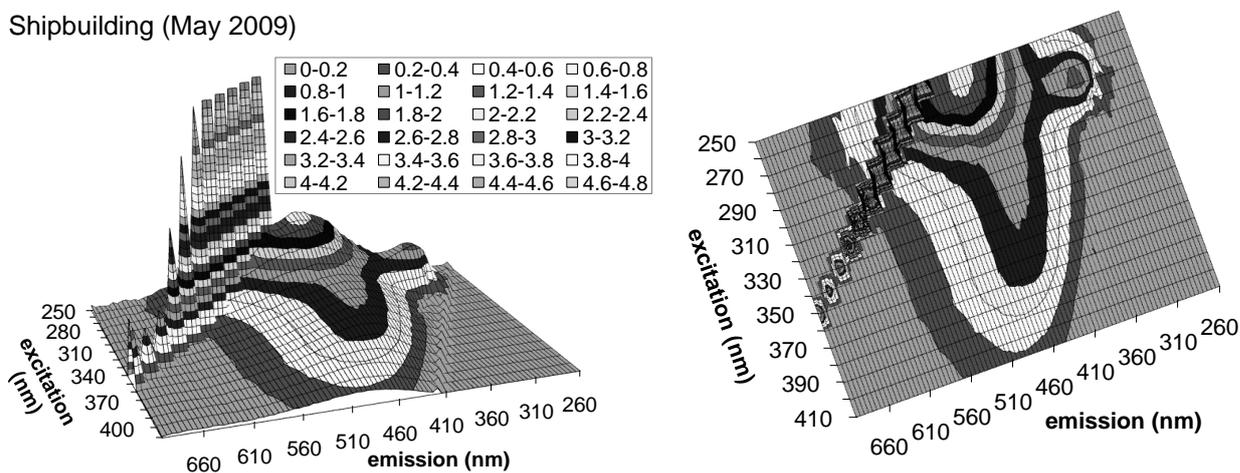


Figure 3. EEM and contour plot fluorescence spectra of harbor pore waters.

III.2. Total PAH concentration point of view

In parallel, all pore waters were extracted and analyzed by SPME-GC-MS to quantify free and total PAH concentrations; the measures were performed on one replicate to triplicates depending on the volume available per sample. All samples contained between 20 and 50 ng.L⁻¹ in total PAH concentrations with maximum individual concentrations of 20 ng.L⁻¹, except for the sample from Arcachon harbor near the shipbuilding which contained a total PAH concentration of about 120 ng.L⁻¹ with a maximal individual concentration of 50 ng.L⁻¹. The most present PAHs are usually naphthalene, fluoranthene, pyrene and phenanthrene, as shown in Figure 4 for Cy sample, which is representative of the PAH distribution of total concentrations in most of the samples studied. The results obtained for the majority of the samples confirm those obtained by King et al. (2007) and Srogi (2007) who found that major PAHs present in pore water are four-ring ones and naphthalene whereas five- and six-ring

PAHs are rarely observed. In this study, five-ring PAHs were detected (at detection limits) only in upstream samples in summer (As, Cy, An, Ag) and in the Arc shipbuilding sample. This may be because a part of heavier native PAHs were expected to be lost due to inevitable adsorption on centrifugation tubes, as well as their low solubility in water. Moreover, the limits of detection of heavy PAHs in pore waters by SPME-GC-MS were rather high (around 10-20 ng.L⁻¹); this was because of the high content of organic carbon which can interact strongly with heavy PAHs and make them undetectable by SPME, since it extracts free analytes only (Poerschmann et al. 1997). However, no other analytical technique allows the quantification of such PAH concentrations in a 10 ml sample and it makes SPME-GC-MS a useful tool to quantify PAH interactions with DOM in natural aquatic environments.

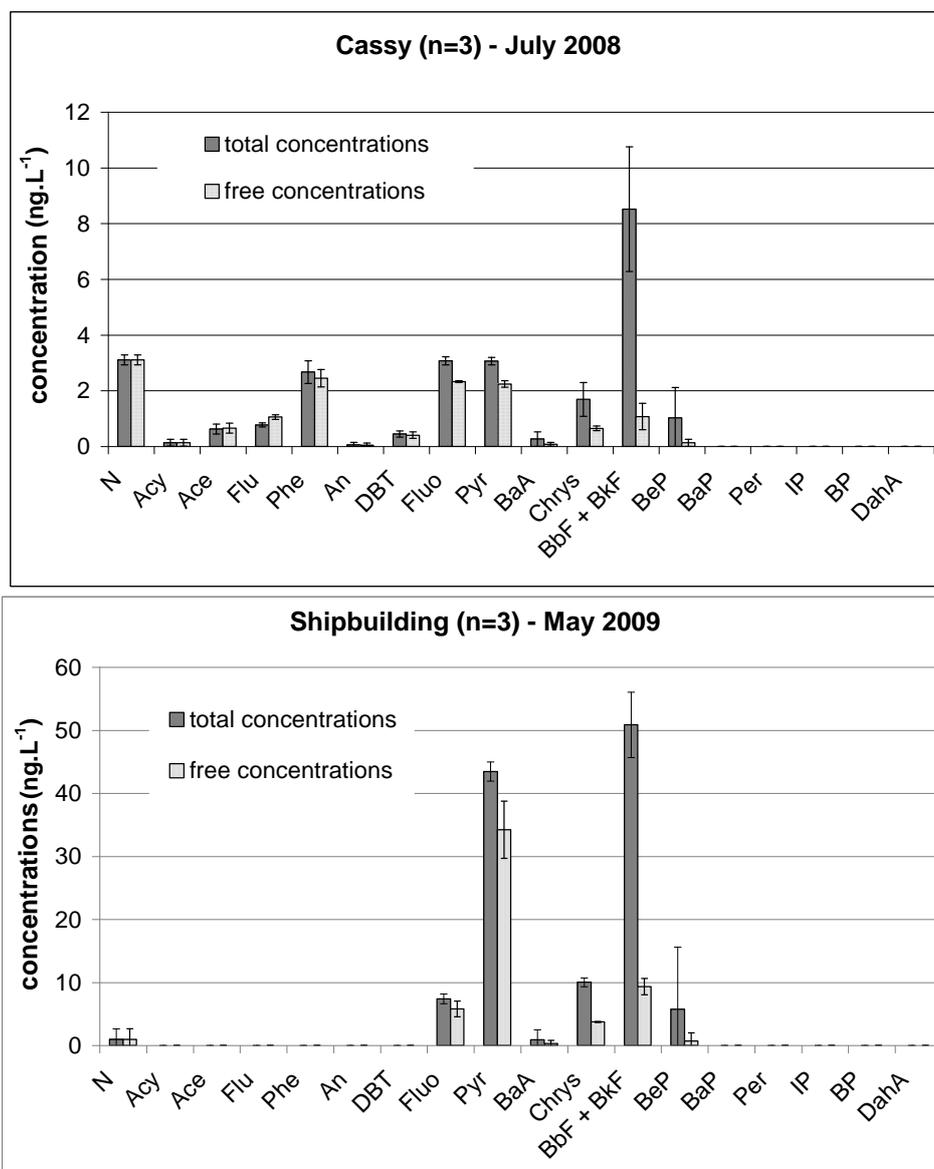


Figure 4. PAH concentrations in Cy sample (representative of the majority of other samples) and in Arc sample near Shipbuilding.

The very concentrated Arc sample has a different composition of PAHs since no light PAHs are observed but only fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo[e]pyrene and benzo[b,k]fluoranthene could be quantified (Figure 4). Moreover, the concentration of pyrene is fivefold higher than the fluoranthene one while in all other samples these two compounds are approximately in the same amounts. This sediment may have been contaminated by petrogenic PAHs since this origin of contamination provides high ratios of pyrene / fluoranthene and chrysene / benzo[a]anthracene (Socolo et al. 2000). But the absence of low molecular weight PAHs can also underline a pyrolytic source.

III.3. PAH-DOM interactions point of view.

From naphthalene to fluorene, the total and the free PAH concentrations are usually the same, meaning that no interaction occurred with pore water DOM (Figure 4). Phenanthrene shows little or no interaction depending on the sample and fluoranthene, pyrene and heavier PAHs, when they are present, have interactions with DOM in most of the studied samples. It seems that a relationship occurs between PAH hydrophobicity and K_{DOC} values, however the lack of naturally present high molecular weight PAHs in natural waters does not allow to conclude.

When SPME-GC-MS is performed on samples at trace concentrations (near the detection limits), standard deviations can be high, especially with external calibration. For some samples, the differences between total and free concentrations of PAHs were thus lower than the uncertainty of these two measures. But as this technique was shown to be very accurate on the average measure ($n = 3$), even though precision could be low, K_{DOC} values were calculated as long as free concentrations were lower than total concentrations. K_{DOC} values range from 6500 mL.g^{-1} for Arc exterior in May to 22000 mL.g^{-1} for Gb in March for fluoranthene, which is, with pyrene, the only PAH present in every sample. For both of these PAHs, their K_{DOC} values are in the same range and the ones for pyrene vary from 5000 mL.g^{-1} to 25000 mL.g^{-1} , with extreme values for the same samples as fluoranthene. As expected (Perminova et al. 1999, Durjava et al. 2007), these K_{DOC} values are lower than the ones with Aldrich humic acid (de Perre et al. 2009a) but they are in the same range as the ones found by King et al. (2007) in estuary pore waters for several PAHs and Akkanen et al. (2005) in lake pore waters for pyrene.

No strong relationship comes out to correlate K_{DOC} values and characteristic parameters of DOM (Table 4). The strongest correlation is obtained with HIX values but it is a negative correlation, contrary to what was shown by Hur and Kim (2009) for pyrene and sediment humic substances. However, in their study, HIX values are positively correlated to the molecular weight of DOM, and that whatever the sources (stream or reservoir). Here, the size of macromolecules could not be measured but E_4/E_6 (negatively correlated with average size of DOM) was calculated for each sample. These two parameters are not correlated ($R = 0.3$), that implies either macromolecules with a high HIX are not the largest ones, or E_4/E_6 is not a good descriptor for the average size of these DOM. The first supposition could be assumed since it has already been shown that the smallest macromolecules can

have higher HIX values than larger macromolecules in marine samples (Huguet et al. 2009b). But there is not any relationship between K_{DOC} values and E_4/E_6 ratios anyway ($R = -0.25$). Actually, HIX values correlate more with DOM aromaticity (calculated from absorbance at 280 nm) and SUVA (calculated from absorbance at 254 nm), with $R = 0.7$. Thus it seems that, for these pore waters, K_{DOC} of pyrene and fluoranthene increases when HIX and aromaticity of DOM decrease.

	K_{DOC} Fluo	K_{DOC} Pyr
α'/α	-0.55	-0.56
γ/α	0.58	0.70
α/α''	0.51	0.50
$\alpha'/[\text{DOC}]$	-0.57	-0.72
$\alpha/[\text{DOC}]$	-0.24	-0.37
$\gamma/[\text{DOC}]$	0.62	0.65
$[\text{DOC}]$	-0.53	-0.28
HIX	-0.71	-0.85
E_4/E_6	-0.12	-0.25
Aromaticity (%)	-0.49	-0.65
SUVA	-0.49	-0.66
E_2/E_3	0.22	0.51

Table 4. Correlation coefficients (R) between EEM and UV-visible absorption parameters and K_{DOC} of fluoranthene and pyrene.

Many papers have shown that K_{DOC} values of PAHs increase with DOM aromaticity, which is described as well by the molar absorptivities ($\lambda = 280$ nm) (Chin et al. 1997), as by the humification index (Hur and Kim 2009) or ^{13}C NMR descriptors (Perminova et al. 1999). However, in these studies, none of the DOM samples have a marine origin, that might explain the discrepancy with our results. Furthermore, a few studies have also shown that aromaticity is not always the driving factors for interactions with PAHs and DOM with high aromaticity can have the lowest K_{DOC} values (Kopinke et al. 2001, Hur and Schlautman 2003, de Perre et al. 2009b). Moreover, as our samples were characterized only by spectroscopic analyses, it can be supposed that measures about aromaticity have been distorted because of the presence of inorganic species. Indeed, Weishaar et al. (2003) have shown that iron and nitrate ions can absorb light at 250 – 280 nm and influence SUVA measurements. Because some of our samples were particularly colored, the hypothesis of the presence of inorganic iron ions is pointed out. Consequently, samples with high absorbance at 250 – 280 nm might not be the most aromatic ones but the highest iron concentrated.

The γ/α and $I_{\gamma}/[\text{DOC}]$ ratios are also correlated to K_{DOC} of pyrene and fluoranthene, with $R \approx 0.6-0.7$. This means that K_{DOC} increases when the intensity of the γ band in relation to other bands is higher, independently from the DOC concentration. This fluorescence band does not seem to be the

most reactive in the study of Hur and Kim (2009) and a negative correlation between this band and K_{DOC} of perylene has been observed by Holbrook et al. (2005). This might be explained by the composition of the γ band. Indeed, γ fluorophores, although they are known to be protein-like, are different depending on their origin. It is very likely that in the pore waters of our study, the γ band has an algal and/or seagrass origin. While in the two other studies previously cited, the γ band could have a microbial origin and thus different fluorophores, even though their fluorescence is in the same area. Moreover, a previous work (de Perre et al. 2009b) has confirmed the γ fluorophore reactivity towards PAHs. In this earlier study, the reactivity of DOM coming from *Isochrysis galbana* cultures has been investigated and it has been established that the presence of recent macromolecules could increase K_{DOC} values, especially for heavier PAHs.

Moreover, the strong reactivity of the γ band might have been responsible for the negative correlation between K_{DOC} and HIX values. Indeed, a high fluorescence in the $\text{Ex} = 250 \text{ nm} / \text{Em} = 300\text{-}345 \text{ nm}$ area, due to high γ fluorescence intensity, causes a decrease of HIX values. Consequently, the strong relationship between K_{DOC} and HIX can only be explained by either a negative correlation between K_{DOC} and the degree of maturation of DOM or a positive correlation with γ band fluorescence intensity.

In order to understand the reactivity of fulvic and humic acids of DOM, it would be wiser here to study the relationships between K_{DOC} values and α , α' band intensities. Actually, a moderate negative correlation is observed with these bands and also with the α'/α ratio ($R \approx -0.6$ for both PAHs). The results about α'/α ratio agree with our previous observations for natural waters (de Perre et al. 2009b) where we found higher K_{DOC} values for natural DOM with the lowest α'/α ratio. In order to compare our results to literature, we introduced the α'' fluorescence band (Table 1) and investigated the relationship between K_{DOC} values and the α/α'' ratio. The positive correlation for this ratio corroborates the results of Hur and Kim (2009) who have found the same relationship between K_{DOC} values and HLF/FLF (humic-like fluorescence over fulvic-like fluorescence) intensity ratio, which corresponds to our α/α'' ratio. However, the existence of such relationships must be used with care since in this study, except for Gb sample, α , α' band intensities and α'/α , α/α'' ratios are situated in a narrow range, contrary to γ band intensity, γ/α ratio and HIX (Table 3).

In order to confirm the existence of interactions between pore water DOM and PAHs, as well as the effect of the presence of macromolecules originated from γ fluorescence band, fluorescence quenching experiments were performed. The quenching of DOM fluorescence was investigated with addition of a mixture of several PAHs. Fluorescence spectra were acquired at $\text{Ex} = 250 \text{ nm} / \text{Em} = 260\text{--}600 \text{ nm}$ and $\text{Ex} = 280 \text{ nm} / \text{Em} = 290\text{--}600 \text{ nm}$ for two DOM: one with a very low γ band and a high α' band (Arc, exterior) and the other with a γ band higher than the α' one (Io, december 2009). A fluorescence quenching has been observed for Io for the α' and γ bands with concentrations of PAHs ranging from 10 to 100 ng.L^{-1} each. As for the Arc sample, the quenching of α' band was lower. However, even though these experiments confirmed the higher interactions for DOM of marine origin,

fluorescence quenching of DOM by PAHs is not the most appropriate technique for Io since PAH fluorescence is higher than the DOM one. But, when regarding the quenching of PAHs by DOM addition, it is not possible to determine which band is responsible for the reactivity with PAHs, and the quenching observed is due to overall DOM and thus is higher. Indeed, for Io, a quenching of about 5-10% of α' and γ bands has been observed with addition of 100 ng.L⁻¹ of each PAH, while a quenching from 15 to 30% (depending on the fluorescence band of PAHs) of PAH fluorescence has been observed with the same amount of DOM and contaminants.

IV. Conclusion

SPME-GC-MS has been proved to be a very appropriate tool that allows the quantification of PAHs at trace concentrations as well as the determination of K_{DOC} values for PAHs. Contrary to other techniques for the study of PAH-DOM interactions, it is not necessary to add PAHs to the sample which is a great advantage for environmental applications and field studies.

In the studied pore waters, interactions of DOM with PAHs have been shown to be DOM origin dependent and are stronger for samples with high contribution of fresh material related to biological activity (high γ fluorescence band) and negatively correlated with HIX and the α'/α ratio of DOM. Moreover, these results have been confirmed by fluorescence quenching which demonstrates the accuracy of SPME-GC-MS.

This study has also pointed out that concentrations of average and high molecular weight PAHs in the dissolved phase can be highly underestimated if their DOM associated fraction is not taken into account.

Acknowledgements

"Region Aquitaine", FEDER, ORQUE program (CPER) and INSU (IMOTOX project) are acknowledged for financial support, the French Ministry of Research for the PhD grant of C. de Perre and J. Noui for his technical help.

Literature

- Akkanen, J., Lyytikäinen, M., Tuikka, A. & Kukkonen, J.V.K.** (2005) Dissolved organic matter in pore water of freshwater sediments: Effects of separation procedure on quantity, quality and functionality. *Chemosphere* **60**(11), 1608-1615.
- Auby, I. & Labourg, P.-J.** (1996) Seasonal Dynamics of *Zostera Nolti* Hornem. in the Bay of Arcachon (France). *Journal of Sea Research* **35**(4), 269-277.
- Baumard, P., Budzinski, H. & Garrigues, P.** (1998) PAHs in Arcachon Bay, France: Origin and biomonitoring with caged organisms. *Marine Pollution Bulletin* **36**(8), 577-586.

- Chin, Y.-P., Aiken, G. & O'Loughlin, E.** (1994) Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environmental Science and Technology* **28**(11), 1853-1858.
- Chin, Y.P., Aiken, G.R. & Danielsen, K.M.** (1997) Binding of Pyrene to Aquatic and Commercial Humic Substances: The Role of Molecular Weight and Aromaticity. *Environmental Science and Technology* **31**(6), 1630-1635.
- Chiou, C.T., Malcolm, R.L., Brinton, T.I. & Kile, D.E.,** (1986) Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environmental Science and Technology* **20**, 502-508.
- De Perre, C., Le Ménach, K., Budzinski, H. & Parlanti, E.** (2009a) Development of Solid-Phase Micro Extraction (SPME) and its Application to the Study of Dissolved Organic Matter (DOM) - Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Interactions in Aquatic Environment. *In preparation*
- De Perre, C., Dorthe, A-M., Noui, J., Le Ménach, K., Budzinski, H. & Parlanti, E.** (2009b) Factorial designs to better understand interactions between Dissolved Organic Matter (DOM) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *In preparation*
- Deltreil, J.-P.** (1969) Observations sur les sols ostreicoles du Bassin d'Arcachon (Observations on oyster farm beds in Arcachon Bay). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **33**(3), 343-349.
- Devier, M.-H., Augagneur, S., Budzinski, H., Menach, K.L., Mora, P., Narbonne, J.-F. & Garrigues, P.** (2005) One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *Journal of Environmental Monitoring* **7**(3), 224-240.
- Durjava, M., ter Laak, T.L., Hermens, J.L.M. & Struijs, J.** (2007) Distribution of PAHs and PCBs to dissolved organic matter: High distribution coefficients with consequences for environmental fate modeling. *Chemosphere* **67**(5), 990-997.
- El Ghobary, H.** (1983) Diagenèse précoce en milieu littoral et mobilité des éléments métalliques. Université Bordeaux 1, France.
- Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W. & Steinberg, C.** (1998) Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – a review-. *Chemosphere* **37**(7), 1335-1362.
- Hawthorne, S.B., Grabanski, C.B., Miller, D.J. & Kreitinger, J.P.** (2005) Solid-Phase Microextraction Measurement of Parent and Alkyl Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Milliliter Sediment Pore Water Samples and Determination of K_{DOC} Values. *Environmental Science and Technology* **39**(8), 2795-2803.
- Holbrook, R.D., Breidenich, J. & DeRose, P.C.** (2005) Impact of Reclaimed Water on Select Organic Matter Properties of a Receiving Stream Fluorescence and Perylene Sorption Behavior. *Environmental Science and Technology* **39**(17), 6453-6460.
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.M. & Parlanti, E.** (2009a) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* **40**(6), 706-719.

- Huguet, A., Vacher, L., Saubusse, S., Ibalot, F. & Parlanti, E.** (2009b) New insights into the size distribution of fluorescent dissolved organic matter in estuarine waters. Submitted to *Organic Geochemistry*.
- Hur, J. & Kim, G.** (2009) Comparison of the heterogeneity within bulk sediment humic substances from a stream and reservoir via selected operational descriptors. *Chemosphere* **75**(4), 483-490.
- King, A.J., Readman, J.W. & Zhou, J.L.** (2007) Behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons in dissolved, colloidal, and particulate phases in sedimentary cores. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **87**(3), 211-225.
- Manaud, F., Bouchet, J-M., Deltreil, J-P, Maurer, D. & Trut, G.** (1997) Etude intégrée du Bassin d'Arcachon – Tome 2. *Ifremer*. Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral.
- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T. & Andersen, D.T.** (2001) Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* **46**(1), 38-48.
- Parlanti, E., Worz, K., Geoffroy, L. & Lamotte, M.** (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* **31**(12), 1765-1781.
- Perminova, I., Grechishcheva, N. & Petrosyan, V.** (1999) Relationships between Structure and Binding Affinity of Humic Substances for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relevance of Molecular Descriptors. *Environmental Science and Technology* **33**, 3781-3787.
- Poerschmann, J., Zhang, Z., Kopinke, F.D. & Pawliszyn, J.** (1997) Solid Phase Microextraction for Determining the Distribution of Chemicals in Aqueous Matrices. *Analytical Chemistry* **69**(4), 597-600.
- Soclo, H.H., Garrigues, P. & Ewald, M.** (2000) Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. *Marine Pollution Bulletin* **40**(5), 387-396.
- Srogi, K.** (2007) Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters* **5**(4), 169-195.
- Thomsen, M., Dobel, S., Lassen, P., Carlsen, L., Bügel Mogensen, B. & Erik Hansen, P.** (2002) Reverse quantitative structure-activity relationship for modelling the sorption of esfenvalerate to dissolved organic matter: A multivariate approach. *Chemosphere* **49**(10), 1317-1325.
- Weishaar, J.L., Aiken, G.R., Bergamaschi, B.A., Fram, M.S., Fujii, R. & Mopper, K.** (2003) Evaluation of Specific Ultraviolet Absorbance as an Indicator of the Chemical Composition and Reactivity of Dissolved Organic Carbon. *Environmental Science and Technology* **37**(20), 4702-4708.
- Yates, L.M.I., Engerbretson, R.R., Haakenson, T.J. & Wandruszka, R.V.** (1997) Immobilization of aqueous pyrene by dissolved humic acid. *Analytica Chimica Acta* **356**, 295-300.
- Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B. & Saccomandi, F.** (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* **38**(1), 45-50.

Interactions between benzodiazepines and dissolved organic matter

Chloé de Perre, Julien Noui, Karyn Le Ménach, Hélène Budzinski, Edith Parlanti

Abstract

Although “emerging” contaminants are more and more monitored in aquatic environments, their fate in natural systems are still little studied, especially regarding Dissolved Organic Matter (DOM) effect on their distribution. Interactions between pharmaceuticals and DOM were investigated thanks to Solid Phase Microextraction coupled with Gas Chromatography and Mass Spectrometry (SPME-GC-MS) and three-dimensional Excitation-Emission Matrix (EEM) spectroscopy. Pharmaceuticals studied were carbamazepine and diazepam which belong to the benzodiazepine class. Several DOM samples were used: Aldrich humic acid, marine, river and pore waters. Results show weak interactions between these pharmaceuticals and DOM which are significant when analyzed by fluorescence quenching but not by SPME. Interactions have been shown to be dependent on pharmaceuticals and DOM origin but also on observed fluorescence peaks. Interactions seem to be correlated with hydrophobicity (especially for diazepam) and size of macromolecules (especially for carbamazepine) but not with DOM aromaticity.

Interactions entre les benzodiazépines et la matière organique dissoute

Résumé

Bien que les contaminants « émergents » soient de plus en plus surveillés dans l'environnement aquatique, leur devenir dans les systèmes naturels demeure peu étudié, surtout en ce qui concerne l'effet que la Matière Organique Dissoute (MOD) peut avoir sur leur distribution. Les interactions entre les substances pharmaceutiques et la MOD ont été examinées par Micro-Extraction sur Phase Solide couplée à la Chromatographie en phase Gazeuse et à la Spectrométrie de Masse (SPME-GC-MS) et par spectrofluorimétrie tridimensionnelle. Les médicaments étudiés ici sont la carbamazépine et le diazépam qui appartiennent à la classe des benzodiazépines. Plusieurs échantillons de MOD ont été utilisés : de l'acide humique Aldrich et des eaux naturelles marine, de rivière et interstitielle. Les résultats ont montré des interactions faibles entre ces composés pharmaceutiques et la MOD, qui sont significatives lorsqu'elles sont mesurées par extinction de fluorescence mais pas par SPME. Il a été montré que les interactions sont dépendantes des médicaments, de l'origine et de la structure de la MOD, mais aussi du fluorophore observé. Il semblerait que les interactions soient corrélées au caractère hydrophobe (surtout pour le diazépam) et à la taille des macromolécules (surtout pour la carbamazépine) mais pas avec l'aromaticité de la MOD.

I. Introduction

Organic contaminants are well known to be present in aquatic environments but more recently, thanks to improvements in analytical techniques, “new” organic contaminants were measured at non negligible concentrations in different aquatic systems. Among these “emerging” contaminants, there are pharmaceuticals. These organic compounds come from veterinary and human uses and are frequently found in aquatic environments (Halling-Sørensen et al. 1998). Once ingested, they are totally or partially metabolized and excreted in their original and/or conjugated form via urine or feces (Brun et al. 2006, Khetan and Collins 2007). These compounds are usually carried by domestic waste streams to municipal sewage treatment plants or sometimes to the receiving water without treatment (Moeder et al. 2000, Brun et al. 2006). Even if they go through wastewater treatment plants, some of these molecules are not removed and are expelled unchanged into aquatic environments (Nghiem et al. 2006, Moeder et al. 2000, Brun et al. 2006). Even though studies of the behavior of pharmaceuticals in wastewater treatment plants have been increasing these years, little is known about their fate once in natural aquatic environments. Moreover, new pharmaceuticals are introduced everyday on the market and their consumption is increasing constantly; it is particularly true for antiepileptics and antidepressants, to which carbamazepine and diazepam belong respectively. Both of these benzodiazepines are of concern for the environment since they are consumed in great volumes (France is the biggest antidepressant user in Europe) and are prescribed over long periods (Khetan and Collins 2007). Moreover, these pharmaceuticals can be present for a long time in the environment since they resist degradation or because their degradation rate is compensated by their continuous introduction into the environment (Nunes et al. 2005, Nghiem et al. 2006). Besides, little is known about the chronic toxicity of benzodiazepines and some studies have shown that they may be a threat for aquatic organisms (Oetken et al. 2005, Quinn et al. 2008, Pascoe et al. 2003).

Consequently, we investigated these two benzodiazepines and their fate in aquatic environments. In this paper, we studied the interactions of these compounds with the dissolved organic matter (DOM) of several types of water. Nowadays this topic is not much studied but could be very important for the knowledge of the fate of pharmaceuticals in natural waters. Indeed, it was already proven that DOM can interact with organic contaminants and thus modify their behavior, their bioavailability or their toxicity (e.g. Haitzer et al. 1998, Parikh et al. 2004, Perdue and Wolfe 1982) but just a few papers focus on pharmaceuticals (e.g. Bai et al. 2008, Maskaoui et al. 2007). Besides, the paper of Stein et al. (2008) showed that sorption of neutral drugs onto sediments could be due to their interaction with the natural organic matter fraction of sediments, so similar interactions could be supposed to occur in the dissolved phase of water.

To reach this understanding about the interactions, a few analytical techniques are available. One of them, which seems very efficient, is Solid Phase Microextraction (SPME). This tool consists of a polymer fiber which is plunged into a sample and extracts freely dissolved analytes. The fiber can then be desorbed directly in the injector of a Gas Chromatograph coupled to Mass Spectrometry (GC-

MS) for example. The large variety of available fibers makes this technique a very selective, sensitive and useful one, and it has proved to be a reliable system for interaction studies (Poerschmann et al. 1997, de Perre et al. 2009). Another appropriate technique is fluorescence quenching which also allows to characterize interactions between DOM and organic contaminants. This technique is widely applied to fluorescent Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) while very few studies involve the fluorescence quenching of DOM by non-fluorescent organic contaminants.

The goals of this study were first to develop SPME-GC-MS for the analysis of carbamazepine and diazepam and then to apply it to the interactions of these compounds with artificial and natural DOM. Moreover, fluorescence quenching of DOM by these two compounds was also investigated. By connecting the interaction behavior with the DOM fluorescence spectra, we also wished to progress in the knowledge of the relationship between DOM properties and the association with pharmaceuticals.

II. Materials and methods

In order to study DOM with fluorescence characteristics as different as possible, four different samples of DOM were investigated: Aldrich humic acid, pore water from marine sediments, river water and marine water. Aldrich humic acid was dissolved in ultrapure water (MilliQ, Millipore, Molsheim, France) and filtered through 0.7 μm GF/F filters (Whatman, Maidstone, England). The pore water was extracted by centrifugation (9000 g for 11 min at 15 °C, Universal 32R centrifuge, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) from sediment sampled in the Arcachon Bay (South West coast of France) (Figure 1), and filtered through 0.7 μm GF/F filters too.



Figure 1. Sampling map.

The marine water was sampled in Toulon (South East coast of France) in the Mediterranean Sea, filtered through 0.45 μm Polycap™ (Whatman, Florham Park, USA) and concentrated by combined nanofiltration/reverse osmosis in order to concentrate DOM without concentrating salts (Huguet, 2007). The freshwater was sampled in the River Garonne at La Réole (South West of

France) and was used after filtration through 0.45 μm Polycap™ (Whatman, Florham Park, USA) at natural DOM concentration and after reverse osmosis concentration. This latest concentrated sample was described in greater details by Huguet et al. (2009). For SPME analyses, DOM samples were used at concentrations of about 11 mg.L^{-1} of Dissolved Organic Carbon (DOC) and for quenching fluorescence studies, concentrations were of about 1-2 mg.L^{-1} (Table 1). Dilutions were performed thanks to ultrapure water and physico-chemical parameters were measured for each sample with the help of a multi-parameter instrument (340i, WTW, Weilheim, Germany) (Table 1). Salinity and pH values were not expected to affect interactions since, for all quenching experiments, salted samples were highly diluted so the highest salinity was 2.7 and all pH values were in the same range (Table 1). In the same manner, for SPME analyses, blanks (pharmaceuticals in ultrapure water) were made at the same pH and salinity as samples with DOM. Consequently, samples were considered here to be different essentially because of their DOM chemical and physical properties.

DOM	Techniques	pH	Salinity	Conductivity (mS.cm^{-1})	[DOC] (mg.L^{-1})
Aldrich humic acid	Fluorescence quenching	6.5	0.0	0.1	0.7
	SPME-GC-MS	7.5	0.0	0.02	13.8
River water	Fluorescence quenching	7.8	0.0	0.3	2.3
	SPME-GC-MS	7.7	0.1	0.8	11.0
Sea water	Fluorescence quenching	6.4	0.8	1.9	0.9
	SPME-GC-MS	7.6	9.4	16.0	11.4
Pore water	Fluorescence quenching	7.5	2.7	5.1	1.7
	SPME-GC-MS	7.4	12.0	20.0	3.2

Table 1. Physico-chemical parameters of DOM samples. *A few months can have elapsed between fluorescence quenching and SPME-GC-MS analyses, explaining some discrepancies between salinity and DOC concentration dilution factors, especially for the pore water (likely due to precipitation of organic matter).*

Carbamazepine and diazepam (purities > 99%) were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France), carbamazepine d10 (purity of 98.2%) from Cluzeau Info Labo (Sainte Foy La Grande, France) and diazepam d5 (purity of 98%) from Cambridge Isotope Laboratories (LGC Standards, Molsheim, France). Native compounds were dissolved in methanol (LiChrosolv® gradient grade for Liquid Chromatography, Merck, Darmstadt, Germany) at a concentration of about 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in individual solutions and then mixed when the two compounds were studied simultaneously. These methanol solutions were added (with or without dilution) to ultrapure water to achieve the needed

concentrations in aqueous samples. Deuterated compounds were used as internal standards to quantify spiked waters.

Aqueous solutions were prepared the day before analyses to let benzodiazepines and DOM reach equilibrium, since Bai et al. (2008) showed that 12h were sufficient for carbamazepine and humic substances (isolated from a landfill leachate) whereas Stein et al. (2008) had to wait 24h with organic matter from sediments.

Concentrations of benzodiazepines were verified in ultrapure water and in the presence of DOM to validate the process of spiking waters. This verification was performed by Solid Phase Extraction (SPE) with the following protocol. MCX 3 mL (Oasis® Waters, Milford, USA) cartridges were conditioned and cleaned with 3 mL of ethyl acetate (Multisolvent® HPLC grade, Scharlau Chemie, Sentmenat, Spain) and 3 mL of ultrapure water at pH 2 before samples (10 mL) were eluted (after addition of internal standards). Cartridges were then dried under vacuum for 30 min to eliminate water. After that, compounds were eluted with 3 mL of ethyl acetate, 3 mL of ethyl acetate/acetone (50/50) (Multisolvent® HPLC grade, Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) and finally 3 mL of dichloromethane/methanol/ammonium hydroxide (49/49/2) (dichloromethane for residue and pesticide analysis; NH₄OH reagent ACS, Acros Organics, Geel, Belgium). This elution solvent was then completely evaporated under a gentle nitrogen stream (4.5 quality, Linde Gas, St Priest, France) and compounds were recovered thanks to methanol. At this point, a third deuterated compound was added in order to quantify the loss of internal standards during extraction and evaporation: imipramine d4 (99% purity, LGC Standards, Molsheim, France). Samples were stored at -18 °C and were then diluted in water (methanol/water – 1/9) just before their injection in a Rapid Resolution Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (RRLC-MS/MS). RRLC analyses were performed thanks to an Agilent 6410 model (Agilent Technologies, Massy, France) operated under electrospray ionization (ESI) and triple quadrupole. Separation was performed thanks to a Zorbax SB C18 (50 × 2.1 mm, 1.8 µm) column (Agilent Technologies, Chromoptic, Courtaboeuf, France) with a mobile phase flow rate of 0.5 mL.min⁻¹: Eluent A–ultrapure water, formic acid 0.1%; eluent B–methanol, formic acid 0.1%; gradient: 0–12 min: 0% B, 12-13 min: 65% B, 13-15 min: 100% B, 15-20 min: 0% B. Compounds were ionized in the positive ion polarity mode and analyzed in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode at appropriate m/z transitions (237→194 for carbamazepine, 285→154 for diazepam, 290→154 for diazepam d5 and 285→85.7 for imipramine d4).

SPME-GC-MS was used to quantify both total and freely dissolved contaminant concentrations in the samples in order to describe their interactions with DOM. SPME analyses of 10 mL spiked ultrapure water samples were performed with commercially available PDMS (polydimethylsiloxane) 100µm, PDMS-DVB (divinylbenzene) 65 µm, PA (polyacrylate) 85 µm, Carbowax™-DVB 65 µm and PEG (polyethyleneglycol) 60 µm coated fibers from Supelco (Bellefonte, USA). After immersion of the fiber in the sample, it was immediately desorbed into the GC-MS injection port. GC-MS areas were compared to determine the best fiber, the optimal extraction time and injection temperature and effects of pH and salinity. The GC was an Agilent 6890 model (Agilent

Technologies, Massy, France) equipped with a 5972 mass selective detector operated under electronic impact (EI 70 eV). The column used was a (5% phenyl)-methylsiloxane (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness; Agilent Technologies, Chromoptic, Courtaboeuf, France). SPME analyses were performed in the pulsed splitless mode, the pulse pressure was 30 psi for 1 min, after 2 min the purge flow to split vent was 55 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the gas saver was set at 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ after 15 min. The carrier gas was helium (purity 5.6, Linde Gas, Toulouse, France) with a flow rate of 1.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and linear velocity of 42 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. The column temperature was held initially at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, increased to 280 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and then held on for 6 min, to have an analysis total time of 19 min. During GC/MS analysis and decreasing of the GC oven temperature (30 min), the SPME fiber was maintained in the injector port to be conditioned before each extraction. For the quantification of pharmaceuticals, GC/MS was used in the Selected Ion Monitoring (SIM) acquisition mode (observed ions were m/z 193 for carbamazepine, m/z 203 for carbamazepine d10, m/z 256 for diazepam and m/z 261 for diazepam d5). A dwell time of 90 ms was used for each ion and the scan rate was 1.18 $\text{cycle}\cdot\text{s}^{-1}$.

Interactions between DOM and pharmaceuticals were quantified thanks to the water-DOM partition coefficient (K_{DOC}) and the assumed following equilibrium:



from which the equation of K_{DOC} results:

$$K_{\text{DOC}} = \frac{[\text{pharmaceutical} - \text{DOM}]}{[\text{pharmaceuticals}][\text{DOC}]} \quad (2)$$

(with [pharmaceutical-DOM] the concentration of complexes formed by pharmaceutical-DOM interactions, [pharmaceuticals] is the free concentration of pharmaceuticals in the dissolved phase and [DOC] the concentration of Dissolved Organic Carbon (DOC) which was used to quantify DOM concentrations.)

DOC concentrations were measured thanks to a TOC-V CSN (Shimadzu, Duisburg, Germany). When measurements of interactions are made by SPME-GC-MS, as this technique extracts only free analytes, the K_{DOC} equation can be written:

$$K_{\text{DOC}} = \frac{a_{\text{withoutDOM}} - a_{\text{withDOM}}}{a_{\text{withDOM}} \cdot [\text{DOC}]} \quad (3)$$

(with $a_{\text{withoutDOM}}$, the area of pharmaceuticals in the sample without DOM which is proportional to free concentration of pharmaceuticals in absence of DOM, i.e. the total concentration, and a_{withDOM} which is proportional to free concentration in presence of DOM.)

This equation underlines the fact that if no interaction occurs in a sample, $a_{\text{withoutDOM}}$ and a_{withDOM} should have the same value. However, this is true only if samples with and without DOM are strictly identical except for the DOM content (same pH, same salinity...).

The pharmaceutical-DOM interactions were also studied by Excitation Emission Matrix (EEM) spectroscopy. This technique is based on the fact that stable non-fluorescent complexes can be formed between DOM fluorophores and organic compounds with the equilibrium previously described

(1). As for fluorescent contaminants like Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, their fluorescence efficiency is higher than the one of DOM so fluorescence quenching of the contaminant is easier to observe than the one of DOM. However, pharmaceuticals are less fluorescent than DOM, therefore the DOM fluorescence quenching was observed here. But even though pharmaceuticals have low fluorescence efficiency, their intensity, especially for diazepam, can achieve 30% of the DOM fluorescence and thus cannot be ignored or subtracted from DOM fluorescence. Consequently, the equation 4 in a form similar to the Stern-Volmer equation used for PAHs (Gauthier et al. 1986) cannot be used here for pharmaceuticals.

$$\frac{F_0}{F} = K_{DOC} \cdot [\text{pharmaceuticals}] + 1 \quad (4)$$

(with F_0 the fluorescence of DOM without any pharmaceuticals and F the fluorescence of DOM in the presence of pharmaceuticals but subtracted from drug fluorescence).

Moreover, this equation would suppose that the fluorescence of pharmaceuticals is not quenched by the presence of DOM, which may be wrong. Therefore, in this case different assumptions have to be made, that is why we considered that the K_{DOC} equation can be written:

$$K_{DOC} = \frac{[\text{pharmaceuticals} - \text{DOM}]}{[\text{DOM}]_{free} [\text{pharmaceuticals}]_{free}} = \frac{F_{DOM} + F_{drug} - F}{[\text{DOM}]_{free} [\text{pharmaceuticals}]_{free}} \quad (5)$$

(with F_{DOM} the fluorescence of DOM alone, F_{drug} the fluorescence of pharmaceuticals alone and F the fluorescence of DOM and pharmaceuticals together, in the same DOM and pharmaceutical concentrations).

The problem of this equation is the determination of $[\text{DOM}]_{free}$ and $[\text{pharmaceuticals}]_{free}$ since their fluorescence cannot be differentiated in the mixture. Therefore, the only way is to assume that their fluorescence is quenched in the same proportions, even though it could be not exactly true. However, it would be wrong to consider that no quenching or total quenching occur on one entity and not on the other. Therefore the equation 6 can be written.

$$\frac{F}{F_{DOM} + F_{drug}} = \frac{F_{DOM(\text{drug})}}{F_{DOM}} = \frac{F_{drug(\text{DOM})}}{F_{drug}} \quad (6)$$

(with $F_{DOM(\text{drug})}$ the DOM fluorescence in presence of pharmaceuticals and $F_{drug(\text{DOM})}$ the pharmaceutical fluorescence in presence of DOM).

As $F_{DOM(\text{drug})}$ is proportional to the concentration of free DOM and F_{drug} is proportional to the total concentration of pharmaceuticals in the sample, equations 5 and 6 can be written (after rearrangements):

$$K_{DOC} = \frac{(F_{DOM} + F_{drug})^3 - F \cdot (F_{DOM} + F_{drug})^2}{F^2 \cdot F_{DOM}} \times \frac{1}{[\text{pharmaceuticals}]_{total}} \quad (7)$$

(with $[\text{pharmaceuticals}]_{total}$ the total concentration of pharmaceuticals measured by SPME-GC-MS).

The spectrofluorometer used was a Fluorolog FL3-22 model (Jobin-Yvon, France) equipped with a xenon lamp (450 W). All emission fluorescence spectra were acquired with a 1 cm quartz cell (Hellma, France) thermostated at 20 °C, with an integration time of 0.5 s, an increment of 1 nm,

excitation and emission band paths of 4 nm and in the S/R mode (the sample signal (S) is automatically normalized by the lamp reference signal (R)). Spectra were multiplied by emission correction factors. EEM spectra were acquired at excitation wavelengths from 250 to 410 nm with an increment of 10 nm and emission wavelengths ranged from 260 to 700 nm. For each DOM sample and both pharmaceuticals, a series of EEM fluorescence spectra were acquired: ultrapure water only, ultrapure water spiked with one pharmaceutical (dissolved in methanol), DOM spiked with the same pharmaceutical (at the same concentration and amount of methanol) and finally the DOM sample spiked with the same amount of methanol but without pharmaceuticals. The spectra were corrected for the background fluorescence of ultrapure water and fluorescence intensity was expressed in Raman units as already described by Huguet et al. (2009). When interactions were shown to occur, two-dimensional fluorescence quenching spectra were performed at appropriate wavelengths with concentrations of pharmaceuticals varying from 2 to 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Linear correlations between fluorescence quenching and pharmaceutical concentrations were investigated thanks to OriginPro 7.5 (OriginLab corporation, USA).

In order to be in the linearity domain of the spectrofluorometer, quenching analyses were acquired for samples at 1-2 mg.L^{-1} of DOC and absorbances were checked to be less than 0.1 at 250 nm (maximal absorbance observed for studied samples: 0.09) thanks to a Jasco V-560 spectrophotometer (Jasco, France) equipped with deuterium and tungsten iodine lamps.

The fluorescence quenching technique is not expected to give the same results as SPME since only interactions with fluorescent DOM can be seen contrary to SPME experiments. Moreover, interactions are more visible by SPME with a high amount of DOM added to a minimal concentration of pharmaceuticals (to maximize the decrease of GC-MS areas), while, by fluorescence quenching, interactions are better observed when a high amount of pharmaceuticals is added to a low concentration of DOM (to maximize the decrease of DOM fluorescence). That's why concentrated DOM was used with SPME and high concentrations of pharmaceuticals were used with the fluorescence quenching technique.

III. Results and discussion

III.1. SPME-GC-MS development

The first step of the SPME-GC-MS development was the determination of the most appropriate fiber, i.e. the most sensitive and the most reproducible one. The recommended fibers and the most used ones in the literature for the extraction of benzodiazepines in aqueous matrices (Luo et al. 1998) were tested: PDMS 100 μm , PDMS-DVB 65 μm , PA 85 μm and Carbowax™-DVB 65 μm . SPME-GC-MS areas were obtained from solutions of 10-15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and then normalized to a concentration of 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for comparison. Figure 2 demonstrates that whatever the fiber type, sensitivity is far better for diazepam than for carbamazepine.

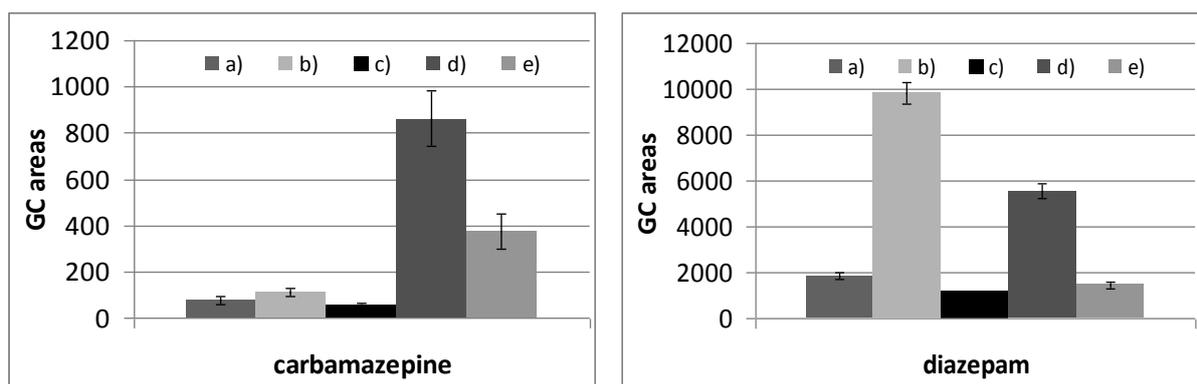


Figure 2. Comparison of fibers : (a) PDMS 100 μm , (b) PDMS-DVB 65 μm , (c) PA 85 μm , (d) CarbowaxTM-DVB 65 μm , (e) CarbowaxTM-DVB 70 μm StableFlexTM for a concentration of 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of pharmaceuticals, $n=3$.

This may be partly due to the thermal degradation of carbamazepine into iminostilbene at the moment of the injection since this compound has been observed on chromatograms at m/z 193 (iminostilbene molecular weight) and this degradation has already been documented (Frigerio et al. 1973). However, the ratio of iminostilbene over carbamazepine in terms of GC-MS areas seems to be quite constant in the pulsed injection mode and this has been confirmed by the small standard deviations obtained for carbamazepine areas; so except for the sensitivity loss, this degradation does not affect analyses. As regards the fiber, we decided to use the CarbowaxTM-DVB 65 μm one since it offers the best sensitivity for carbamazepine contrary to the PDMS-DVB one which is not adapted to this compound, despite its good sensitivity for diazepam. CarbowaxTM-DVB fibers were also available in StableflexTM type, which makes the fiber more flexible than the original ones and thus minimizes fiber breakage according to the supplier. This type of fiber was also tested but its sensitivity was lower than the original one (Figure 2). Consequently, interaction experiments were done with CarbowaxTM-DVB 65 μm fibers.

Once the fiber is chosen, it is necessary to evaluate the effect of extraction time to know the time necessary to achieve equilibrium between the fiber and the sample. Figure 3 shows that this equilibrium is not reached for diazepam and may be reached for carbamazepine at 120 min of immersion. A lower time of extraction was chosen (30 min) in order to be at a moment before the observed fiber-sample equilibrium. This immersion time allows to disturb minimally the pharmaceutical-DOM equilibrium and to be sure of being at an extraction time not corresponding to a saturation of the fiber. After that, desorption temperature was investigated. Three temperatures were tested (200 $^{\circ}\text{C}$, 220 $^{\circ}\text{C}$ and 250 $^{\circ}\text{C}$) and desorption was shown to be maximal at 250 $^{\circ}\text{C}$ (results not shown). These conditions (a CarbowaxTM-DVB fiber, a 30 min extraction time and a 250 $^{\circ}\text{C}$ desorption temperature) offer limits of detection in ultrapure water for carbamazepine and diazepam of 0.27 ± 0.08 and 0.09 ± 0.03 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectively and were thus used for the study of pharmaceutical-DOM interactions.

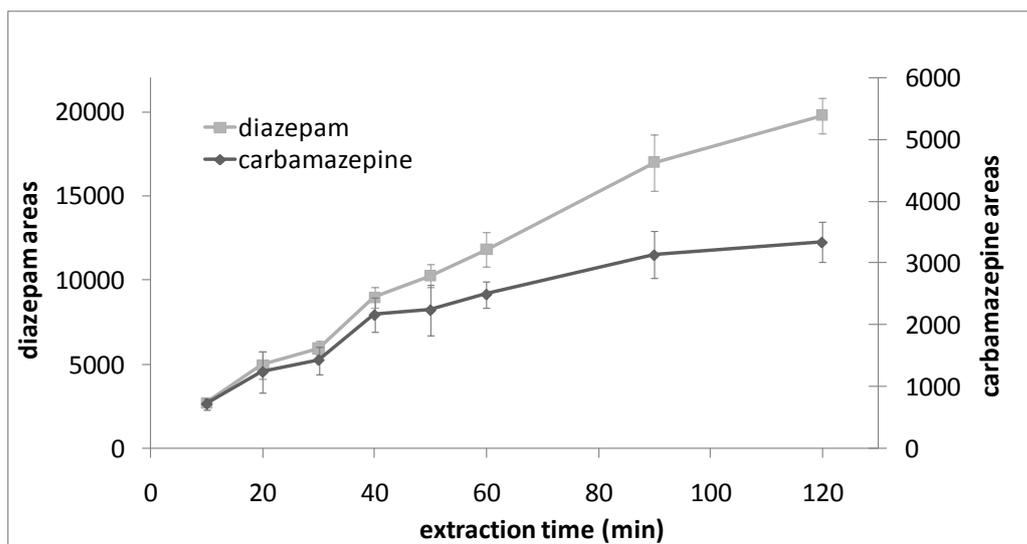


Figure 3. Evolution of pharmaceutical areas with the immersion time of the fiber, [carbamazepine] = $2.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ - [diazepam] = $2.6 \mu\text{g.L}^{-1}$, $n = 3$.

To make sure this tool could also be used for the quantification of pharmaceuticals, internal standardization was developed and its linearity range was checked. The linearity of SPME-GC-MS was examined on the range $0\text{-}10 \mu\text{g.L}^{-1}$ and it followed that areas vary linearly with good correlation coefficients for both pharmaceutical concentrations ($R^2 = 0.9978$ for carbamazepine and 0.9966 for diazepam, $n = 5$). Internal calibration recoveries were of 97 and 104% for carbamazepine and diazepam respectively.

The effects of pH and salinity on SPME were then investigated. Indeed, pH and salts can play a role in the extraction by modifying the solubility of organic compounds. Only environmental relevant pH and salinity values were tested (Figure 4 and Figure 5). No significant effect of both of these parameters was underlined except for carbamazepine which is far less extracted at low pH. So it seems that these physico-chemical parameters do not interfere with the extraction as long as pH is higher than 6 and salinity less than 35.

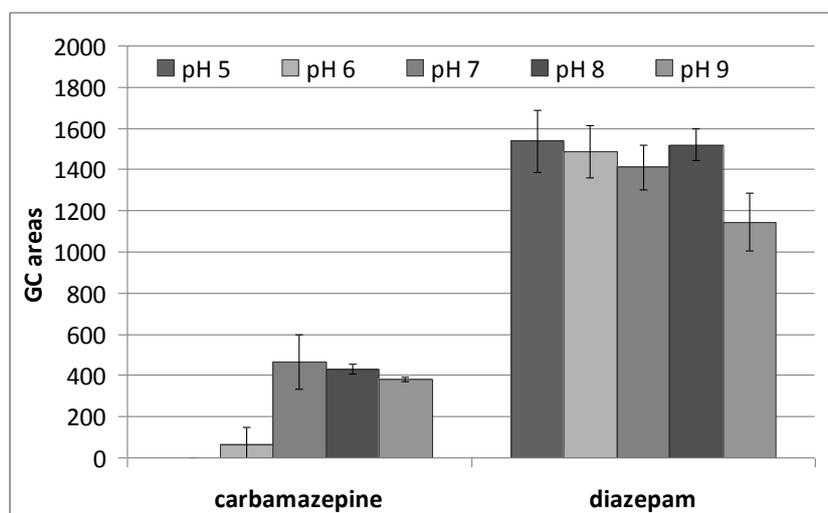


Figure 4. Effect of pH on SPME-GC-MS areas, [pharmaceuticals] = 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, n = 3.

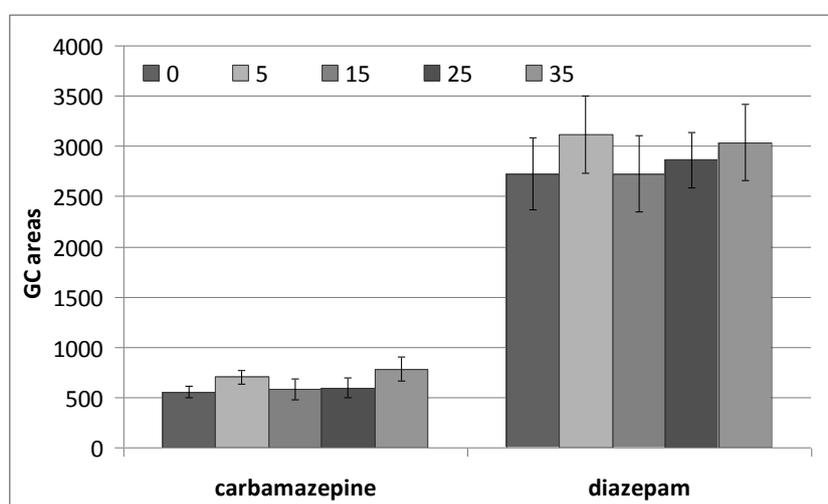


Figure 5. Effect of salinity on SPME-GC-MS areas, [pharmaceuticals] = 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, n = 3.

In order to quantify pharmaceuticals in parallel to quenching experiments, SPE and SPME were used. Actually, SPE was performed to quantify pharmaceuticals in three-dimensional EEM fluorescence quenching experiments whereas SPME was used for two-dimensional quenching experiments. Indeed, once SPME was developed, it was easier to use this technique for experiments with many samples. Two-dimensional quenching experiments provided 21 samples (7 triplicates) for each DOM type and every contaminant, thus the time saving with SPME is considerable. Before this quantification by SPME, it was necessary to confirm the linearity and the accuracy of the tool on the studied range (2-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Unfortunately, CarbowaxTM-DVB fibers could not be used here since they were not produced by the supplier anymore, so a PEG fiber (manufactured in order to replace CarbowaxTM-DVB fibers) was used instead with the same parameters as with the previous fibers. Even though the sensitivity with this fiber was lower for carbamazepine (limits of detection of $0.5 \pm 0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$), it was not a problem as pharmaceutical concentrations were high enough. SPME-GC-MS areas were reported in relation to pharmaceutical concentrations on the range 2-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The

linearity was good for both compounds and slightly better in the range 10-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($R^2 = 0.9963$ and 0.9996 for carbamazepine and diazepam respectively, $n = 4$) than in the range 2-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($R^2 = 0.9948$ and 0.9995 for carbamazepine and diazepam respectively, $n = 5$). This is likely due to the lower concentration at 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ which is too close to the detection limit of carbamazepine. Internal calibration was performed thanks to standards at 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ which allowed the quantification of samples from 10 to 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with an accuracy from 94 to 103% for carbamazepine and from 99 to 108% for diazepam, with variabilities always less than or equal to 10%. However, samples at 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ were highly overestimated and their quantification was thus performed thanks to an internal calibration at 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

III.2. SPE quantification

SPE was performed to confirm pharmaceutical concentrations of spiked waters and to determine whether the presence of DOM distorted the quantification of benzodiazepines. Indeed, many studies have already shown that the presence of DOM could cause an underestimation of the extraction of contaminants by SPE (Li and Lee 2001, Bercaru et al. 2006). DOM could either occupy binding sites of the SPE sorbent or interact with contaminants making them unable to interact with the sorbent (Boti et al. 2007, Ibáñez et al. 1996).

SPE was firstly developed on spiked ultrapure water at 2 and 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of each benzodiazepine. Extraction recoveries range from 94 to 107% and accuracy ranges from 80 to 96%. Repeatability is also very good (variability $< 5\%$, $n = 3$). Once validated, SPE was performed with each DOM and every pharmaceutical at 2 and 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Results show that DOM does not interfere with the extraction since recoveries vary from 75 to 90% and accuracy ranges from 70 to 80% with no difference between samples with DOM and the ones in ultrapure water. This means that either no strong enough interaction occurs between DOM and pharmaceuticals or DOM is too little concentrated to cover bonding sites of the sorbent. Indeed, we worked here with low DOC concentrations (less than 3 mg.L^{-1}) whereas problems of quantification by SPE are observed in other studies at concentrations generally above 10 mg.L^{-1} (Ibáñez et al. 1996, Boti et al. 2007, Bercaru et al. 2006). As regards pharmaceutical concentrations in samples, they are coherent with the theoretical values meaning that no or small amounts of contaminants ($< 20\%$) were lost during the experiments (e.g. by adsorption on glass, degradation or volatilization).

III.3. DOM characterization

Each sample of DOM was characterized by UV-visible absorption spectroscopy and EEM spectrofluorometry (Table 2 and Figure 6). The four samples were chosen for their different origin and composition. Aldrich humic acid is well known to be made up of large humified macromolecules and it was confirmed by both UV-visible absorption and fluorescence measurements. Its HIX (humification index) was high at nearly 29, which is characteristic of very humified terrestrial material with high

molecular weight (Zsolnay et al. 1999, Hur and Kim 2009). This high humification was also confirmed by a high $I\alpha'/I\alpha$ ratio. Indeed this ratio is usually higher for humic acids than for fulvic acids (Sierra et al. 2005). UV-visible absorption spectroscopy also confirmed its high aromatic content (around 60%).

DOM	E_2/E_3	E_4/E_6	% SUVA aromaticity	$I\alpha'/I\alpha$	$I\gamma/I\alpha$	HIX	f_{450}/f_{500}
Aldrich humic acid	2.6	3.3	61	3.6	0.2	28.7	0.7
Sea water	1.3	1.0	43	2.8	1.4	5.7	1.1
Pore water	3.1	2.1	13	2.6	2.8	2.7	1.2
River water	5.6	15.6	25	2.4	0.3	15.3	1.2

Table 2. Absorption and fluorescence parameters of DOM. E_2/E_3 was the absorbance at 254 nm over the absorbance at 365 nm, E_4/E_6 was the absorbance at 465 nm over the absorbance at 665 nm, % SUVA aromaticity was the product of $6.5 \times SUVA + 3.6$ with $SUVA (L \cdot mg^{-1} \cdot M^{-1}) = \text{absorbance at } 254 \text{ nm} / \text{quartz cell path length (cm)} / \text{DOC (mg} \cdot L^{-1}) \times 100 \text{ cm} \cdot M^{-1}$ (Potter and Wimsatt 2005), HIX was the humification index (Zsolnay et al. 1999), f_{450}/f_{500} was the fluorescence intensity at 450 nm over 500 nm with an excitation wavelength at 370 nm (McKnight et al. 2001).

This DOM type (Aldrich humic acid) is very different from the three other samples and its absorption and fluorescence characteristics show a more terrestrial origin than the bulk natural DOM samples of this study. The river DOM is characterized by a HIX value around 15, likely meaning an allochthonous origin (Huguet et al. 2009) and an aromatic content around 25%. According to E_2/E_3 (5.6) and E_4/E_6 (15.6) values, this sample is mainly composed of fulvic acids ($E_2/E_3 > 3.5$ and E_4/E_6 between 6 and 18.5 for fulvic acids, Minero et al. 2007, You et al. 1999).

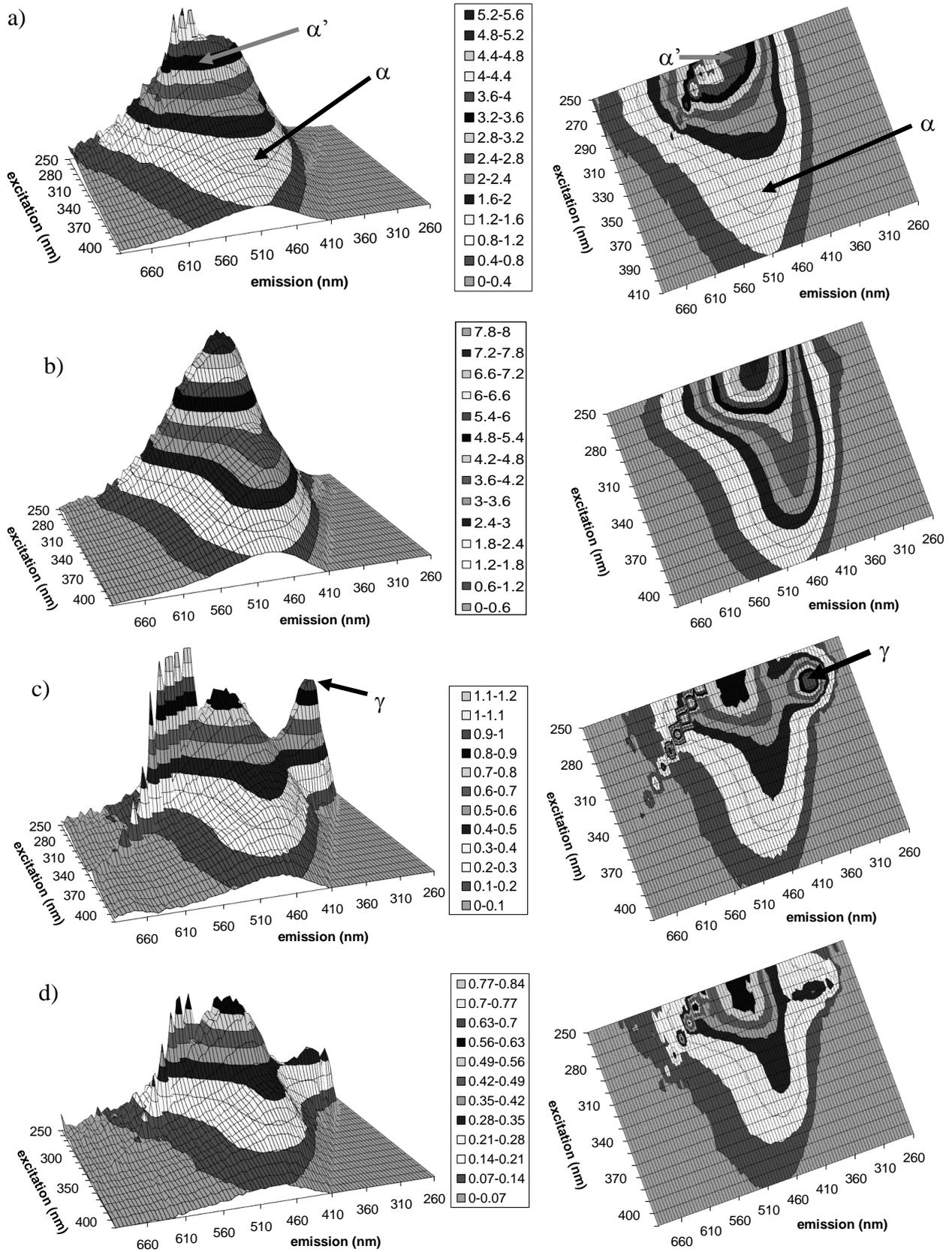


Figure 6. EEM fluorescence spectra of a) Aldrich humic acid, b) river water, c) pore water and d) sea water.

The two other natural samples have a more marine origin as shown by the presence of a γ peak in the fluorescence spectra (Figure 6). This γ peak is characteristic of recent autochthonous DOM made up of protein-derived compounds generally coming from algal or bacterial production (Parlanti et al. 2000, Determann et al. 1998). For the marine sample from the Mediterranean Sea, it can easily be supposed that the γ peak has an algal origin since only surface water has been sampled and bacterial production of DOM is dominant in deeper and more turbid waters. On the contrary, for the pore water, the γ peak can have several origins (bacterial, algal, vegetal or benthic origin). Except for the presence of a γ peak, the seawater sample does not have expected marine water characteristics (low aromaticity and HIX, high E_4/E_6 and E_2/E_3). In fact, it is not surprising because this sample was conserved for a long time after concentration (three years) before these experiments and has been humified as confirmed by spectroscopic properties change. Although this sample is unrepresentative of marine water, its spectrum remains interesting because of its properties of humified marine DOM. Finally, the pore water exhibits less aromatic character (less than 15%) with the highest contribution of recent DOM (γ band). The size of its macromolecules should also be quite high regarding its E_4/E_6 ratio lower than the ones of the river water and Aldrich humic acid. This could be explained by the origin of DOM since DOM coming from surface layer sediments is expected to contain relatively bigger macromolecules than river and sea water (Lepane et al. 2004).

To sum up, very humified material is represented here by Aldrich humic acid, fulvic acids are represented by the river water, the pore water is characteristic of recent sediment material and the seawater represents aggregated and humified marine DOM without fresh materials.

III.4. Benzodiazepines-DOM interactions

According to Figure 7, SPME measurements do not show any significant interaction between both pharmaceuticals and the DOM samples studied.

In order to confirm these results, fluorescence quenching of DOM by both compounds was also investigated. In this study, we experimentally determined that variabilities on the sample preparation and on spectral acquisitions were altogether 3% for the α and α' bands and 12% for the γ band. Therefore, we considered a fluorescence quenching as significant if the modification of intensity was higher than these values.

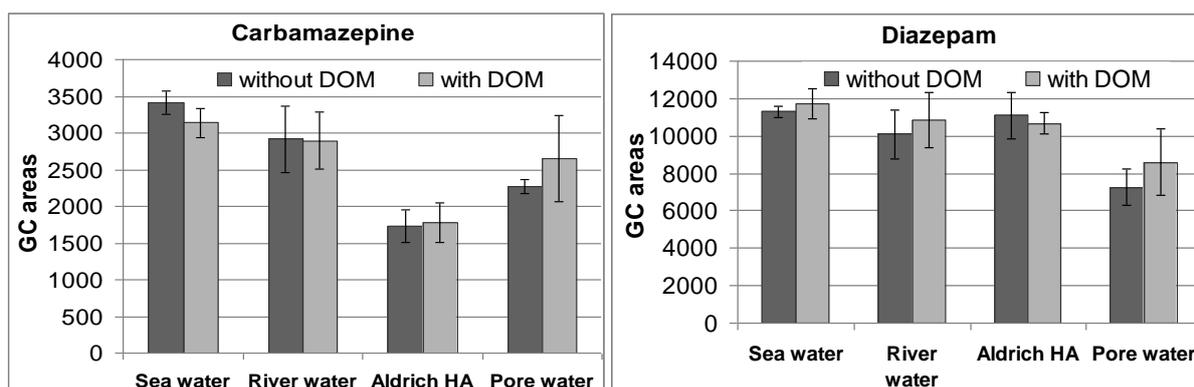


Figure 7. Interactions between pharmaceuticals and DOM measured by SPME-GC-MS, [pharmaceuticals] = 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A decrease of DOM fluorescence was observed with the addition of pharmaceuticals to some samples even though precautions were taken to be sure no inner filter effect occurred. The quenching intensity depends on DOM type, pharmaceuticals and the fluorescence domain observed (Table 3). Indeed, the quenching intensity can be significant for a fluorescence band of DOM and nonexistent for another one, suggesting the occurrence of preferential interactions with some kind of fluorophores. Moreover, contrary to Bai et al. (2008) and like Wang et al. (2006), no wavelength shifts were observed with the addition of benzodiazepines.

	Fluorescence bands	100-(F/(F _{DOM} +F _{drug})) (%)		Log K _{DOC}	
		Carbamazepine	Diazepam	Carbamazepine	Diazepam
Pore water	α'	6	14	5.07 ± 0.01	5.57 ± 0.01
	α	4	6	4.85 ± 0.01	5.08 ± 0.01
	γ	-3	-3	nsi	nsi
Sea water	α'	15	22	5.62 ± 0.01	5.98 ± 0.01
	α	17	25	5.69 ± 0.01	6.01 ± 0.01
	γ	38	23	6.36 ± 0.01	5.98 ± 0.01
River water	α'	1	3	nsi	nsi
	α	0	1	nsi	nsi
Aldrich humic acid	α'	6	50	4.99 ± 0.01	6.43 ± 0.01
	α	2	55	nsi	6.56 ± 0.01

Table 3. Percentage of fluorescence quenching and log K_{DOC} values calculated thanks to EEM spectra. F is the fluorescence intensity of DOM and pharmaceuticals mixed together, F_{DOM} is the fluorescence of DOM alone, F_{drug} is the fluorescence of pharmaceuticals alone, pharmaceutical concentrations were of 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_{DOC} are expressed in $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$, nsi means no significant interaction.

To determine the nature of the quenching (static or dynamic), we first assumed it was due to collisions between DOM and pharmaceuticals (dynamic quenching) according to the Stern-Volmer equation:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (8)$$

(with K_q the quenching rate constant, K_{SV} the dynamic quenching constant, τ_0 the average lifetime of DOM without quencher and $[Q]$ the concentration of quencher.)

In order to compare the Stern-Volmer equation (8) to the equation describing the static quenching, the approximate equation (4) was considered. This equation (4) and the equation 7 give similar results for fluorescence quenching with a systematic error when using equation 4 less than 5% (except for the γ band of the sea water with diazepam which reaches 50% and is not considered here), so equations (8) and (4) can be compared to determine K_q . Average lifetimes of DOM could not be measured in this study, but if we consider τ_0 to be in the range 0.1-10 ns (extreme values found in the literature for DOM (Boyle et al. 2009, Clark et al. 2002)), K_q values range from $7 \cdot 10^{12}$ to $4 \cdot 10^{16}$ L.mol⁻¹.s⁻¹. These values are much greater than 10^{10} L.mol⁻¹.s⁻¹ which is the highest value possible for dynamic quenching (Puchalski et al. 1992, Wang et al. 2006). Consequently, the quenching observed must be of a static nature and caused by the formation of a complex between pharmaceuticals and DOM.

According to Table 3, the addition of one or the other pharmaceutical does not change significantly α and α' band intensities of river water, even with a high concentration of contaminants. For the other samples, these two bands are quenched in the same amount depending on the sample, except for carbamazepine with Aldrich humic acid which is not significantly quenched. As regards the γ peak, for the sea water both contaminants quenched the fluorescence intensity but for the pore water, not only no fluorescence quenching occurs but the fluorescence intensity is enhanced in the presence of pharmaceuticals. Nevertheless, this fluorescence enhancement was not significant. Moreover, in most cases (except for the γ band of sea water with carbamazepine), interactions with diazepam are stronger than with carbamazepine.

As the K_{DOC} values were obtained for only one pharmaceutical concentration (200 $\mu\text{g.L}^{-1}$), the fluorescence quenching was investigated for each fluorophore thanks to two-dimensional spectrofluorometry on a larger range of concentrations (2 - 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$), in order to confirm the previous results and to study the linearity of interactions. These experiments show that fluorescence intensities of α and α' bands vary rather linearly with pharmaceutical concentrations, except for carbamazepine with Aldrich humic acid (Table 4). For the γ band, no linear relationship could be observed, but it may be due to the variability which is higher. Therefore, it is difficult to determine if interactions really occur between pharmaceuticals and the γ band of DOM. However, even though the low linear correlation for diazepam and pore water, the fluorescence enhancement of the γ band was also observed, such as it was in EEM spectrofluorometry. Thus, it might reflect a real tendency for this sample. An enhancement of the fluorescence of DOM after addition of some organic compound has already been observed (Boullemant et al. 2007). This might be explained by a change of DOM conformation caused by the association with organic contaminant. This modification of conformation could obscure the fluorescence of some functional groups or release some fluorophores and could explain why some

fluorescence bands of DOM are quenched while others are enhanced; both cases indicating the occurrence of interactions.

	Fluorescence bands	Carbamazepine		Diazepam	
		Log K_{DOC} (n)	R^2	Log K_{DOC} (n)	R^2
Pore water	α'	5.3 ± 0.1 (8)	0.75	5.5 ± 0.1 (7)	0.96
	α	5.2 ± 0.1 (8)	0.63	5.1 ± 0.1 (7)	0.79
	γ	5.5 ± 0.1 (8)	0.21	4.6 ± 0.6 (8)	0.39
Sea water	α'	5.5 ± 0.1 (8)	0.66	5.5 ± 0.1 (8)	0.82
	α	5.2 ± 0.1 (8)	0.76	5.4 ± 0.1 (8)	0.98
	γ	5.7 ± 0.2 (8)	0.08	5.8 ± 0.3 (7)	0.02
Aldrich humic acid	α'	5.3 ± 0.2 (6)	0.09	6.0 ± 0.1 (6)	0.87
	α	5.1 ± 0.2 (6)	0.26	6.0 ± 0.1 (6)	0.79

Table 4. Log K_{DOC} values obtained by fluorescence quenching with variation of pharmaceutical concentrations, K_{DOC} values are expressed in $L.mol^{-1}$, n is the number of experimental points, italicized values represent fluorescence intensity enhancements.

The results obtained by two-dimensional spectrofluorometry confirm the ones previously obtained by EEM spectrofluorometry: the marine water has usually stronger interactions with pharmaceuticals than the pore water but Aldrich humic acid is more strongly associated with diazepam, unlike carbamazepine. Moreover, diazepam was also shown to interact stronger than carbamazepine with better correlation coefficients. However, for the sample of Aldrich humic acid with carbamazepine, while no or only low interaction was observed in EEM spectroscopy at $200 \mu g.L^{-1}$ of contaminant, strong interaction was shown to occur at $500 \mu g.L^{-1}$ in the two dimensional fluorescence studies for both α and α' bands. If we consider this point to calculate the K_{DOC} values, they were much higher: 6.5 ± 0.1 ($R^2 = 0.88$) for both α and α' bands. As a result, it seems that a high minimal concentration of carbamazepine is needed so that the fluorescence quenching of Aldrich humic acid can be observed.

Even though both these pharmaceuticals are benzodiazepines, they have different physical and chemical properties. Both these pharmaceuticals have a polar amide functional group and a hydrophobic moiety. As regards their spatial configuration, carbamazepine has a lower molecular volume due to a lower molecular weight but also to a conjugation of its flat aromatic rings. Diazepam, which also has aromatic rings but not conjugated ones, does not have a flat configuration and possesses a chlorine atom. From a chemical point of view, diazepam is more hydrophobic but its dipolar moment is higher (Table 5). Therefore, it could be supposed that diazepam can have stronger interactions than carbamazepine thanks to hydrophobic interactions with hydrophobic moieties of DOM and/or to dipole - dipole interactions with polar groups of DOM. Moreover, the aromaticity of carbamazepine did not improve its interactions with DOM in comparison with diazepam so it can be

supposed that hydrophobic interactions are not specific and not driven by aromaticity. Maskaoui et al. (2007) found a relationship between K_{DOC} values and hydrophobicity and the size of pharmaceuticals which is mostly confirmed in this study, even though only two compounds were investigated.

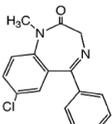
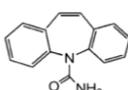
Compounds	Formula	Molar weight ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	pKa (at 20 °C)	Dipolar moment (D)	Aqueous solubility ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Log K_{ow}
Diazepam		284.7	3.3	3.26	50	2.99
Carbamazepine		236.3	< 1-13.9	1.67	17.7	2.45

Table 5. Physico-chemical properties of pharmaceuticals (Luo et al. 1998, Machatha and Yalkowsky 2004, Li et al. 2005, Sila-On et al. 2008, Comerton et al. 2007, Cleuvers 2003, Löffler et al. 2005).

As regards DOM composition, fulvic acids do not seem to interact with benzodiazepines since the river water does not interact significantly with none of the pharmaceuticals. On the contrary, other DOM samples have interactions with the pharmaceuticals and are made up mainly of humic acids (as shown by their $E_2/E_3 < 3.5$). These results agree with Bai et al. (2008) who have calculated lower log K_{DOC} values for carbamazepine with fulvic acids (4.43 ± 0.04) than with humic acids (4.82 ± 0.06) for the α' band with EEM spectrofluorometry. Moreover, for these three samples, if we look at α and α' bands, interactions of diazepam increase with the aromaticity content and the humification index of DOM. This could confirm the hydrophobic nature of these interactions. However, for carbamazepine, which does not interact, at least for concentration less than $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, with the most aromatic DOM (Aldrich humic acid), interactions increase when E_2/E_3 and E_4/E_6 ratios decrease. It confirms that the aromatic rings of carbamazepine, at low concentrations, are not specifically associated with aromatic moieties of DOM and it could imply that its interactions are stronger with larger macromolecules.

Bai et al. (2008) have suggested that interactions between DOM and carbamazepine are due to its hydrophobic moiety and its urea moiety. Our results seem to show that interactions of carbamazepine are not driven by hydrophobicity or polarity of DOM since protein-like macromolecules (fluorophores of the γ band of pore water for example) and DOM with high aromatic content (Aldrich humic acid) do not provide stronger interactions: these interactions seem to be only related to the size of macromolecules.

Very few articles have dealt with interactions between benzodiazepines and DOM studied by fluorescence quenching. To our knowledge, only Bai et al. (2008) have got interested in interactions between carbamazepine and humic substances with this technique. For the other benzodiazepine - DOM interaction studies found in the literature, the comparison is more difficult since DOM characterization is not performed by EEM spectrofluorometry so K_{DOC} values are not expressed in the same unit.

IV. Conclusion

Weak interactions between benzodiazepines and natural DOM have been underlined thanks to fluorescence quenching. These interactions have strengths depending on pharmaceuticals, DOM origin and fluorescence bands. The strongest interactions occur with DOM mainly constituted of humic acids and diazepam was shown to interact stronger than carbamazepine with every type of DOM studied. Moreover, these interactions do not seem to be correlated with the aromaticity content of DOM but to depend on hydrophobicity (especially for diazepam) and the size of macromolecules (especially for carbamazepine).

To improve our knowledge about the nature of these interactions, it would be interesting to study them with fractionated DOM. Indeed, an appropriate fractionation of DOM (by size, by hydrophobicity, by polarity...) would allow to achieve a better understanding of the driving forces of its interactions with pharmaceuticals. Moreover, it would be possible to study interactions of fractions which are minor in natural samples but which could have interactions with pharmaceuticals.

Regarding SPME-GC-MS, although it has not highlighted the weak interactions that occur between benzodiazepines and natural DOM, it remains a technique of choice for rapid, sensitive and reliable analyses of pharmaceuticals in complex environmental samples.

Last but not least, even though observed interactions with DOM were weak, DOM content of natural waters should not be neglected when considering the fate of pharmaceuticals in aquatic environments. Indeed, interactions were observed in this study at low concentrations of DOC and relatively environmentally representative concentrations of pharmaceuticals. Consequently, concentrations of free pharmaceuticals could be significantly diminished especially in natural waters with a high content of DOM.

Acknowledgements

"Region Aquitaine", FEDER, ORQUE program (CPER) and INSU (IMOTOX project) are acknowledged for financial support, the French Ministry of Research for the PhD grant of C. de Perre.

Literature

- Bai, Y., Fengchang Wu, Congqiang Liu, Jianyang Guo, Pingqing Fu, Wen Li & Xing, B.** (2008) Interaction between carbamazepine and humic substances: a fluorescence spectroscopy study. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(1), 95-102.
- Bercaru, O., Ulberth, F., Emons, H. & Vandecasteele, C.** (2006) Accurate quantification of PAHs in water in the presence of dissolved humic acids using isotope dilution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **384**(5), 1207-1213.

- Boti, V.I., Sakkas, V.A. & Albanis, T.A.** (2007) Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples: Part II. Solid-phase extraction from environmental natural waters. *Journal of Chromatography A* **1146**(2), 148-156.
- Boullemant, A., Gagné, J., Fortin, C. & Campbell, P.G.C.** (2007) Interactions of hydrophobic metal complexes and their constituents with aquatic humic substances. *Environmental Chemistry* **4**(5), 323-333.
- Boyle, E.S., Guerriero, N., Thiallet, A., Vecchio, R.D. & Blough, N.V.** (2009) Optical Properties of Humic Substances and CDOM: Relation to Structure. *Environmental Science and Technology* **43**(7), 2262-2268.
- Brun, G.L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P. & Lee, H.-B.** (2006) Pharmaceutically active compounds in Atlantic canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**(8), 2163-2176.
- Clark, C.D., Jimenez-Morais, J., Jones, I.I.G., Zanardi-Lamardo, E., Moore, C.A. & Zika, R.G.** (2002) A time-resolved fluorescence study of dissolved organic matter in a riverine to marine transition zone. *Marine Chemistry* **78**(2-3), 121-135.
- Cleuvers, M.** (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* **142**(3), 185-194.
- Comerton, A.M., Andrews, R.C., Bagley, D.M. & Yang, P.** (2007) Membrane adsorption of endocrine disrupting compounds and pharmaceutically active compounds. *Journal of Membrane Science* **303**(1-2), 267.
- De Perre, C., Le Ménach, K., Budzinski, H., Parlanti, E.,** (2009) Development of Solid-Phase Micro Extraction (SPME) and its Application to the Study of Dissolved Organic Matter (DOM) - Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Interactions in Aquatic Environment. *In preparation*
- Determann, S., Lobbes, J.M., Reuter, R. & Rullkotter, J.** (1998) Ultraviolet fluorescence excitation and emission spectroscopy of marine algae and bacteria. *Marine Chemistry* **62**(1-2), 137-156.
- Frigerio, A., Baker, K.M. & Belvedere, G.** (1973) Gas chromatographic degradation of several drugs and their metabolites. *Analytical Chemistry* **45**(11), 1846-1851.
- Gauthier, T.D., Shane, E.C., Guerin, W.F., Seitz, W.R. & Grant, C.L.** (1986) Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology* **20**, 1162-1166.
- Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W. & Steinberg, C.** (1998) Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – a review-. *Chemosphere* **37**(7), 1335-1362.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C. & Jørgensen, S.E.** (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* **36**(2), 357-393.
- Huguet, A.** (2007) Mise au point de procédés membranaires pour l'étude de la matière organique dissoute en milieux côtiers. PhD thesis n°3504: Bordeaux 1 University.

- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.M. & Parlanti, E.** (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* **40**(6), 706-719.
- Hur, J. & Kim, G.** (2009) Comparison of the heterogeneity within bulk sediment humic substances from a stream and reservoir via selected operational descriptors. *Chemosphere* **75**(4), 483-490.
- Ibáñez, M., Picó, Y. & Mañes, J.** (1996) Influence of organic matter and surfactants on solid-phase extraction of diquat, paraquat and difenzoquat from waters. *Journal of Chromatography A* **727**(2), 245-252.
- Khetan, S.K. & Collins, T.J.** (2007) Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chemical Reviews* **107**(6), 2319-2364.
- Lepane, V., Leeben, A. & Malashenko, O.** (2004) Characterization of sediment pore-water dissolved organic matter of lakes by high-performance size exclusion chromatography. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* **66**(2), 185-194.
- Li, N. & Lee, H.K.** (2001) Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water: Negative effect of humic acid. *Journal of Chromatography A* **921**(2), 255-263.
- Li, X.-H., Cheng, X.-L., Zhang, R.-Z. & Yang, X.-D.** (2005) Quantum Chemical Study on Structure-activity Relationship of Several Kinds of Drugs. *Chinese Journal of Structural Chemistry* **24**(5), 513-520.
- Luo, Y., Pan, L. & Pawliszyn, J.** (1998) Determination of five benzodiazepines in aqueous solution and biological fluids using solid-phase microextraction with carbowax/DVB fiber coating. *Journal of Microcolumn Separations* **10**(2), 193-201.
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M. & Ternes, T.A.** (2005) Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environmental Science and Technology* **39**(14), 5209-5218.
- Machatha, S.G. & Yalkowsky, S.H.** (2004) Estimation of the ethanol/water solubility profile from the octanol/water partition coefficient. *International Journal of Pharmaceutics* **286**(1-2), 111-115.
- Maskaoui, K., Hibberd, A. & Zhou, J.L.** (2007) Assessment of the Interaction between Aquatic Colloids and Pharmaceuticals Facilitated by Cross-Flow Ultrafiltration. *Environmental Science and Technology* **41**(23), 8038-8043.
- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T. & Andersen, D.T.** (2001) Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Journal Limnology and Oceanography* **46**(1), 38-48.
- Minero, C., Lauri, V., Falletti, G., Maurino, V., Pelizzetti, E. & Vione, D.** (2007) Spectrophotometric Characterisation of Surface Lakewater Samples: Implications for the Quantification of Nitrate and the Properties of Dissolved Organic Matter. *Annali di Chimica* **97**(10), 1107-1116.
- Moeder, M., Schrader, S., Winkler, M. & Popp, P.** (2000) Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples. *Journal of Chromatography A* **873**(1), 95.

- Nghiem, L.D., Schafer, A.I. & Elimelech, M.** (2006) Role of electrostatic interactions in the retention of pharmaceutically active contaminants by a loose nanofiltration membrane. *Journal of Membrane Science* **286**(1-2), 52-59.
- Nunes, B., Carvalho, F. & Guilhermino, L.** (2005) Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**, 413-419.
- Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T. & Oehlmann, J.** (2005) Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part I. The Antiepileptic Drug Carbamazepine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **49**(3), 353-361.
- Parikh, S.J., Chorover, J. & Burgos, W.D.** (2004) Interaction of phenanthrene and its primary metabolite (1-hydroxy-2-naphthoic acid) with estuarine sediments and humic fractions. *Journal of Contaminant Hydrology* **72**(1-4), 1-22.
- Parlanti, E., Worz, K., Geoffroy, L. & Lamotte, M.** (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* **31**(12), 1765-1781.
- Pascoe, D., Karntanut, W. & Müller, C.T.** (2003) Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* **51**(6), 521-528.
- Perdue, E.M. & Wolfe, N.L.** (1982) Modification of pollutant hydrolysis kinetics in the presence of humic substances. *Environmental Science and Technology* **16**(12), 847-852.
- Poerschmann, J., Zhang, Z., Kopinke, F.D. & Pawliszyn, J.** (1997) Solid Phase Microextraction for Determining the Distribution of Chemicals in Aqueous Matrices. *Analytical Chemistry* **69**(4), 597-600.
- Potter, B.B. & Wimsatt, J.C.** (2005) Method 415.3 - Determination of Total Organic Carbon and Specific UV Absorbance at 254 nm in source water and drinking water; EPA/600/R-05/055. pp. 1-56. National Exposure Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency.
- Puchalski, M.M., Morra, M.J. & Von Wandruszka, R.** (1992) Fluorescence quenching of synthetic organic compounds by humic materials. *Environmental Science and Technology* **26**(9), 1787-1792.
- Quinn, B., Gagné, F. & Blaise, C.** (2008) An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of The Total Environment* **389**(2-3), 306-314.
- Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E. & Soriano-Sierra, E.J.** (2005) Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* **58**(6), 715-733.
- Sila-On, W., Vardhanabhuti, N., Ongpipattanakul, B. & Kulvanich, P.** (2008) Influence of incorporation methods on partitioning behavior of lipophilic drugs into various phases of a parenteral lipid emulsion. *AAPS PharmSciTech.* **9**(2), 684-692.

- Stein, K., Ramil, M., Fink, G., Sander, M. & Ternes, T.A.** (2008) Analysis and Sorption of Psychoactive Drugs onto Sediment. *Environmental Science and Technology* **42**(17), 6415-6423.
- Wang, C., Wu, Q.-H., Wang, Z. & Zhao, J.** (2006) Study of the Interaction of Carbamazepine with Bovine Serum Albumin by Fluorescence Quenching Method. *Analytical Sciences* **22**(3), 435-438.
- You, S-J., Yin, Y.Y., Allen, H.E.** (1999) Partitioning of organic matter in soils: effects of pH and water/soil ratio. *The Science of the Total Environment* **227**, 155-160.
- Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B. & Saccomandi, F.** (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* **38**(1), 45-50.

Chapitre 4 : synthèse des résultats

Cette partie a pour but de reprendre les principaux résultats de ces travaux de thèse développés ou non dans les articles précédents sous forme synthétique.

Cette thèse avait pour objectif de développer des outils analytiques, puis de les appliquer à l'étude des interactions entre les contaminants organiques et la Matière Organique Dissoute (MOD). Les contaminants organiques étudiés ont été les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et les substances pharmaceutiques. Plusieurs MOD ont été utilisées afin d'essayer de comprendre quelles sont les propriétés qui gouvernent les interactions avec les différents contaminants organiques.

La micro-extraction sur phase solide (SPME) a été développée pour l'analyse des HAP en solution aqueuse. Pour être quantitative, celle-ci a été utilisée en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse simple et en tandem (GC-MS et GC-MS/MS). Chacune de ces trois composantes du système (SPME, GC et MS) a donc fait l'objet de développements. Le but dans ces travaux était d'optimiser la technique pour obtenir les meilleures sensibilités, reproductibilités et justesses possibles et qu'elle soit applicable à des échantillons aqueux de diverses origines et compositions.

I. Développement de la SPME-GC-MS et MS/MS pour l'analyse des HAP (publications n°1 et 2)

I.1. Développement de la SPME

Les principaux paramètres développés pour la SPME ont été le choix de la fibre, les températures d'extraction et de désorption ainsi que le temps d'extraction. Trois sortes de fibres ont été testées : Carbowax™-DVB 65 µm, PDMS 100 µm et PDMS-DVB 65 µm. La fibre en PDMS 7 µm avait fait l'objet de tests préliminaires montrant de très faibles sensibilités. En effet, la sensibilité des fibres augmente avec la taille du polymère et l'utilisation de fibres d'épaisseur maximale est donc à privilégier lorsqu'il s'agit d'obtenir de faibles limites de détection. La fibre la plus sensible pour la plupart des HAP s'est avérée être la Carbowax™-DVB 65 µm suivie de la PDMS 100 µm. Ceci s'explique certainement par une forte affinité avec la phase absorbante Carbowax™, ainsi que par les interactions π - π qui peuvent avoir lieu entre les HAP et le DVB et qui occasionnent une adsorption plus efficace sur la fibre. Cependant, le but ici étant d'analyser des échantillons de matrices pouvant être très chargées, la fibre PDMS 100 µm a été choisie pour son polymère absorbant. En effet, il est déconseillé d'utiliser des polymères adsorbants pour l'analyse d'échantillons complexes à cause des phénomènes de compétition qui provoquent des isothermes d'adsorption non linéaires, ce qui complique terriblement la quantification (Lord et Pawliszyn 2000). Les autres paramètres étaient optimaux pour une température d'extraction de 40 °C, une température de désorption de 270 °C et un temps d'extraction de 60 min (publications n°1 et 2).

I.2. Développement de la GC

Les paramètres GC à optimiser sont la température de l'injecteur, qui est également la température de désorption de la fibre, le type d'injecteur et le gradient de température du four. Concernant l'injecteur, des inserts adaptés aux injections liquides ont été utilisés car ils permettent de basculer du mode SPME au mode injection liquide sans changer le système d'injection et donc les conditions GC. Ceci est très utile pour le développement analytique puisque des injections liquides de référence peuvent être faites avant chaque séquence SPME pour vérifier le bon fonctionnement du système GC-MS en termes de sensibilité. D'autre part, dans la mesure du possible, les essais d'optimisation ont été effectués en triplicat et en « croisé », c'est-à-dire en alternant les conditions testées afin de s'affranchir de toute dérive possible du système au cours d'une même séquence SPME. En ce qui concerne la température du four du chromatographe, celle-ci a été optimisée pour permettre la séparation d'un maximum de HAP et notamment des isomères dans un temps relativement court (Figure 24). En effet, la fibre restant dans l'injecteur 30 min après l'extraction pour la désorption et son conditionnement, le temps d'analyse a été optimisé (à environ 20 min) de façon à ce que, en considérant également le temps de redescente en température du four (environ 5 min), le temps total n'excède pas 30 min.

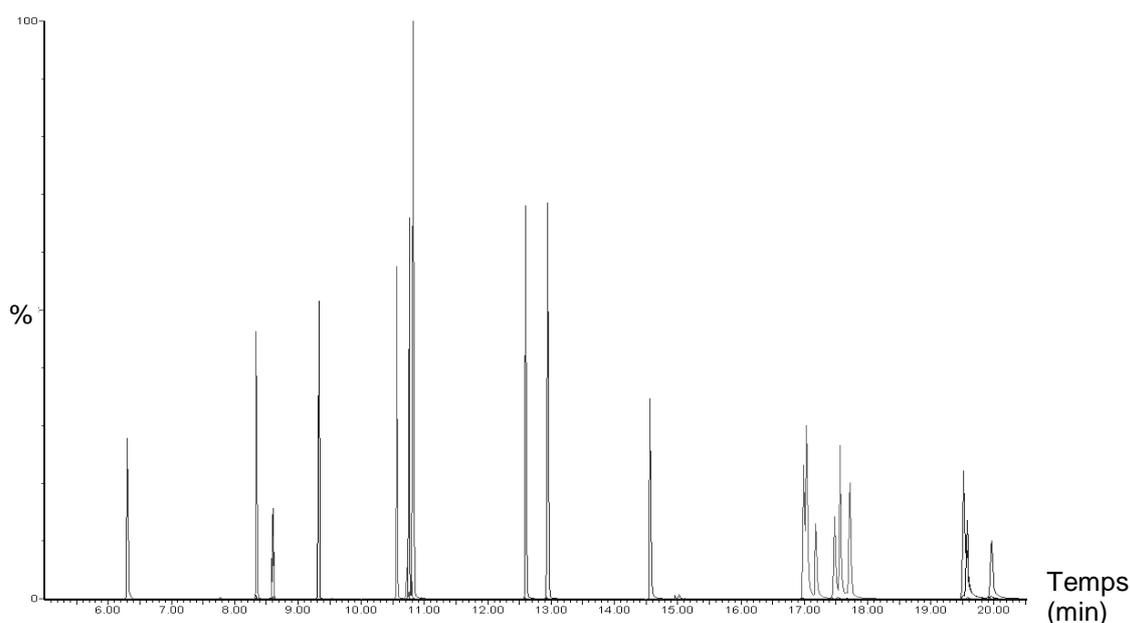


Figure 24. Chromatogramme des HAP séparés et analysés par GC-MS.

I.3. Développement de la MS et MS/MS

Pour le spectromètre de masse, aucun développement n'a été fait en mode MS simple, si ce n'est un ajustement des coupures d'ions afin de permettre un nombre maximal d'acquisitions par pic chromatographique et un temps maximal d'acquisition pour chaque ion. La MS simple a été utilisée en mode SIR (Selected Ion Recording), les ions moléculaires recherchés étant ceux correspondant aux masses moléculaires de chaque HAP. La spectrométrie de masse en tandem a fait l'objet de plus de

développements. Celle-ci a été utilisée en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) avec des transitions ions précurseurs → ions précurseurs et des transitions ions précurseurs → ions fils. En effet, les HAP étant des molécules stables et difficilement fragmentables, les transitions ions précurseurs → ions précurseurs permettent d'éliminer du bruit toutes les molécules qui sont fragmentées (en ions fils) tout en conservant un signal maximal pour les HAP. Les deuxièmes transitions (vers des ions fils différents des ions précurseurs) sont plus spécifiques mais, en raison de la stabilité des HAP, une forte diminution du signal est observée. Afin de déterminer les transitions caractéristiques des HAP, les spectres des ions fragments de chaque ion moléculaire ont été acquis pour des énergies de collision de 5 à 50 eV. Les énergies de collision ont ensuite été affinées à partir d'une sélection de spectres d'ions fragments. Les transitions ont été choisies de façon à maximiser le signal des ions fils tout en ayant une énergie de collision assez élevée pour réduire le bruit de fond grâce à la fragmentation des molécules de mêmes ions précurseurs que les HAP mais qui ne se transforment pas en mêmes ions fils. Ainsi, deux transitions ont été conservées pour la plupart des HAP (annexe 6) : la transition de quantification, qui donne les sensibilités les plus élevées (généralement les transitions ions précurseurs → ions précurseurs), et la transition de confirmation, qui apporte une sélectivité supplémentaire mais qui n'est pas utilisée pour la quantification à cause de la diminution de sensibilité qu'elle implique. Par exemple, le phénanthrène (m/z 178) se fragmente peu et la transition donnant la meilleure sensibilité (transition de quantification, $178 \rightarrow 178$) permet d'éliminer toutes les molécules qui ne donnent pas d'ions fils à m/z 178. D'autre part, une deuxième transition $178 \rightarrow 152$ (transition de confirmation) peut être observée dans le but de vérifier qu'il s'agit bien du phénanthrène.

I.4. Quantification par SPME-GC-MS et MS/MS

Après le développement des méthodes GC-MS et GC-MS/MS grâce à des solutions de référence dans l'isooctane, la SPME a été ajoutée au système afin de valider la technique pour des eaux ultrapures supplémentées en HAP. Les limites de détection ont ainsi pu être calculées ainsi que les rendements d'analyse afin de déterminer la justesse, la variabilité et la reproductibilité de la technique. Dans les conditions optimales déterminées précédemment, avec un système parfaitement propre et une fibre en bon état, les limites de détection peuvent être inférieures à 1 ng.L^{-1} pour tous les HAP, même les plus lourds (publications n°1 et 2). Ces limites sont très intéressantes car les HAP sont présents à l'état de traces (jusqu'à quelques ng.L^{-1}) dans les eaux naturelles, surtout les plus lourds d'entre eux qui sont les moins solubles. Cependant, chaque fibre SPME d'une même sorte et d'un même lot de fabrication n'a pas exactement les mêmes sensibilités et celles-ci varient également avec le nombre d'extractions effectuées. Le système GC-MS évolue également au fur et à mesure des analyses, même si les échantillons ont une matrice faiblement chargée et qu'un contrôle permanent de la machine est effectué. Ces évolutions à la fois de la SPME et de la GC-MS font que les limites de détections ont pu être légèrement supérieures mais celles-ci n'excédaient pas 1 ng.L^{-1} pour les HAP de faibles à moyens poids moléculaires (du naphthalène au chrysène) et n'excédaient pas 5 ng.L^{-1} pour les HAP de hauts poids moléculaires ($\geq 252 \text{ g.mol}^{-1}$).

La quantification a été réalisée par étalonnage interne grâce à l'utilisation de HAP deutérés correspondant aux HAP natifs dans la mesure du possible. Ainsi, seuls le 2,1-benzonaphthothiophène et le benzo[a]fluoranthène ont été quantifiés par rapport au chrysène d12 et au benzo[e]pyrène d12 respectivement. Cet étalonnage a été effectué grâce à des solutions aqueuses de HAP et de HAP deutérés analysées par SPME-GC-MS pour chaque série d'échantillons afin de pouvoir calculer les coefficients de réponses du système pour chaque HAP. Ces coefficients dépendent donc de la machine mais sont généralement compris entre 0,7 et 1 (en injection liquide directe et en SPME), un coefficient de 1 signifiant que le HAP et son deutéré se comportent exactement de la même façon tout au long de l'analyse. Une valeur de 1 n'est cependant jamais atteinte étant donné que la pureté des composés deutérés ne peut pas être de 100 % et qu'une infime partie des étalons internes ajoutés sont en fait des composés natifs (≤ 2 % selon la pureté des composés deutérés). Les coefficients de réponse étaient ici plus faibles avec une moyenne de 0,5 pour tous les HAP. La justesse et la variabilité de la SPME-GC-MS ont été mesurées sur des eaux ultrapures supplémentées en HAP à hauteur d'environ 50 ng.L^{-1} chacun. Les rendements de quantification étaient en moyenne de 88 ± 9 % pour tous les HAP avec des variabilités inférieures à 5 % ($n = 3$). La reproductibilité de la technique a été testée grâce à l'utilisation d'un autre système SPME-GC-MS. Sur celui-ci les rendements de quantification étaient en moyenne de 83 ± 9 % avec là encore des variabilités moyennes inférieures à 5 % et les coefficients de réponse étaient en moyenne autour de 0,6. Les reproductibilités intra- et inter-machine étaient donc très bonnes (Figure 25).

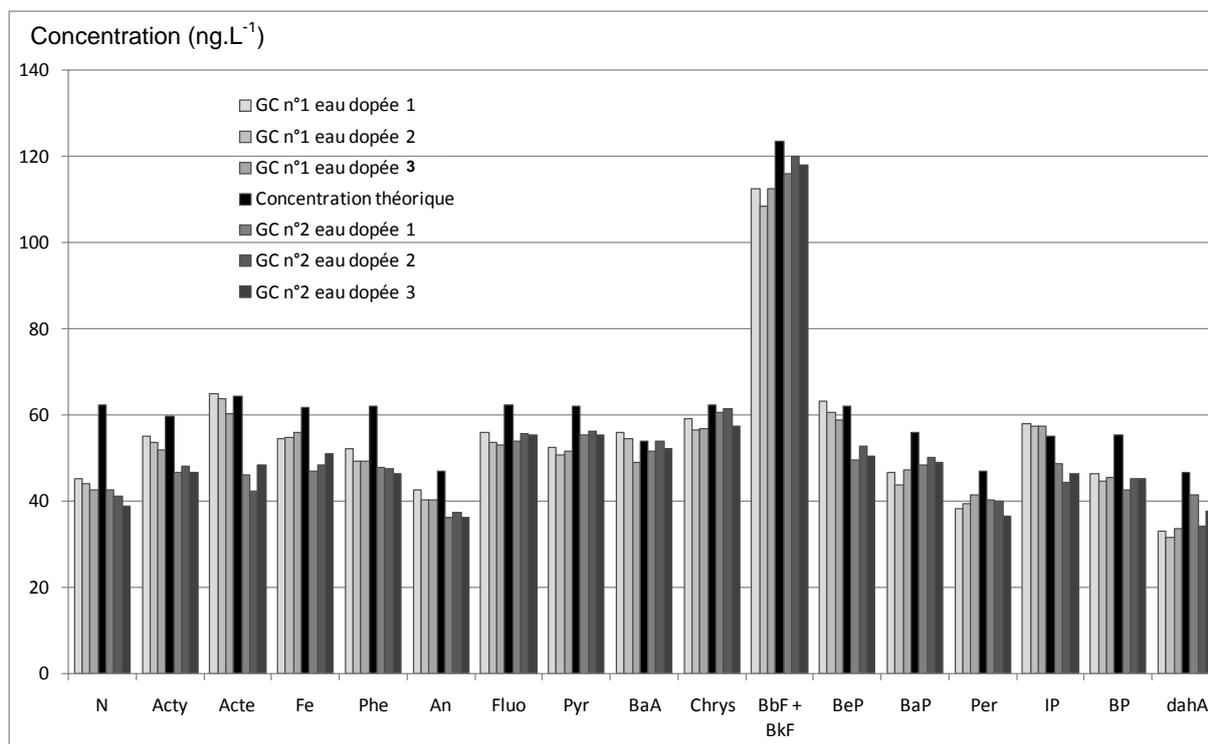


Figure 25. Quantification d'une eau ultrapure supplémentée en HAP par SPME-GC-MS sur deux systèmes différents.

Lorsque l'analyse est effectuée par spectrométrie de masse en tandem, les limites de détections pour de l'eau ultrapure supplémentée en HAP sont supérieures à celles obtenues en mode

SIR et leur variabilité est également plus importante (55 % de variabilité en mode MRM par rapport aux 30 % de variabilité en mode SIR) (Figure 26).

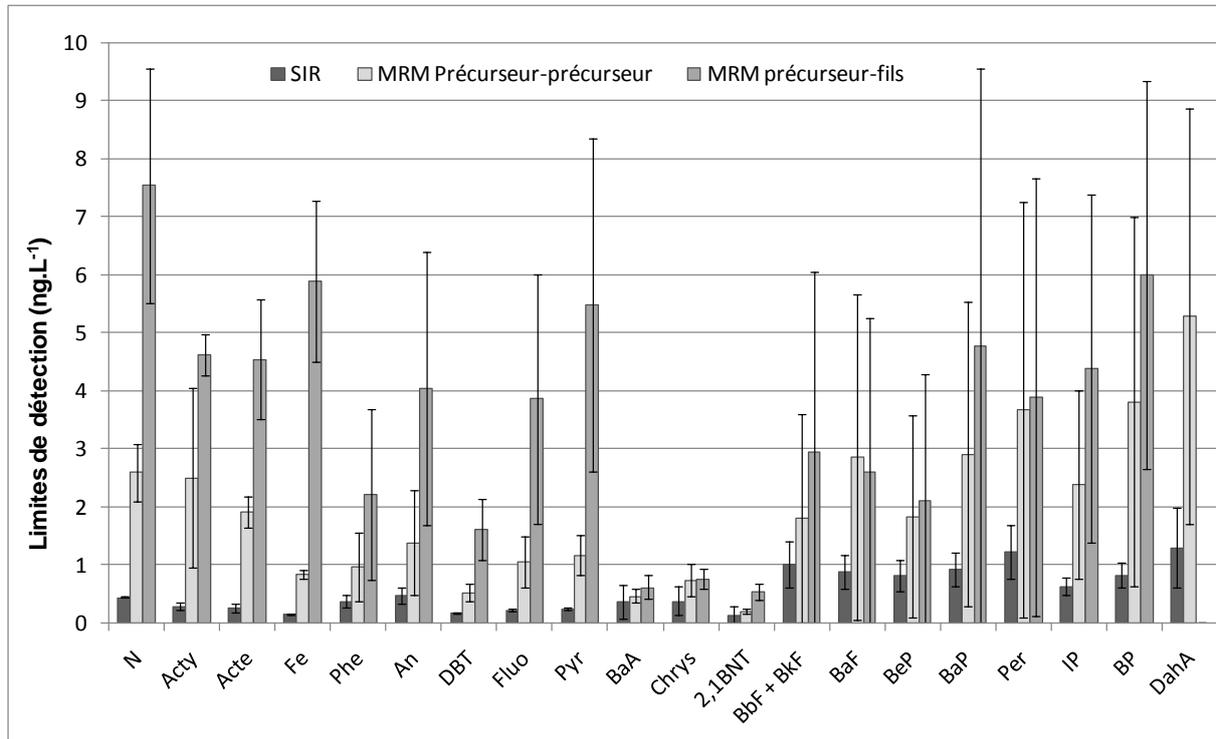


Figure 26. Limites de détection par SPME-GC-MS et SPME-GC-MS/MS.

Même si la sensibilité était moins bonne, la quantification par étalonnage interne de l'eau ultrapure supplémentée s'est tout de même avérée satisfaisante avec des rendements moyens de $84 \pm 12\%$ et une variabilité moyenne inférieure à 10 % avec les transitions ions précurseurs \rightarrow ions précurseurs (publications n°1 et 2). Les autres transitions (ions précurseurs \rightarrow ions fils) n'ont pas permis une bonne quantification et n'ont pu être utilisées ultérieurement que pour des analyses qualitatives.

1.5. Comparaison SPME/LLE/SPE

La SPME a ensuite été comparée à deux autres techniques plus usuelles d'extraction d'échantillons aqueux: l'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction sur phase solide (SPE), elles aussi couplées à la GC-MS. Les résultats ont montré que de façon globale les rendements moyens de quantification étaient équivalents mais légèrement meilleurs par SPME qu'avec les deux autres techniques (publications n°1 et 2). Cependant, si l'on regarde au niveau des composés individuels, la SPME apporte généralement une meilleure quantification des HAP légers (Figure 27). En effet, les multiples étapes des extractions LLE et SPE, et notamment la dernière étape de reconcentration du solvant par évaporation provoque la perte des étalons internes de HAP légers ce qui fausse la quantification et augmente la variabilité. Pour certains HAP lourds, la quantification s'avère également meilleure par SPME.

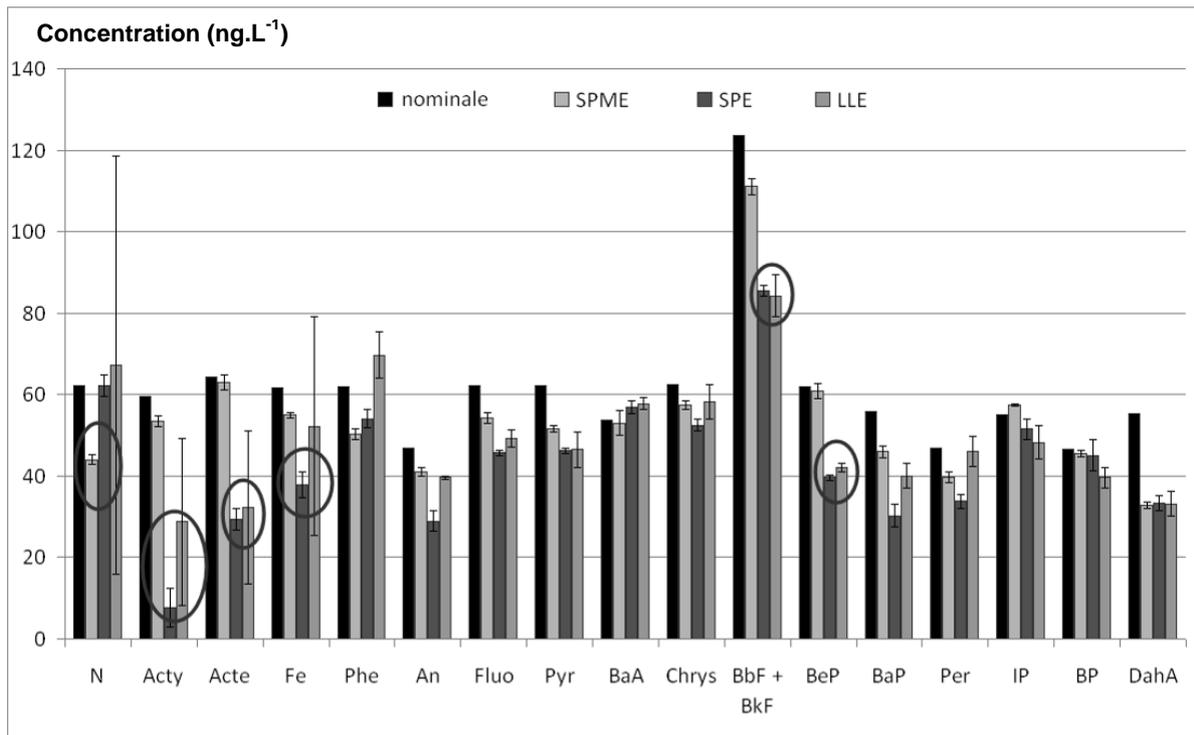


Figure 27. Comparaison des techniques d'extraction SPME, LLE et SPE. Les zones entourées illustrent les différences les plus importantes.

En plus de ses avantages intrinsèques (faibles volumes d'échantillons, pas d'utilisation de solvant, rapidité et automatisation des analyses), la SPME apporte donc également de meilleures quantifications des HAP dans des matrices aqueuses que la SPE et la LLE.

1.6. Application de la SPME-GC-MS et MS/MS à des échantillons environnementaux

L'application environnementale de la SPME a été faite sur des eaux de stations d'épuration ce qui a permis de mettre en évidence l'intérêt de la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse des HAP dans des matrices complexes. En effet, les résultats développés dans les publications n°1 et 2 ont montré que des composés peuvent interférer avec les HAP et empêcher leur quantification en mode SIR alors que le mode MRM (transitions ions précurseurs → ions précurseurs) a permis de lever ces interférences et de quantifier les contaminants. Cependant, il est nécessaire que ces derniers soient en quantité suffisante pour être quantifiés correctement par SPME-GC-MS/MS. D'autre part, les limites de détection pour des échantillons aussi matriciellement chargés que des eaux d'entrées de station d'épuration (entre 5 et 40 ng.L⁻¹ selon les HAP) sont plus élevées que dans l'eau ultrapure (≤ 1 ng.L⁻¹). En effet, la matrice et plus particulièrement le matériel organique peut interagir avec les HAP et les rendre moins disponibles pour la SPME. Or, la quantité de HAP extraite par SPME est proportionnelle à la concentration en HAP libres et celle-ci peut diminuer en présence de matière organique. La fraction libre et disponible pour la SPME étant plus faible pour une même concentration totale en HAP, les limites de détection calculées par rapport à la concentration totale de HAP s'en trouvent alors d'autant plus élevées que les HAP réagissent avec le matériel organique.

Ceci peut donc être un inconvénient majeur pour la quantification des HAP à l'état de traces dans les eaux naturelles mais cela permet à la SPME d'être un outil tout à fait adapté à l'étude de ces interactions entre les contaminants organiques et la matière organique. En effet, la fraction libre des contaminants est proportionnelle à la quantité extraite par SPME et peut donc être quantifiée grâce à un étalonnage externe ; alors que l'ajout d'étalons internes permet de corriger la perte due aux interactions et donc de quantifier la totalité des HAP dissous puisque les composés deutérés se comportent de la même façon vis-à-vis de la matrice que les HAP natifs.

I.7. Développement de la SPME-GC-MS pour l'étude des interactions HAP-MOD

Pour l'étude des interactions HAP-MOD, les paramètres de la SPME ont été légèrement modifiés : le temps d'immersion de la fibre dans l'échantillon a été réduit à 30 min (au lieu de 60 min) dans le but de modifier au minimum l'équilibre HAP-MOD. En effet, plus le temps d'extraction est long, plus la quantité de HAP libres extraite est grande et donc plus l'équilibre entre les HAP libres et associés à la MOD peut être déplacé vers les HAP libres pour compenser la perte causée par l'extraction. Un long temps d'extraction peut donc causer une surestimation de la fraction libre de HAP. D'autre part, un temps d'immersion de 30 min procure des limites de détection satisfaisantes : $< 1 \text{ ng.L}^{-1}$ pour les HAP de faibles poids moléculaires et $< 10 \text{ ng.L}^{-1}$ pour les HAP de hauts poids moléculaires.

La difficulté majeure dans l'application de la SPME-GC-MS à l'étude des interactions contaminants - MOD est l'utilisation de l'étalonnage externe. Alors que l'étalonnage interne a montré de très bonnes reproductibilités, l'étalonnage externe est beaucoup plus variable, et ce pour différentes raisons. D'une part, la variabilité intrinsèque à chaque système (SPME, GC et MS) s'ajoute lors d'une analyse et ne peut dans ce cas être compensée par la comparaison d'aires avec un étalon interne. D'autre part, l'étalonnage externe passe par la réalisation d'une courbe de calibration en début de chaque série avec au minimum trois points chacun effectué en triplicat. Ceci, en plus d'allonger considérablement le temps d'analyse par rapport à l'étalonnage interne, apporte un biais supplémentaire puisqu'il s'est passé au minimum 10h entre le premier étalon et le premier échantillon. Pendant ce temps, le système GC-MS et la fibre SPME ont pu évoluer, ainsi que les échantillons (dégradation, évaporation), et la quantification peut alors être faussée surtout pour les séries les plus longues. En comparant les variabilités des aires obtenues par GC-MS (en injection liquide), puis en couplage avec la SPME et en analysant les concentrations en HAP d'échantillons restés 24h en attente, la variabilité de chaque élément a pu être déterminée (Figure 28). Une variabilité de 10 à 35 % sur une trentaine d'échantillons est ainsi observée sur les aires obtenues par SPME-GC-MS et donc sur les quantifications des HAP par étalonnage externe.

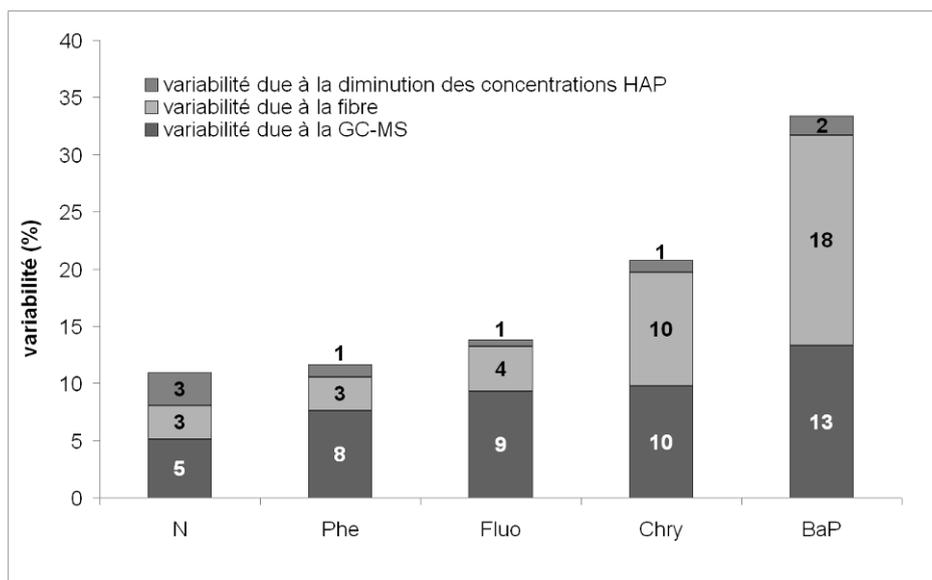


Figure 28. Variabilité de la SPME-GC-MS et contribution de chaque élément.

L'étalonnage externe n'est pas indispensable à la quantification de la fraction libre des contaminants. En effet, comme développé dans la publication n°3, l'étalonnage par rapport à un étalon interne qui n'interagit pas avec la matrice peut être utilisé. Comme le montre la Figure 29, le naphthalène d8 a pu être utilisé puisque les aires obtenues en présence et en absence de MOD sont équivalentes, ce qui dénote que la fraction libre reste identique dans les deux cas et que le naphthalène d8 n'interagit pas avec la MOD.

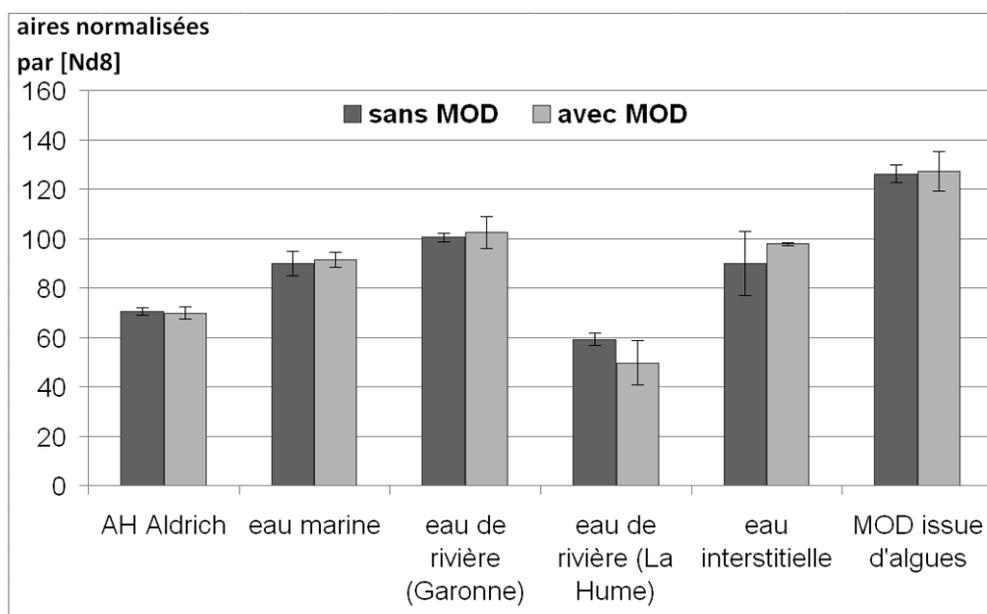


Figure 29. Comparaison des aires obtenues par SPME-GC-MS avec et sans MOD pour le naphthalène d8, après normalisation par la concentration en naphthalène d8.

La comparaison des différents étalonnages sur une eau ultrapure supplémentée en HAP et en HAP deutérés (environ 50 ng.L⁻¹ chacun) est donnée Figure 30. Sur une série de 10 échantillons (15h d'analyse) quantifiés à partir d'un étalon en début de séquence, l'étalonnage externe sous-estime les

concentrations de tous les HAP de 20 à 40 %. D'autre part, si le calcul est effectué à partir de l'étalon précédant chaque échantillon, la sous-estimation est inférieure à 10 % pour tous les HAP. Ceci implique que la mauvaise quantification par étalonnage externe est due à une perte de sensibilité du système SPME-GC-MS au cours de l'analyse. Si les aires sont maintenant corrigées par rapport à la dérive de celles du naphthalène d8, les rendements sont proches de 100 % jusqu'au pyrène et la surestimation est d'environ 20 % au-delà et jusqu'au pérylène et atteint 60 % pour les 3 HAP les plus lourds. Cette surestimation s'explique certainement par le fait que la correction effectuée est d'autant meilleure que le HAP a une structure proche de celle du naphthalène d8 ; les HAP de hauts poids moléculaires ayant un comportement plus éloigné de celui du naphthalène d8 que les HAP de faibles poids moléculaires. La quantification de la fraction associée à la MOD (concentration totale moins la fraction libre) peut donc se faire sans problème jusqu'au pyrène et sera sous-estimée pour les HAP de plus hauts poids moléculaires. Cependant, même s'il faut prendre en compte cette surestimation, celle-ci peut être négligeable dans certaines conditions. En effet, si l'on considère les interactions entre le BaP et l'acide humique Aldrich par exemple, la fraction libre représente moins de 20 % de la totalité du BaP présent en solution. Une surestimation de cette valeur de 20 % provoque alors une sous-estimation de la fraction associée à la MOD inférieure à 5 % ($100 - 24 = 76$ % (valeur calculée) au lieu de $100 - 20 = 80$ % (valeur théorique)). De la même façon, l'erreur de 60 % sur la mesure du DahA libre provoque une erreur sur la fraction associée à la MOD inférieure à 1 % car ce dernier a de très fortes interactions avec la MOD. Finalement, l'erreur sur la mesure la plus problématique est située sur les HAP de faibles poids moléculaires qui interagissent peu avec la MOD. Par exemple, la quantification d'un HAP dont 90 % seraient sous forme libre, surestimée de 5 %, provoquerait une sous-estimation de la fraction associée à la MOD de 45 % ($100 - 94,5 = 5,5$ % (calculée) au lieu de $100 - 90 = 10$ % (théorique)). Il faut donc prendre en considération l'erreur potentielle sur la mesure sachant que celle-ci est minimisée au maximum grâce à l'étalonnage par rapport au naphthalène d8 pour la fraction libre, notamment pour les HAP de plus faibles poids moléculaires.

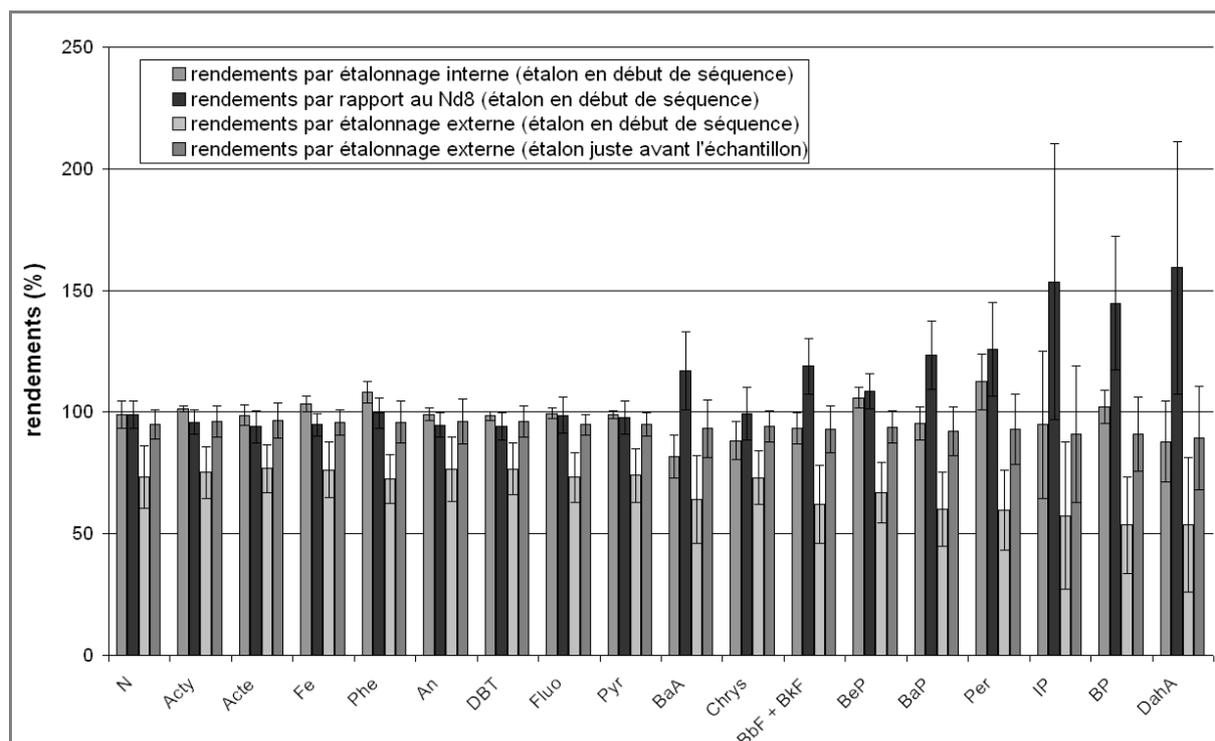


Figure 30. Comparaison de la quantification par SPME-GC-MS par les différents étalonnages (n=10).

II. Étude des interactions HAP – acide humique Aldrich (publication n°3)

II.1. Interactions HAP – acide humique Aldrich étudiées par SPME-GC-MS

Les interactions ont été étudiées dans un premier temps entre 4 HAP (phénanthrène, fluoranthène, chrysène, benzo[a]pyrène), puis 19 HAP, et l'acide humique Aldrich en phase aqueuse par SPME-GC-MS. Les résultats obtenus par ajout croissant de MOD pour une même concentration en HAP ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) sont donnés dans la Figure 31. Il apparaît que les pentes (et donc les K_{DOC}) des droites qui passent au mieux par les points sont d'autant plus grandes que le HAP est de haut poids moléculaire et hydrophobe et que le nombre et la quantité de HAP dans l'échantillon sont faibles. En effet, pour les composés pris individuellement ou en présence des 3 autres HAP, les K_{DOC} sont plus forts qu'en présence de 19 HAP à $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ chacun. Ceci implique des phénomènes de compétition entre les HAP vis-à-vis de la MOD et l'existence de sites spécifiques sur cette dernière s'associant plus fortement à certains HAP que d'autres. Cette hypothèse a été vérifiée grâce à l'étude des interactions lors d'un ajout croissant de HAP pour une même quantité de MOD avec d'une part un mélange équimassique de 19 HAP et d'autre part un mélange des 19 mêmes HAP avec des concentrations en HAP de faibles poids moléculaires plus importantes, pour mimer les proportions retrouvées dans le milieu naturel (Figure 32).

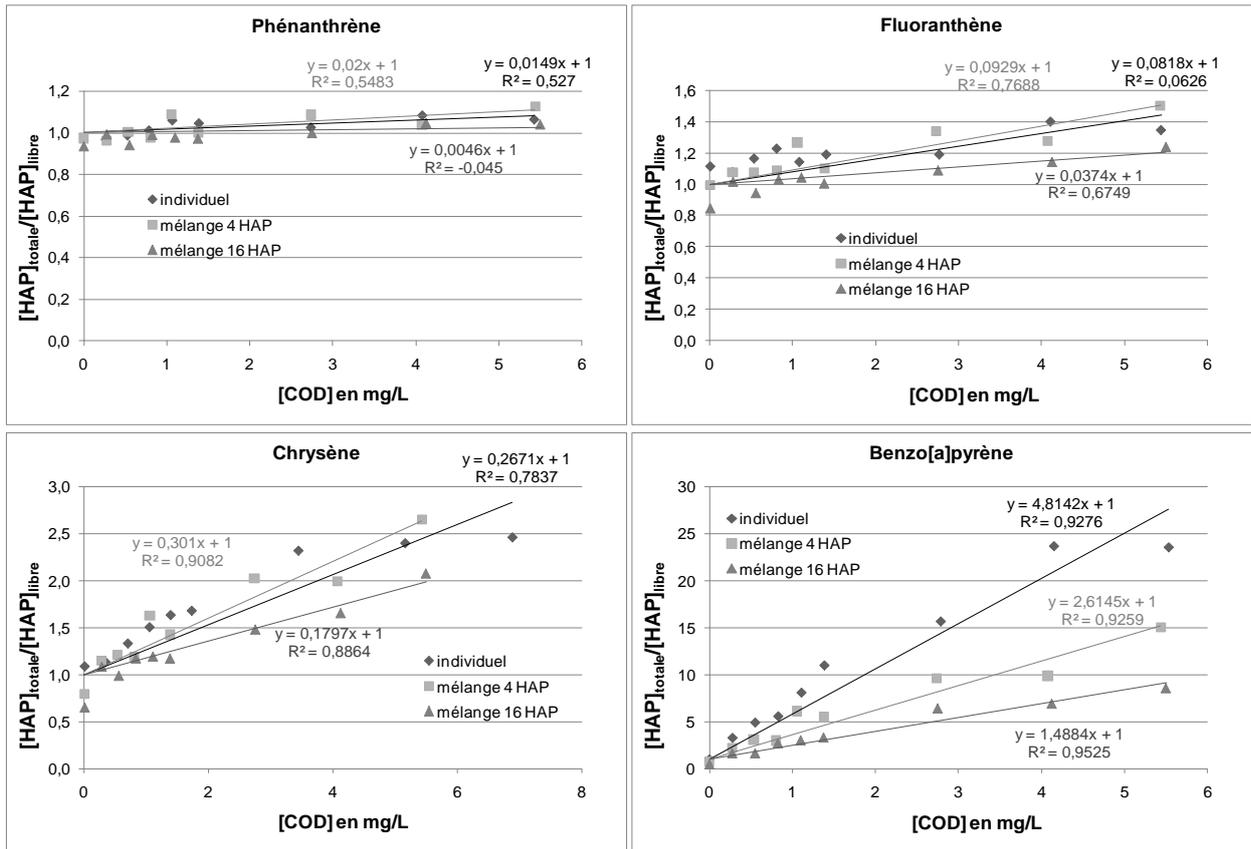


Figure 31. Représentation de Stern-Volmer des interactions HAP - acide humique Aldrich.

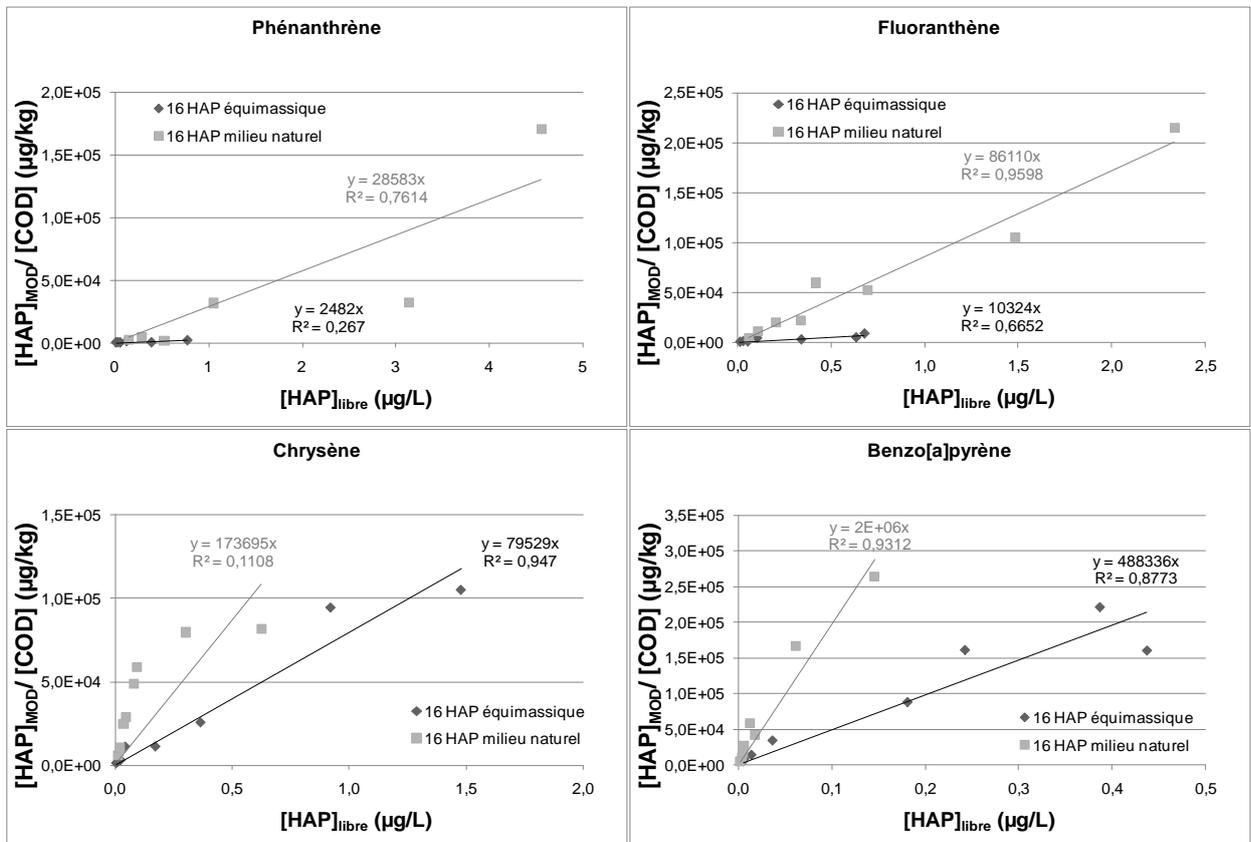


Figure 32. Isothermes d'association des HAP avec la MOD dans 2 mélanges de 19 HAP : ■ avec chaque HAP en concentration équivalente, ♦ avec des concentrations plus abondantes en HAP de faibles poids moléculaires par rapport aux HAP de hauts poids moléculaires, dans le but de mimer un environnement aqueux naturel.

Pour les 4 HAP, les K_{DOC} sont plus grands lorsque les HAP légers sont majoritaires dans le mélange. Ceci pourrait signifier que les HAP lourds ont des interactions plus fortes et plus spécifiques avec la MOD et que les HAP légers ne pourraient occuper ces sites qu'en leur absence. Ainsi dans le mélange où les HAP lourds sont minoritaires, les 4 HAP pourraient occuper plus de sites sur la MOD et des sites avec potentiellement des énergies plus fortes donnant alors des valeurs de K_{DOC} plus élevées. D'autre part, les courbes qui modélisent au mieux les points dans ces deux figures ne semblent pas être des droites (voir publication n°3), ce qui irait également dans le sens de la non-linéarité des interactions.

En considérant l'impact de la présence des autres HAP sur les interactions avec la MOD, les expériences par SPME-GC-MS qui suivent ont été réalisées en essayant de garder des concentrations en HAP deutérés constantes et les plus faibles possibles.

II.2. Interactions HAP – acide humique Aldrich étudiées par extinction de fluorescence

La spectrofluorimétrie a également été utilisée pour quantifier les interactions grâce à l'extinction de fluorescence des HAP observée lors d'ajout croissant de MOD. Cette technique a également permis la mesure de la cinétique des interactions. La Figure 33 montre que les interactions atteignent l'équilibre après quelques heures aussi bien pour les composés lourds que les légers. C'est pourquoi tous les échantillons ont été fabriqués la veille de leur analyse.

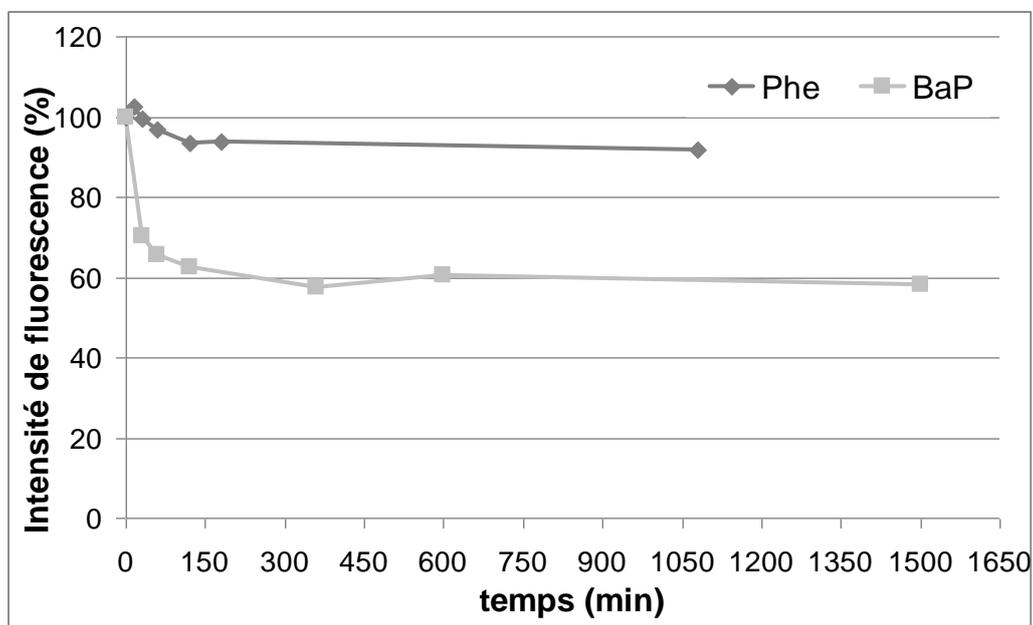


Figure 33. Suivi de la cinétique des interactions par extinction de fluorescence. L'intensité est exprimée en pourcentage par rapport au T_0 . Pour la cinétique du phénanthrène : $[Phe] = 2 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $[COD] = 1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, pour la cinétique du benzo[a]pyrène : $[BaP] = 1 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $[COD] = 0,8 \text{ mg.L}^{-1}$.

Comme le montrent les résultats développés dans la publication n°3, les K_{DOC} obtenus par extinction de fluorescence sont supérieurs à ceux obtenus par SPME. La différence expérimentale fondamentale entre les deux techniques réside dans la température de l'échantillon. En effet, lors des expériences par spectrofluorimétrie, l'échantillon est thermostaté à 20 °C alors que par SPME l'échantillon est thermostaté à 40 °C. Pour des raisons techniques, il n'a pas été possible d'augmenter la température du spectrofluorimètre ni de descendre la température de la SPME en dessous de 30 °C. Cependant, les K_{DOC} ont été mesurés par SPME à 30 °C pour estimer l'influence de la température sur les interactions.

II.3. Effet de la température sur les interactions

La Figure 34 montre que la température a un effet important sur les K_{DOC} qui sont en moyenne le double à 30 °C par rapport à 40 °C.

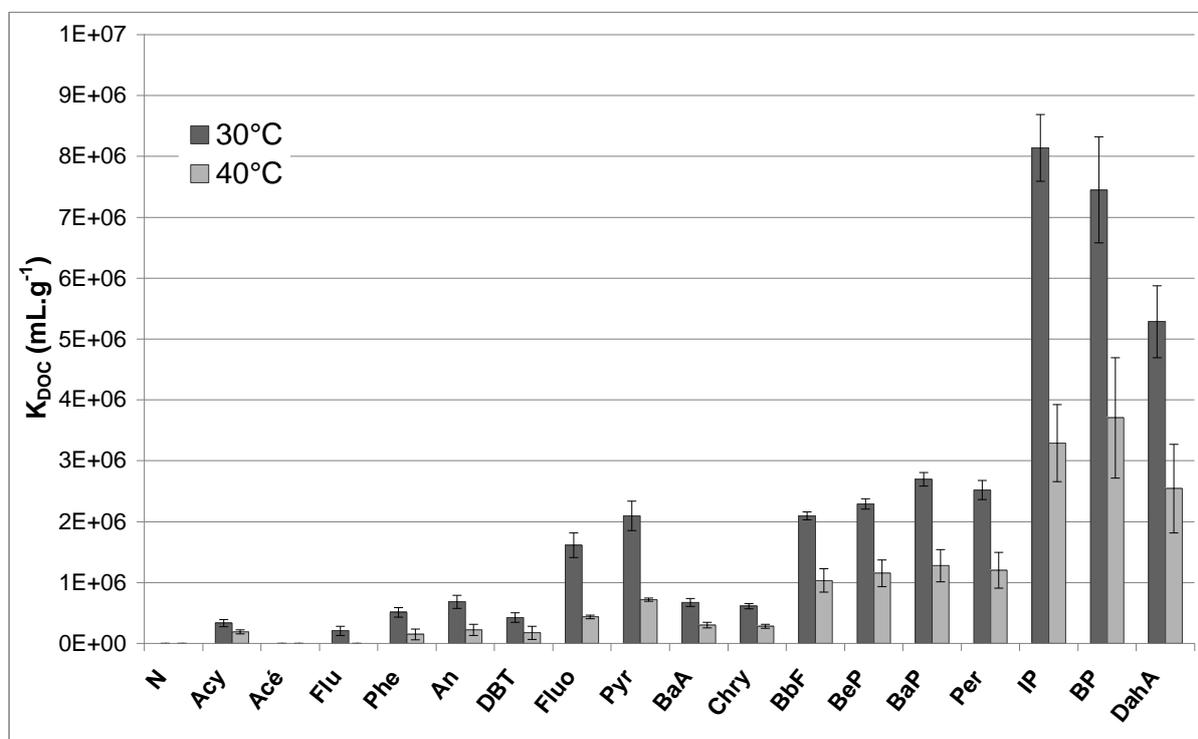


Figure 34. Effet de la température d'extraction sur les K_{DOC} mesurés par SPME-GC-MS. Les K_{DOC} du naphthalène au pyrène ont été multipliés par 10 pour une meilleure visibilité.

Grâce à la relation de Van't Hoff (4.1), ces expériences peuvent permettre de déterminer les enthalpies standards de réaction (Δ_rH°) caractéristiques des interactions.

$$\Delta_rH^\circ = -R \frac{\ln(K_2 / K_1)}{1/T_2 - 1/T_1} \quad (4.1)$$

(avec K_1 et K_2 les constantes d'équilibre aux températures T_1 et T_2 respectivement).

Les valeurs de ΔrH° pour tous les HAP varient de -45 à -120 kJ.mol^{-1} avec une moyenne de -73 kJ.mol^{-1} . Cette variation d'enthalpie standard avec la température est supposée être du même ordre de grandeur mais de sens opposé que la variation d'enthalpie due à la variation de la solubilité aqueuse des HAP (Schwartzbach et al. 1993). En effet, la diminution des interactions avec l'augmentation de la température serait directement liée à l'augmentation de la solubilité des contaminants dans l'eau. Quelques articles ont montré que ΔrH° varie environ de -20 à -40 kJ.mol^{-1} et que l'enthalpie due à la solubilité des HAP dans l'eau est en moyenne de 38 kJ.mol^{-1} (He et al. 1995, Lüers et ten Hulscher 1996). Nos valeurs sont supérieures en valeur absolue d'environ un facteur 2. Ceci est peut-être dû à l'utilisation de l'acide humique Aldrich qui pourrait avoir des propriétés différentes des autres MOD étudiées dans la littérature (matières organiques issues de sols, de lave et de sédiments pour les travaux cités précédemment). Il serait imprudent d'extrapoler les valeurs de K_{DOC} à 20°C pour les comparer à celles obtenues par extinction de fluorescence mais il est tout de même certain qu'une température plus élevée en SPME provoque une diminution des K_{DOC} . Celle-ci pourrait donc être responsable des différences entre les deux techniques. D'autre part, la présence d'étalons internes en SPME peut également entraîner une diminution des K_{DOC} par rapport à la technique de l'extinction de fluorescence pour laquelle ils ne sont pas présents. En effet, des effets de compétition avec les HAP ont pu être induits lors de l'ajout des HAP deutérés diminuant ainsi les valeurs des K_{DOC} des HAP natifs lors de l'analyse par SPME-GC-MS.

Nous avons également essayé de développer une troisième technique d'analyse des interactions : la dialyse.

II.4. Interactions HAP – acide humique Aldrich étudiées par dialyse

Cette technique aurait pu permettre d'effectuer des mesures de K_{DOC} à 20°C et à 40°C et de les comparer aux valeurs obtenues avec les deux autres techniques. Cependant, des tests préliminaires effectués dans le but de déterminer le temps nécessaire aux HAP pour atteindre l'équilibre en concentrations des deux côtés de la membrane ont montré une adsorption sur cette membrane supérieure à 90 % pour les HAP les plus lourds. Des membranes de seuil de coupure plus élevé (1000 Da au lieu de 500 Da) ont été testées mais n'ont pas permis l'amélioration des rendements ; cette technique n'a donc pas pu être appliquée à l'étude des interactions HAP-MOD.

III. Effets des paramètres environnementaux sur les interactions HAP – MOD (publication n°4)

Les paramètres environnementaux ayant des effets sur les interactions ont été recherchés au moyen de plans d'expériences pour différentes sortes de MOD. Quatre paramètres ont été étudiés – le pH, la salinité, les concentrations en COD et en HAP – pour trois MOD d'origine différente – l'acide humique Aldrich (AHA), une eau de rivière (RW) et de la MOD issue de culture d'algues (AC). Les résultats sont rassemblés dans la publication n°4. Ces 3 types de MOD ont été sélectionnés pour

leurs propriétés de fluorescence différentes et très typiques de matériel humique fortement humifié (AHA), d'eau naturelle composée majoritairement d'acides fulviques et d'une faible composante de macromolécules de type protéines (RW) ainsi que de matériel organique frais d'origine algale (AC). Les bandes de fluorescence caractéristiques de ces 3 MOD ont des positions et des valeurs maximales d'intensité qui diffèrent fortement (Figure 35).

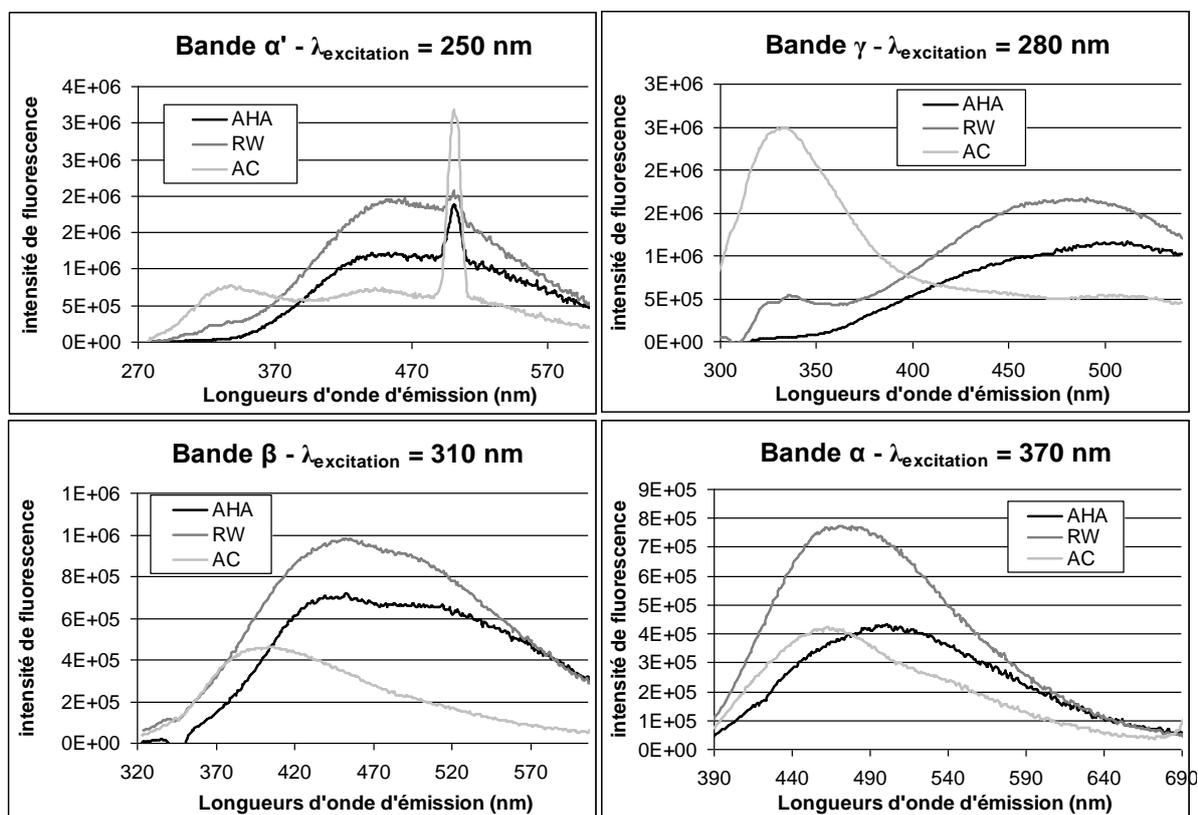


Figure 35. Spectres de fluorescence des 4 bandes α' , γ , β et α des 3 MOD étudiées par la méthode des plans d'expériences. Les intensités sont exprimées en unités arbitraires et ont été normées par la concentration en COD ; les spectres de AC ont tous été multipliés par 10 pour être visibles sur ces graphes.

III.1. Effet de la nature de la MOD sur les interactions HAP-MOD

Dans un premier temps, la force des interactions a été comparée à la nature de la MOD (Figure 36). Les valeurs moyennes des K_{DOC} montrent, que, comme déjà décrit dans la littérature, l'acide humique Aldrich s'associe plus fortement aux HAP que la MOD d'origine naturelle. Cependant, la MOD issue de la culture algale peut également former des interactions assez fortes avec les HAP les plus lourds (seulement un facteur 2 par rapport aux K_{DOC} de AHA). Quant à l'eau de rivière, elle a des interactions un peu plus fortes avec les HAP de plus faibles poids moléculaires que l'échantillon AC mais ses interactions restent faibles par rapport à AHA pour tous les HAP (il y a en moyenne un facteur 15 entre les K_{DOC} de RW et de AHA). Les eaux de rivière étant (d'après la littérature) majoritairement composées d'acides fulviques, ceux-ci interagissent certainement avec les HAP, peut-être majoritairement avec les plus légers d'entre eux. Les fortes interactions observées avec la MOD

d'origine algale montre que le matériel frais et faiblement humifié peut également interagir avec les HAP, surtout avec les plus lourds.

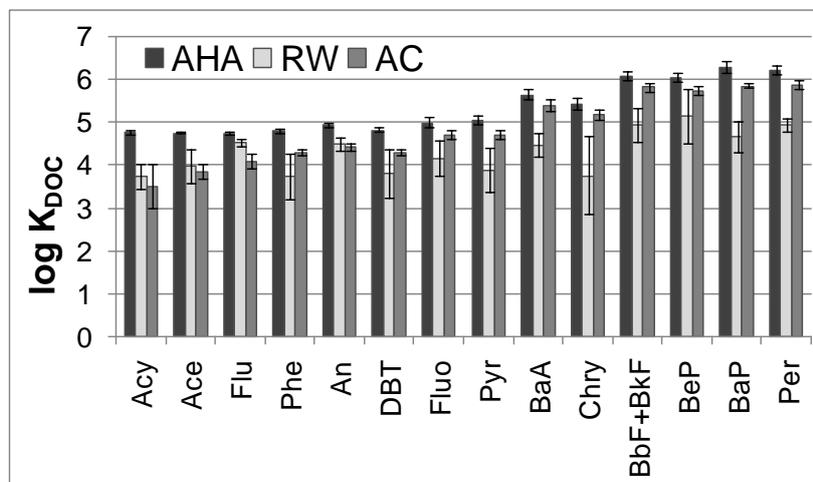


Figure 36. Valeurs moyennes des log K_{DOC} pour les échantillons correspondant aux points centraux ($n = 5$) des plans d'expériences pour les 3 types de MOD.

Si l'on compare les K_{DOC} aux valeurs des indices caractéristiques obtenus par spectroscopie d'absorption UV-visible, il semblerait que les interactions avec les HAP lourds soient plutôt corrélées négativement avec le rapport E_2/E_3 alors que les interactions avec les HAP légers semblent plus corrélées à l'aromaticité et/ou à E_4/E_6 . De la même façon pour les indices obtenus par spectroscopie de fluorescence, les interactions semblent corrélées avec les indices HIX et α'/α mais les interactions des HAP lourds semblent augmenter avec les indices γ/α et BIX. Il serait cependant nécessaire d'étudier les interactions sur un plus grand nombre d'échantillons de MOD pour établir une relation entre les K_{DOC} et les indices caractéristiques de la MOD.

	AHA	RW	AC
α'/α	2,9	2,6	2,0
γ/α	0,1	0,5	9,0
HIX	45,6	11,6	0,9
BIX	0,3	0,5	1,0
f_{450}/f_{500}	0,7	1,0	1,4
E_2/E_3	2,5	4,5	2,7
E_4/E_6	4,6	4,4	1,7
% aromaticité	45	25	9

Tableau 12. Valeurs des indices et des rapports calculés par spectroscopies pour les échantillons correspondant aux points centraux des plans d'expériences.

Les effets des paramètres physico-chimiques environnementaux ont ensuite été examinés afin d'essayer de mettre en relation les variations de K_{DOC} avec les variations des indices permettant la caractérisation des propriétés optiques de la MOD (Tableau 13).

Paramètres environnementaux	Type de MOD	Effet sur les interactions HAP-MOD (valeurs des K_{DOC})		Effets sur la MOD (valeurs des indices UV-visible et fluorescence)	
		+	-	+	-
pH	AHA		HAP lourds		E_2/E_3
	RW		<i>plupart des HAP</i>	SUVA, HIX, α' , α	E_2/E_3
	AC	Pas d'effet significatif		E_4/E_6 , SUVA, γ/α , γ	E_2/E_3 , E_4/E_6 , α'/α , f_{450}/f_{500}
Concentration en COD	AHA		HAP légers	E_4/E_6 , SUVA, HIX	α'/α , f_{450}/f_{500}
	RW		<i>tous HAP</i>	E_2/E_3 , E_4/E_6 , HIX, α' , α , γ , f_{450}/f_{500}	SUVA, HIX, f_{450}/f_{500} , α'/α , γ/α , γ
	AC		<i>tous HAP</i>		E_2/E_3 , E_4/E_6 , SUVA, HIX, α' , α , β
Concentration en HAP	AHA	Pas d'effet significatif			
	RW	Pas d'effet significatif			
	AC		tous HAP		
Salinité	AHA	Pas d'effet significatif		Pas d'effet significatif	
	RW	Pas d'effet significatif		Pas d'effet significatif	
	AC	Pas d'effet significatif		Pas d'effet significatif	

Tableau 13. Effet des paramètres environnementaux sur les interactions HAP-MOD et sur les propriétés optiques de la MOD. Les colonnes notées + représentent un effet positif (qui va dans le sens d'une augmentation de l'effet lors de l'augmentation du paramètre environnemental), les colonnes notées - représentent un effet négatif (qui va dans le sens d'une diminution de l'effet lors de l'augmentation du paramètre environnemental), les effets indiqués en italique dépendent de plusieurs paramètres environnementaux simultanément.

III.2. Effet de la salinité sur les interactions HAP-MOD

Pour les 3 types de MOD étudiés, la salinité n'avait d'influence ni sur les K_{DOC} ni sur les paramètres optiques de la MOD (Tableau 13). Dans la littérature, il a déjà été observé une diminution des K_{DOC} quand la salinité augmente (Schlautman et Morgan 1993) et l'effet contraire (Gauthier et al. 1986). Le premier avait été attribué à un changement de configuration de la MOD avec la salinité alors que le deuxième serait plutôt dû à la modification de la solubilité aqueuse des HAP à cause de « l'effet de sel ». Il est possible qu'ici ces deux effets soient très faibles, n'entraînant de modification visible ni des interactions ni des propriétés de la MOD.

III.3. Effet de la concentration en HAP sur les interactions HAP-MOD

En ce qui concerne l'effet de la concentration en HAP, celle-ci n'a montré une influence sur les interactions que pour l'échantillon issu de la culture d'algue (AC). Ces résultats semblent être en

désaccord avec ceux obtenus précédemment pour l'acide humique Aldrich où une compétition entre les HAP avait pu être mise en évidence (publication n°3). Cependant, la gamme de concentrations étudiée par les plans d'expériences était beaucoup plus étroite et correspondait au domaine linéaire des résultats précédents, excepté justement pour l'échantillon AC. Ceci confirmerait donc la non-linéarité et la compétition des HAP vis-à-vis de la MOD.

III.4. Effet du pH et de la concentration en COD sur les interactions HAP-MOD

Concernant les effets du pH et de la concentration en COD, ceux-ci sont plus complexes puisqu'ils dépendent des HAP, de la nature de la MOD et peuvent être interdépendants. D'un point de vue général, les K_{DOC} augmentent lorsque la concentration en MOD et le pH diminuent. D'autre part, le pH a généralement plus d'effet sur les HAP de hauts poids moléculaires alors que la concentration en COD a plus d'effet sur les HAP de faibles poids moléculaires. Ces observations correspondent parfaitement au comportement de l'acide humique Aldrich. Pour l'eau de rivière, la concentration en COD a un effet significatif même sur les interactions des HAP les plus lourds et le pH a un effet sur la plupart des HAP. Pour la MOD d'origine algale, le pH n'a d'effet sur les interactions avec aucun des HAP.

Le pH et la concentration en COD peuvent difficilement induire une modification des propriétés des HAP. Les effets de ces paramètres sur les propriétés optiques de la MOD ont donc été examinés afin de déterminer s'il existe une corrélation entre les effets sur la MOD et les effets sur les interactions.

III.5. Effet du pH et de la concentration en COD sur les propriétés optiques de la MOD

III.5.1. Acide humique Aldrich

Une variation de pH de 5 à 9 n'a modifié que faiblement les propriétés optiques de AHA. Seul l'indice spectroscopique E_2/E_3 a augmenté lors de la diminution du pH, impliquant une diminution de l'aromaticité et/ou du poids moléculaire de la MOD. Or les indices correspondant à l'aromaticité (SUVA et pourcentage d'aromaticité calculé à 280 nm) et E_4/E_6 inversement proportionnel au poids moléculaire moyen n'ont pas montré de variation significative. Aucun des indices de fluorescence ne variant significativement, il a donc été impossible de conclure sur un éventuel effet du pH sur AHA même si la protonation des macromolécules a contribué à l'augmentation des K_{DOC} des HAP lourds.

Lors de la dilution de l'acide humique Aldrich, l'indice HIX, l'aromaticité et le rapport E_4/E_6 diminuent alors que l'indice f_{450}/f_{500} augmente. A forte concentration en COD, on peut supposer que, de par le manque d'espace disponible entre les macromolécules, celles-ci se sont agglomérées entre elles augmentant ainsi l'aromaticité globale des macromolécules. La taille des macromolécules serait alors plus importante quand la concentration en COD augmente, comme le traduit effectivement la diminution du paramètre f_{450}/f_{500} due à un déplacement de la bande α vers les plus grandes longueurs

d'onde (caractéristique des molécules de plus hauts poids moléculaires). Seul le rapport E_4/E_6 montre une tendance inverse, ce qui laisse penser que cet indice n'est peut-être pas adapté à la caractérisation de la structure conformationnelle de la MOD. D'après les résultats obtenus pour les interactions, une augmentation de taille et d'aromaticité de la MOD ne serait pas liée aux interactions de la MOD avec les HAP de hauts poids moléculaires et serait défavorable aux interactions avec les HAP de faibles poids moléculaires. Comme l'a fait penser l'effet du pH, les HAP n'ont donc peut-être pas les interactions les plus fortes avec les noyaux aromatiques. Cette hypothèse peut sembler peu probable étant donné qu'un assez grand nombre d'articles (e. g. Chin et al. 1997, Hur et Kim 2009, Perminova et al. 1999) a mis en évidence une corrélation positive entre l'aromaticité et les K_{DOC} des HAP. Cependant, Kopinke et al. (2001) ont montré que l'aromaticité n'était pas le facteur déterminant pour les interactions avec les HAP et que la flexibilité des macromolécules pourrait être un facteur tout aussi voire plus important pour ces interactions. Ainsi, l'agrégation des macromolécules a pu engendrer une perte de flexibilité de celles-ci, ce qui pourrait avoir engendré une diminution des valeurs de K_{DOC} .

III.5.2. MOD d'origine algale

Bien que les interactions des HAP avec AC ne soient pas significativement influencées par le pH, les propriétés optiques de la MOD le sont fortement. Ainsi, les intensités de fluorescence de toutes les bandes caractéristiques sont fortement diminuées à faible pH ainsi que l'aromaticité des macromolécules (traduite par le pourcentage d'aromaticité et le SUVA). La composition de cette MOD fraîche est certainement responsable de ces effets qui ne sont observés pour les autres MOD que pour la bande γ de l'eau de rivière. Cette bande constituée de macromolécules de type protéines peut être composée majoritairement de groupes fonctionnels phénoliques, qui sont des molécules très sensibles aux variations de pH (Senesi 1990). La protonation des groupements phénols pourraient également expliquer une diminution de l'aromaticité puisque celle-ci induit une diminution du coefficient d'extinction molaire (Goldschmid 1954). Les groupements phénoliques pourraient donc être les fluorophores majoritaires de l'échantillon AC mais ne seraient pas les molécules les plus réactives vis-à-vis des HAP, ce qui expliquerait la faible dépendance des interactions vis-à-vis du pH.

La concentration en COD, quant à elle, modifie les K_{DOC} des HAP de faibles poids moléculaires de façon significative et a également un effet sur les propriétés optiques de la MOD. L'augmentation de la concentration en COD induit une diminution de l'intensité de fluorescence indiquant certainement une désexcitation non radiative des états excités par collisions entre les macromolécules. Les rapports E_2/E_3 et E_4/E_6 diminuent quand la concentration augmente, indiquant une augmentation de la taille des macromolécules ainsi que de l'aromaticité et/ou une diminution de la concentration en molécules d'oxygène. Cependant, étant donné que le SUVA varie dans le sens opposé, on peut supposer que la variation du rapport E_2/E_3 est uniquement due au changement de taille de la MOD. Il est ainsi possible que les macromolécules ayant des groupements oxygénés aient réagi entre elles pour former des agrégats plus gros contenant moins d'atomes d'oxygène et que ces agrégats soient moins favorables aux HAP de faibles poids moléculaires.

III.5.3. MOD d'eau de rivière

Pour l'eau de rivière, les effets du pH et du COD sont entièrement dépendants l'un de l'autre. Lorsque le pH est faible et la concentration en COD élevée, il semblerait que les macromolécules soient complètement repliées sur elles-mêmes comme le suggèrent les plus fortes valeurs de E_2/E_3 , E_4/E_6 , f_{450}/f_{500} et les variations d'intensité des bandes de fluorescence. Ce repliement intramoléculaire pourrait alors défavoriser les interactions avec les HAP quelque soit leur taille. Lorsque la concentration en COD diminue, toujours à pH faible, les macromolécules pourraient avoir plus de place pour se développer et présenter des cavités propices aux interactions avec les HAP, puisque tous les HAP ont des K_{DOC} plus élevés dans ces conditions. Lorsque le pH est élevé, les macromolécules ionisées empêchent le repliement intramoléculaire mais à forte concentration il est possible, malgré la répulsion entre les charges, qu'il y ait une agrégation intermoléculaire comme le suggère la diminution de l'indice f_{450}/f_{500} lorsque la concentration augmente. Cependant, quelle que soit la structure de la MOD, l'ionisation des macromolécules engendrerait des valeurs de K_{DOC} beaucoup plus faibles.

L'effet des paramètres environnementaux dépend donc fortement de la nature de la MOD et des HAP étudiés. L'absorption UV-visible et la fluorescence n'ont ici pas permis de conclure formellement sur les effets des paramètres environnementaux sur la structure des macromolécules, mais les tendances de certains indices caractéristiques ont pu permettre d'établir certaines hypothèses qu'il serait intéressant de vérifier par d'autres techniques.

IV. Étude des interactions HAP – MOD dans le milieu naturel (publication n°5)

Les interactions HAP-MOD ont ensuite été étudiées directement dans le milieu naturel. Ainsi ces interactions ont été examinées dans des eaux interstitielles de sédiments du Bassin d'Arcachon (publication n°5).

IV.1. Développement des extractions d'eaux interstitielles

L'étape de centrifugation (9000 g, 11 min, 15 °C), nécessaire pour l'extraction de l'eau contenue dans les sédiments, s'est avérée être plus problématique que prévu à cause de l'adsorption des HAP sur les tubes couramment utilisés avec cette technique. En effet, les rendements ont été mesurés par SPME-GC-MS pour des tubes à centrifuger en polypropylène sur des eaux supplémentées à des concentrations en HAP équivalentes à celles que l'on peut trouver dans les eaux interstitielles naturelles (environ 10 ng.L⁻¹ par HAP). La Figure 37 montre que les HAP de hauts poids moléculaires sont perdus lors de l'extraction et que les HAP de faibles à moyens poids moléculaires ont des rendements de 10 à 65 %. Afin d'améliorer ces rendements, plusieurs types de tubes en verre et en polycarbonate (Nalgène®) ont été testés sur des eaux supplémentées en 4 HAP. Les rendements sont nettement meilleurs, surtout pour les tubes en verre (Figure 38). Cependant, ces derniers ont posé des problèmes de casse lors de la centrifugation et n'ont pas pu être finalement

utilisés. D'autre part, comme le montrent les résultats pour les tubes en verre Duran (d'une contenance de 50 mL) et Kimble (d'une contenance de 25 mL) remplis de 20 mL d'échantillon, plus le tube est rempli, meilleurs sont les rendements. Ceci a été vérifié sur les tubes Nalgène® qui, remplis de 50 mL d'eau supplémentée à 60 ng.L^{-1} , donnent des rendements de 40 à 100 %. Pour un échantillon de sédiment l'extraction a été faite grâce à des tubes en verre et des tubes Nalgène® et ces derniers ont montré des rendements allant de 60 à 100 % par rapport à ceux obtenus avec les tubes en verre. Les tubes Nalgène® ont donc été utilisés par la suite pour les échantillons naturels et ont été bien remplis afin de limiter au maximum l'adsorption des HAP sur les parois.

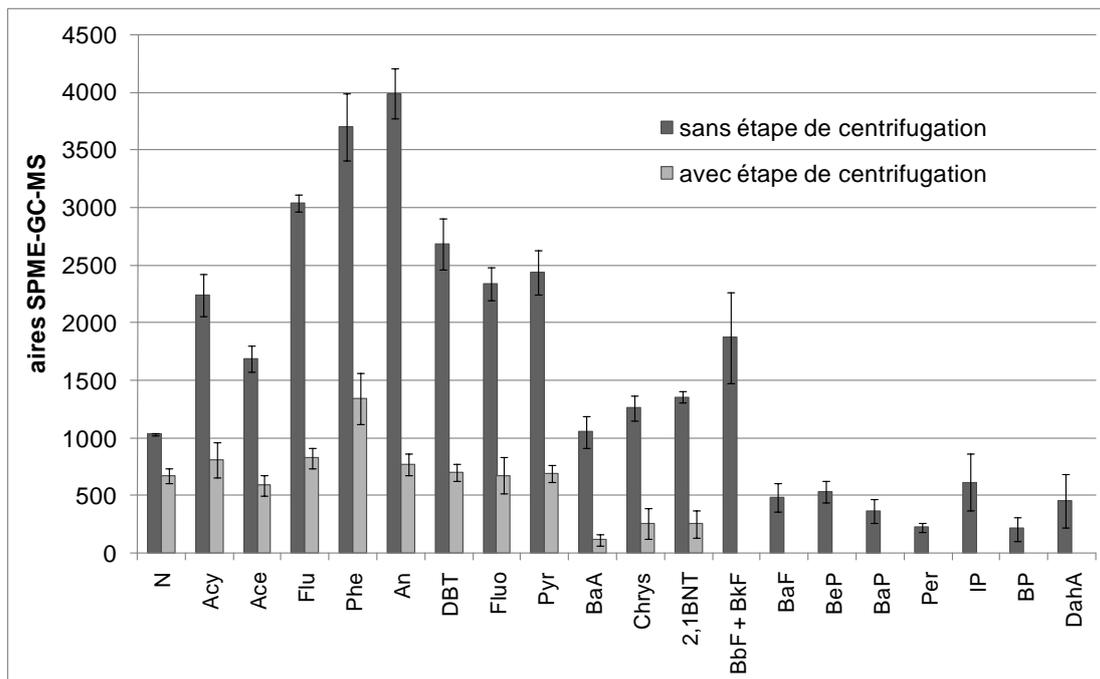


Figure 37. Comparaison des aires des HAP avec et sans étape de centrifugation pour des tubes à centrifuger en polypropylène.

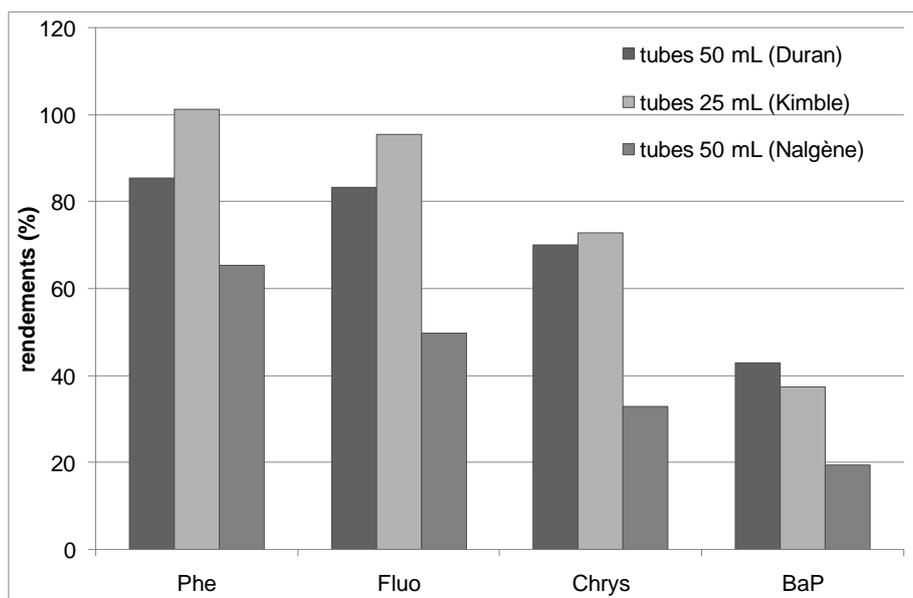


Figure 38. Rendements en HAP après l'étape de centrifugation. *Volume d'eau supplémentée : 20 mL, concentration en HAP : environ 100 ng.L⁻¹ chacun.*

Étant donné que les tubes Nalgène® ne peuvent pas être calcinés, des blancs faits dans l'eau ultrapure ont été réalisés pour vérifier qu'il n'y avait pas de contamination en HAP. Chaque étape de l'extraction a finalement été examinée et leur apport en HAP est reporté Figure 39.

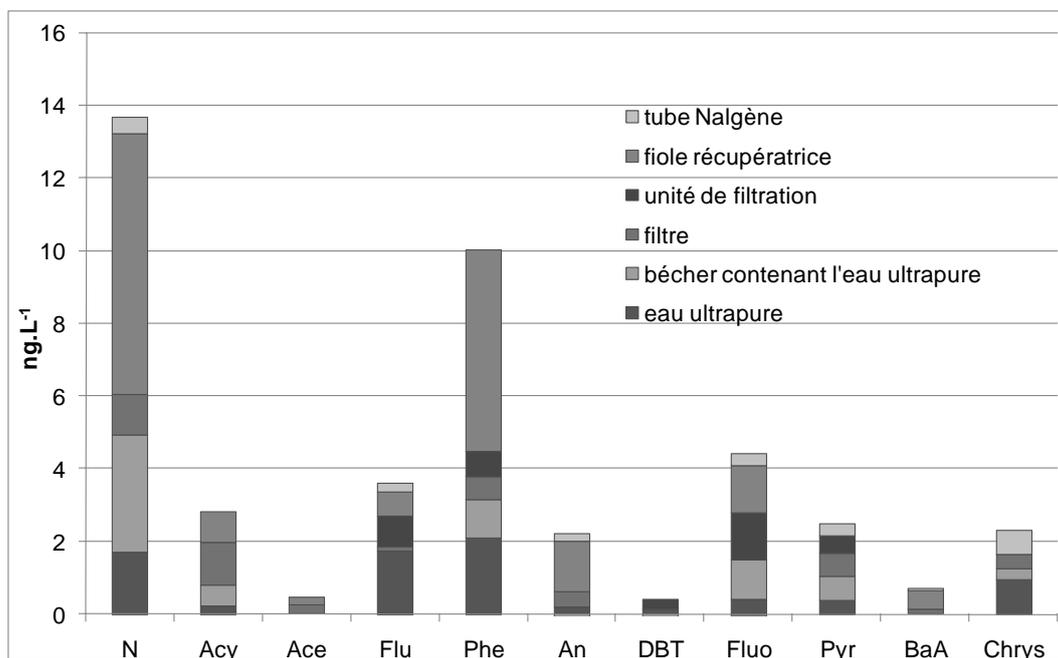


Figure 39. Concentrations en HAP quantifiées lors de l'extraction d'eau ultrapure selon le protocole d'extraction des eaux interstitielles. *Volume d'eau extrait : 200 ml.*

Il en ressort une contamination faible en HAP de la part des tubes à centrifuger mais beaucoup plus importante pour les fioles. La contamination globale est d'ailleurs plus importante que les concentrations rencontrées dans les échantillons (généralement inférieures à 10 ng.L⁻¹) et laissent

penser que la réalisation de blancs avec de l'eau ultrapure, contenant un minimum de HAP légers, n'est pas appropriée. Toutefois, une partie des HAP de faibles poids moléculaires retrouvée dans les échantillons pourrait être due à une contamination de la vaisselle malgré toutes les précautions prises. Afin de minimiser ces effets, un maximum de sédiment a donc été extrait pour chaque échantillon afin de maximiser le volume d'eau interstitielle extraite pour diminuer la contribution en HAP due à la verrerie.

IV.2. Dosage des HAP dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon

Le dosage des HAP dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon a montré une très faible contamination en HAP pour tous les échantillons issus de divers prélèvements à des moments et des endroits différents. Les sédiments prélevés dans les ports de La Teste et d'Arcachon montrent également de faibles concentrations, sauf celui échantillonné près du chantier naval dans le port d'Arcachon. Ce dernier montre d'ailleurs une composition en HAP originale avec une absence de HAP de faibles poids moléculaires (suggérant une origine pyrolytique, Soclo et al. 2000) et une concentration en pyrène largement supérieure à celle du fluoranthène (indiquant une origine pétrogénique, Soclo et al. 2000). Les autres échantillons semblent majoritairement issus de phénomènes pyrolytiques (rapport de concentrations fluoranthène / pyrène ≈ 1), avec une prédominance des HAP de 2 à 4 cycles aromatiques due à la meilleure solubilité aqueuse de ces composés par rapport aux HAP de plus hauts poids moléculaires. D'autre part, l'absence de traces d'acénaphthylène, de fluorène, de phénanthrène et d'anthracène dans l'échantillon du chantier naval confirme que, malgré les résultats des blancs effectués sur l'eau ultrapure, la contamination due à la verrerie n'est pas significative pour les échantillons naturels.

IV.3. Caractérisation de la MOD des eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon

L'étude des spectres 3D de la MOD a permis de mettre en évidence différentes origines des macromolécules selon l'endroit et le moment du prélèvement. La plupart des échantillons ont une bande γ caractéristique de macromolécules récentes non humifiées et celle-ci est plus intense pour les échantillons prélevés au printemps. Cette MOD peut avoir une origine végétale due au phytoplancton et/ou aux herbiers ou une origine microbienne. Certains échantillons ont une très faible composante γ et sont majoritairement constitués de substances humiques donnant des spectres de fluorescence caractéristiques de MOD d'origine terrigène. C'est notamment le cas des échantillons prélevés à l'extérieur du port d'Arcachon et au niveau de la cale d'embarquement du port de La Teste. Les spectres 3D dépendent également de la saison puisque les échantillons prélevés en hiver ont des spectres moins intenses que ceux prélevés en été. Cependant, la variabilité spatiale étant très importante, il est difficile de commenter la variabilité temporelle étant donné que les prélèvements n'ont pas tous été faits au même endroit d'une saison à l'autre.

IV.4. Étude des interactions HAP-MOD dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon

La plupart des échantillons ont permis de mettre en évidence des interactions entre la MOD et les HAP présents initialement dans l'échantillon. Ces interactions sont surtout visibles pour le fluoranthène et le pyrène qui étaient présents dans tous les échantillons, alors que les HAP plus lourds sont toujours en limite de détection lorsqu'ils sont détectés et les HAP plus légers ont de plus faibles interactions avec la MOD. Pour certains échantillons dont plusieurs HAP ont pu être détectés, il a pu être observé une relation linéaire entre les K_{DOC} et les K_{OW} (Figure 40), ce qui implique une corrélation entre le caractère hydrophobe des HAP et leur affinité pour la MOD naturelle. Une telle relation avait d'ailleurs également été observée avec l'acide humique Aldrich (publication n°3).

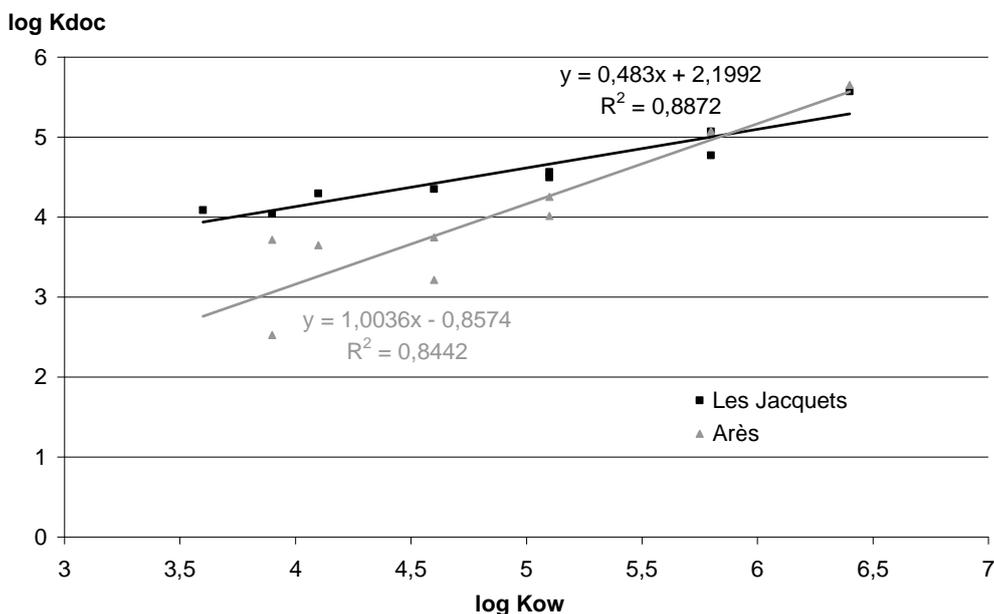


Figure 40. Corrélation entre les log K_{DOC} et les log K_{OW} des HAP présents dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon

Des relations entre les K_{DOC} et les paramètres optiques de la MOD des échantillons ont été recherchées pour le fluoranthène et le pyrène. La corrélation la plus forte est négative et a été obtenue entre les K_{DOC} et les valeurs de HIX. Comme précédemment évoqué, il semblerait que les macromolécules les plus humifiées et les plus aromatiques ne donnent pas les interactions les plus fortes avec les HAP (Figure 41). Il existe également une corrélation négative entre l'intensité de fluorescence de la bande α' normalisée par la concentration en COD, confirmant qu'une plus grande abondance de substances humiques ne signifie pas que les interactions sont plus fortes et qu'il semblerait que ce soit le contraire. La corrélation positive avec le rapport γ/α confirme d'ailleurs qu'une forte contribution en matériel organique frais est favorable aux interactions avec les HAP. Concernant le rapport α'/α , une faible corrélation négative a été observée avec le K_{DOC} mais tous les points sont situés sur une gamme très faible de valeurs (2-2,5) sauf Grand Banc (à 1,1) qui semble en grande partie responsable de la pente négative.

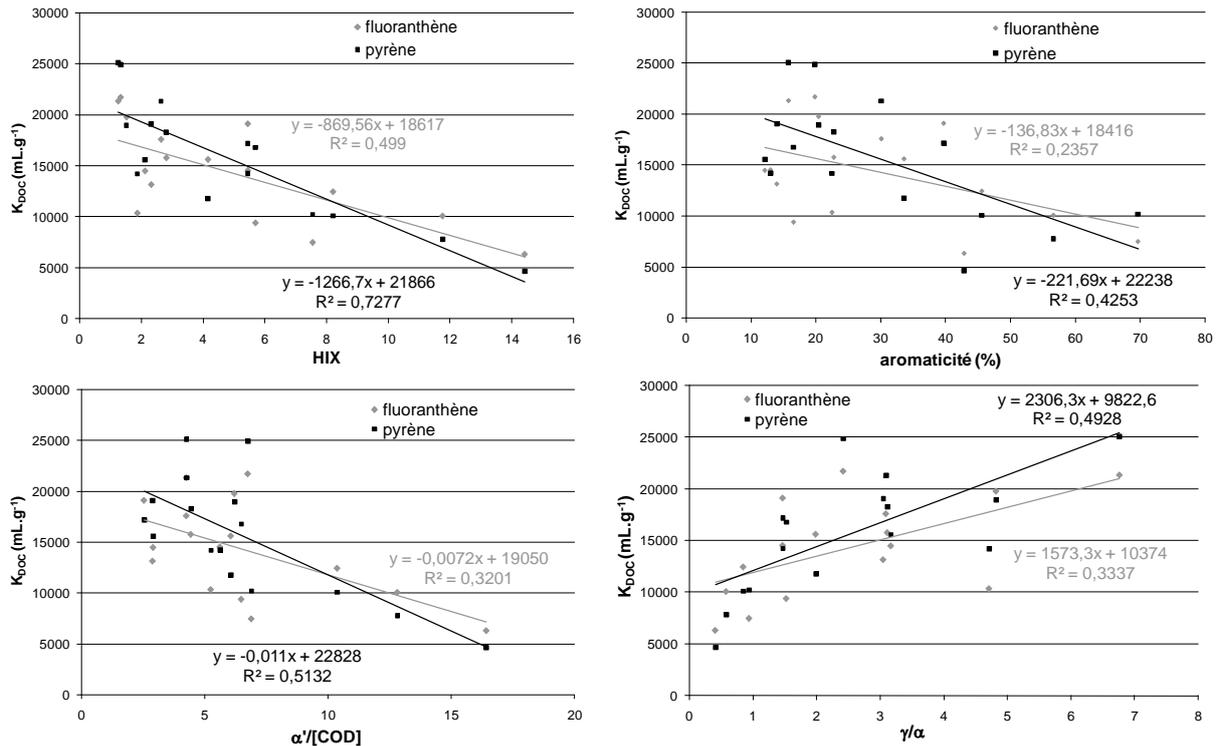


Figure 41. Corrélations entre les K_{DOC} et le HIX, le pourcentage d'aromaticité, le rapport $\alpha'/[COD]$ et le rapport γ/α dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon.

Il a été vérifié que les faibles valeurs de HIX des échantillons donnant le plus d'interactions n'étaient en fait pas dues à une association avec les HAP. En effet, si l'association avec les HAP engendre une diminution de la fluorescence, il est possible que les faibles valeurs de HIX soient dues à ces interactions et non aux propriétés d'humification de la MOD. Afin de savoir si les valeurs de HIX varient lorsque les HAP sont associés à la MOD, des expériences d'extinction de fluorescence ont été réalisées sur deux échantillons : l'un avec un fort HIX et une bande γ peu intense (échantillon extérieur du port d'Arcachon de mai 2009) et l'autre avec un faible HIX et une bande γ très intense (île aux oiseaux de décembre 2008). Les valeurs de HIX ont été calculées pour des concentrations en HAP de 10, 50, 100 et 500 ng.L⁻¹. Même si des interactions ont pu être mises en évidence par extinction de fluorescence de la MOD lors d'ajout des HAP, les valeurs de HIX restent constantes : lors d'un ajout jusqu'à 50 ng.L⁻¹ de HAP, les valeurs de HIX varient de 14,4 à 14,2 et de 4,1 à 4,0 pour les échantillons du port d'Arcachon et de l'île aux oiseaux respectivement. A partir de 100 ng.L⁻¹, la fluorescence des HAP est largement supérieure à celle de la MOD et il n'est donc plus possible de mettre en œuvre cette approche. Les faibles valeurs de HIX des échantillons présentant les interactions les plus fortes avec les HAP ne seraient donc pas dues à ces interactions mais bien au degré d'humification de la MOD.

Ces expériences ont également permis de comparer les résultats de K_{DOC} obtenus par extinction de fluorescence avec ceux de SPME-GC-MS d'un point de vue qualitatif en ce qui concerne l'effet de la contribution du matériel organique frais et de la bande γ sur la force des interactions. Même si l'extinction de fluorescence de la MOD par les HAP était faible pour les deux échantillons,

elle était plus marquée pour l'échantillon de l'île aux oiseaux (Figure 42), correspondant à la MOD la moins humifiée, ce qui confirme les résultats obtenus par SPME-GC-MS. Cependant, pour ce dernier échantillon, la fluorescence des HAP est supérieure à celle de la MOD assez rapidement lors de l'ajout des HAP et il est donc plus approprié de regarder l'extinction de fluorescence des HAP par la MOD. La Figure 43 confirme ainsi les interactions assez fortes qu'il existe entre les HAP et cette MOD.

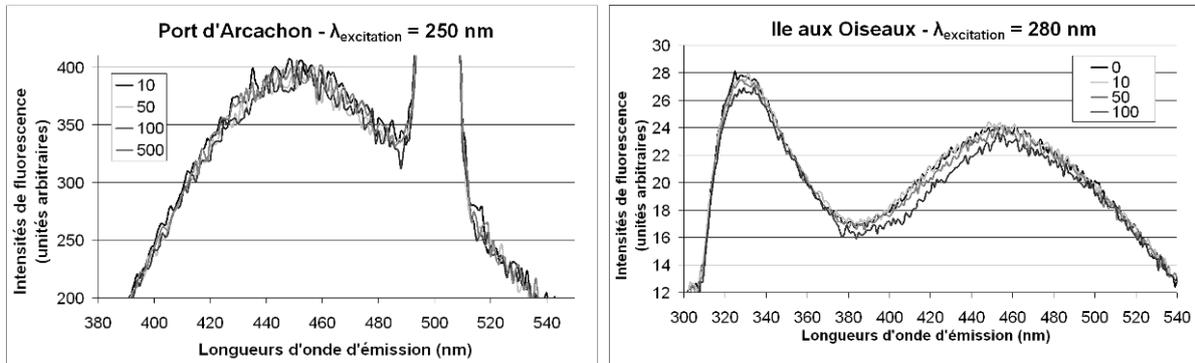


Figure 42. Extinction de fluorescence de la MOD par les HAP pour les échantillons du port d'Arcachon et de l'île aux oiseaux. Les concentrations en HAP sont en ng.L^{-1} .

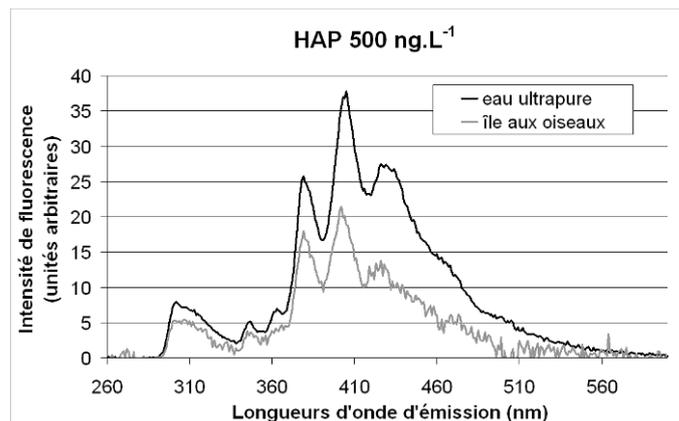


Figure 43. Spectres d'extinction de fluorescence des HAP par la MOD pour l'échantillon de l'île aux oiseaux. La longueur d'onde d'excitation est de 250 nm.

V. Étude des interactions substances pharmaceutiques – MOD (publication n°6)

Un deuxième volet de ces travaux a été consacré à l'étude des interactions de la MOD avec des substances pharmaceutiques, et plus particulièrement des benzodiazépines. Ces interactions ont été étudiées par extinction de fluorescence et par SPME-GC-MS. Ces techniques déjà développées pour les HAP ont dû être adaptées pour leur application aux substances pharmaceutiques. L'extraction sur phase solide (SPE) a également été utilisée pour vérifier les concentrations en médicaments des échantillons par une technique déjà validée. Les interactions benzodiazépines - MOD ont été étudiées avec quatre types de MOD : l'acide humique Aldrich, une eau de rivière (prélevée à La Réole dans la Garonne et concentrée par osmose inverse), une eau marine (prélevée à Toulon dans la Mer Méditerranée et concentrée par nanofiltration et osmose inverse, Huguet 2007) et une eau interstitielle (extraite d'un sédiment marin du Bassin d'Arcachon).

V.1. Caractérisation des échantillons de MOD

Ces quatre échantillons de MOD ont été caractérisés par spectroscopie UV-visible et spectrofluorimétrie 3D (Tableau 14). L'acide humique Aldrich est représentatif de MOD très humifiée (forte aromaticité, HIX élevé, pas de matériel récent), les acides fulviques sont représentés par l'eau de rivière dans laquelle ils sont majoritaires (macromolécules plus faiblement aromatiques, de plus petite taille, très peu de matériel récent), l'eau interstitielle est caractéristique de MOD récente (bande γ majoritaire, faible aromaticité, macromolécules de taille intermédiaire) et l'eau de mer est ici représentative de macromolécules marines agrégées et humifiées à faible teneur en matières fraîches (macromolécules assez grosses, faible bande γ).

MOD	E_2/E_3	E_4/E_6	% aromaticité	$I\alpha'/I\alpha$	$I\gamma/I\alpha$	HIX	f_{450}/f_{500}
acide humique Aldrich	2,6	3,3	53	3,6	0,2	28,7	0,7
Eau marine	1,3	1,0	40	2,8	1,4	5,7	1,1
Eau interstitielle	3,1	2,1	14	2,6	2,8	2,7	1,2
Eau de rivière	5,6	15,6	21	2,4	0,3	15,3	1,2

Tableau 14. Indices d'absorption UV-visible et de fluorescence des différents types de MOD.

V.2. Développement de la SPME-GC-MS

La SPME-GC-MS a été développée pour la quantification des concentrations en carbamazépine et diazépam et la détermination de leur spéciation (fraction libre vs fraction totale en phase dissoute). De la même façon que pour les HAP, les paramètres optimaux de la SPME-GC-MS ont été recherchés (fibre la plus sensible, température de désorption, temps d'immersion). Comme indiqué dans la publication n°6, les fibres en Carbowax™-DVB 65 μm avec une température de désorption de 250 °C et un temps d'extraction de 30 min permettent d'obtenir de bonnes conditions d'analyse : des limites de détection de $0,27 \pm 0,08$ et $0,09 \pm 0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$ ainsi que des variabilités moyennes de 17 et 11 % sur les aires GC-MS ($n = 3$) pour la carbamazépine et le diazépam respectivement. D'autre part, l'étalonnage interne par rapport à la carbamazépine d10 et au diazépam d5 permet de diminuer cette variabilité moyenne à 15 et 5 % pour la quantification des deux composés natifs. Contrairement aux HAP, l'utilisation de l'étalonnage interne par rapport au naphthalène d8 pour la quantification de la fraction libre d'analytes n'apporte ici aucune amélioration puisque la variabilité moyenne sur la quantification de la carbamazépine et du diazépam augmente dans ce cas à 23 et 20 % respectivement. Ceci peut aisément s'expliquer puisque le naphthalène a une structure chimique différente des benzodiazépines et il doit se comporter différemment tout au long de l'analyse (vis-à-vis de la fibre SPME, de la colonne du GC, de la fragmentation par le MS...). Les phénomènes agissant sur la variabilité analytique du naphthalène ne seraient donc pas les mêmes que

ceux agissant sur les benzodiazépines et aucune amélioration de la reproductibilité ne pourrait donc être apportée par l'utilisation du naphthalène d8. Pour vérifier la quantification des étalonnages externe (pour la quantification de la fraction libre) et interne (pour la quantification de la fraction totale), un échantillon pseudo-inconnu à $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ a été analysé en triplicat par les deux méthodes. Pour l'étalonnage externe, le choix de la gamme étudiée s'avère être très important. En effet, pour une gamme d'étalonnage de $0,2$ à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, la quantification du pseudo-inconnu permet l'obtention de rendements de 72 et 65 % pour la carbamazépine et le diazépam respectivement (Figure 44). Même si ces gammes ont des coefficients de corrélation assez bons ($R^2 = 0,9978$ et $0,9966$, $n = 5$), les quantifications à partir de gammes d'étalonnage de 1 à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ sont meilleures : rendements de 80 et 85 % (avec des coefficients de corrélation des droites d'étalonnage de $0,9973$ et $0,9999$, $n = 3$). Ces résultats montrent donc que pour la quantification d'un échantillon à une concentration inconnue, l'étalonnage externe devra préférentiellement être fait sur deux mesures : la première afin de déterminer une approximation de la concentration et la deuxième, par l'utilisation d'une gamme d'étalonnage assez affinée, afin d'établir la concentration de l'échantillon. Cependant, dans le cadre de ces travaux, les échantillons ont été fabriqués en laboratoire. Les concentrations théoriques sont donc connues et l'étude des interactions avec la MOD a été faite par comparaison d'échantillons aux mêmes concentrations en médicaments mais avec différentes MOD en présence. Dans notre cas, la quantification par étalonnage externe a donc pu être faite par comparaison des aires du pseudo-inconnu avec celles d'un triplicat d'étalon à une concentration du même ordre. De cette façon, les rendements obtenus sont de 108 et 98 % respectivement pour la carbamazépine et le diazépam. La comparaison des aires entre deux échantillons de concentrations de même ordre est donc tout à fait possible et peut permettre la quantification de la fraction libre avec une bonne justesse. En ce qui concerne l'étalonnage interne, les coefficients de réponses entre composés natif et deutéré correspondant sont les mêmes sur une gamme $0,2 - 10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($0,6$ et $0,8$ en moyenne pour la carbamazépine et le diazépam) avec une variabilité d'environ 5 %. Les rendements obtenus sur l'échantillon pseudo-inconnu à $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ sont par cette méthode de 97 % pour la carbamazépine et de 104 % pour le diazépam avec des variabilités respectives de 1 et 4 % (Figure 44). L'étalonnage interne est donc juste et précis pour une gamme de concentrations assez large et s'avère être la méthode la plus adaptée à la quantification d'un échantillon de concentration inconnue.

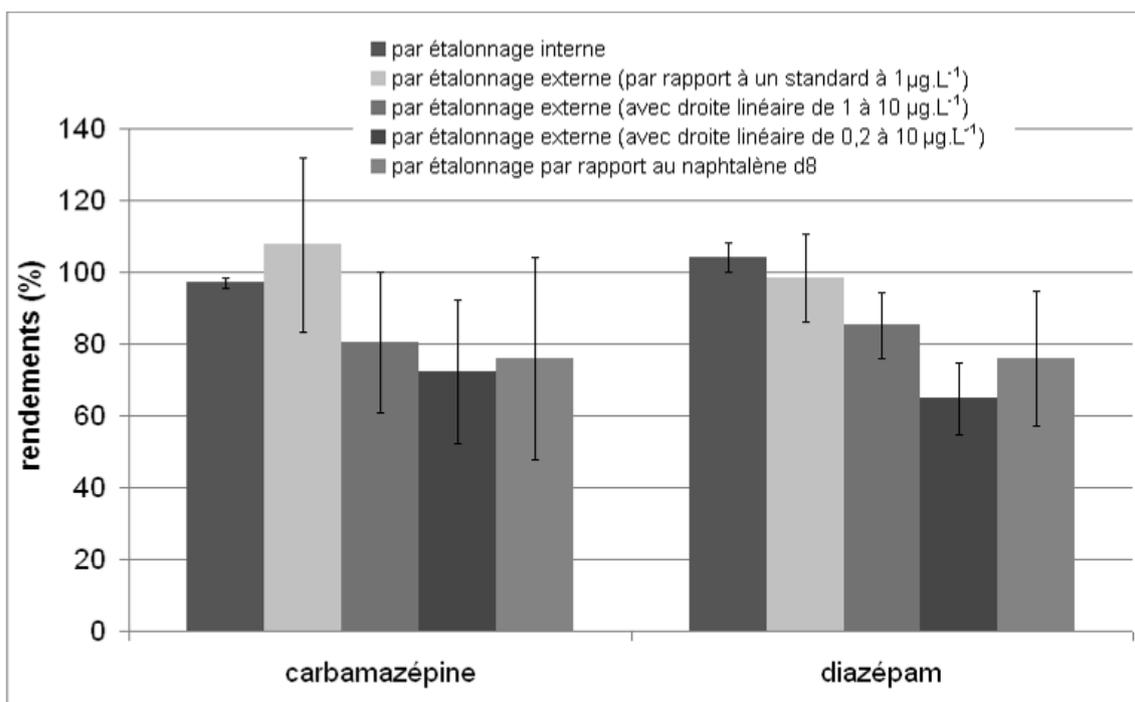


Figure 44. Rendements de quantification des benzodiazépines par SPME-GC-MS d'un pseudo-inconnu à 2 µg.L⁻¹ par différents étalonnages (fibre Carbowax™-DVB 65 µm, n = 3).

Avant l'étude des interactions, l'effet du pH et de la salinité ont été étudiés pour des échantillons aqueux sans MOD pour déterminer si ces paramètres physico-chimiques affectent l'extraction par SPME. Les résultats présentés dans la publication n°6 montrent que tant que le pH est supérieur à 6 et la salinité inférieure à 35, ces paramètres physico-chimiques n'influencent pas significativement l'extraction par SPME. Cependant, afin d'optimiser au maximum l'étude des interactions avec la MOD, les échantillons sans MOD utilisés pour comparer les aires GC-MS à ceux contenant de la MOD ont été ajustés en pH et salinité.

V.3. Étude des interactions benzodiazépines-MOD

V.3.1. Par SPME-GC-MS

Comme indiqué dans la publication n°6, les aires GC-MS obtenues pour les échantillons sont semblables à celles obtenues pour les blancs correspondants (eau du robinet ajustée en pH et salinité) contenant les mêmes quantités de médicaments ; aucune interaction n'a donc pu être mise en évidence entre les deux benzodiazépines et les différents types de MOD. En effet, les aires étant proportionnelles aux concentrations libres d'analytes, en présence d'interactions l'ajout de MOD aurait entraîné la diminution de la fraction libre de médicaments et les aires des échantillons (avec MOD) auraient donc été plus faibles que celles des blancs (sans MOD). Deux hypothèses peuvent donc être avancées : soit il n'y a aucune interaction entre les deux médicaments et les quatre types de MOD étudiés, soit les interactions ne sont pas suffisamment fortes pour être observées de façon significative par cette technique. Afin de déterminer l'hypothèse la plus probable, l'extinction de

fluorescence a été appliquée à ces échantillons, puisque l'étude des interactions HAP-MOD avait montré que les interactions faibles sont plus facilement observées avec cette technique.

V.3.2. Par extinction de fluorescence

Contrairement aux HAP, la carbamazépine et le diazépam fluorescent peu (Figure 45). Il est donc préférable d'observer l'extinction de fluorescence de la MOD lors de l'interaction de ses fluorophores avec ces médicaments. L'inconvénient de cette méthode est qu'il sera impossible de mettre en évidence des interactions entre les benzodiazépines et la MOD non fluorescente et qu'il ne sera donc pas possible de conclure qu'aucune interaction n'a lieu même si aucune extinction de fluorescence n'est observée. D'un autre côté, l'avantage de cette méthode est la possibilité de mettre en évidence le type de fluorophore (grâce à l'utilisation de la spectrofluorimétrie 3D) impliqué dans les interactions, si interactions il y a, et donc peut-être de pouvoir émettre des hypothèses quant à la nature de ces interactions.

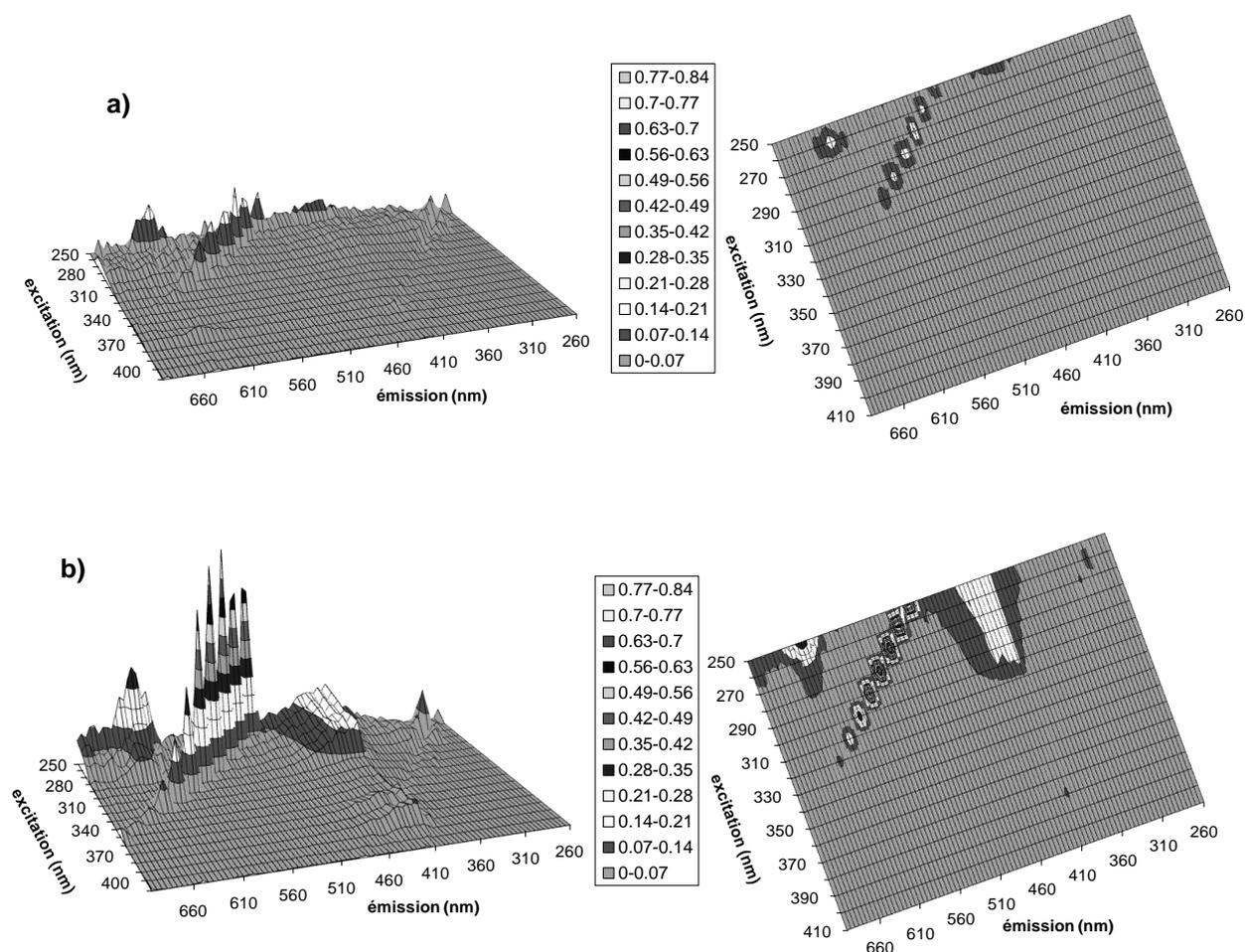


Figure 45. Spectres de fluorescence des blancs a) carbamazépine et b) diazépam pour des concentrations de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les intensités sont indiquées en unités Raman.

L'extinction de fluorescence a permis de mettre en évidence des interactions entre certaines MOD et les contaminants étudiés. Ces interactions dépendent du type de MOD, du type de fluorophore observé et du médicament (Tableau 15).

	Bandes de fluorescence	100-(F/(F _{MOD} +F _{med})) (%)		Log K _{DOC}	
		Carbamazépine	Diazépam	Carbamazépine	Diazépam
Eau interstitielle	α'	6	14	5,07 ± 0,01	5,57 ± 0,01
	α	4	6	4,85 ± 0,01	5,08 ± 0,01
	γ	-3	-3	ns	ns
Eau marine	α'	15	22	5,62 ± 0,01	5,98 ± 0,01
	α	17	25	5,69 ± 0,01	6,01 ± 0,01
	γ	38	23	6,36 ± 0,01	5,98 ± 0,01
Eau de rivière	α'	1	3	ns	ns
	α	0	1	ns	ns
Acide humique Aldrich	α'	6	50	4,99 ± 0,01	6,43 ± 0,01
	α	2	55	ns	6,56 ± 0,01

Tableau 15. Extinctions de fluorescence et valeurs de K_{DOC} obtenues pour les différents médicaments en présence des différents types de MOD. $F = \text{fluorescence MOD} + \text{médicament}$, $F_{\text{MOD}} = \text{fluorescence de la MOD seule}$, $F_{\text{med}} = \text{fluorescence du médicament seul}$, ns=interaction non significative, les K_{DOC} sont exprimés en L.mol⁻¹.

Les interactions en présence sont très faibles puisque mis à part pour l'échantillon d'eau marine, une concentration de 2 µg.L⁻¹ en contaminant n'a pas permis de modifier significativement l'intensité de fluorescence. Cependant, avec des concentrations en médicaments de 200 µg.L⁻¹, la plupart des combinaisons MOD - contaminants permettent de mettre en évidence des interactions. Une variation de l'intensité de fluorescence n'a été considérée comme significative qu'au-delà de 3 % pour les bandes α et α' , et au-delà de 12 % pour la bande γ ; ces pourcentages représentant la variabilité expérimentale (variabilité analytique et variabilité de l'échantillon cumulées). De ce fait, aucune interaction n'a pu être mise en évidence entre l'eau de rivière et les deux benzodiazépines. Les valeurs des K_{DOC} ont été calculées pour chaque interaction significative : les log K_{DOC} varient de 4,85 ± 0,01 à 6,56 ± 0,01 et sont très variables selon le type de MOD et pour une même MOD, selon le type de fluorophore (Tableau 15). Comme le montre la Figure 46, la bande γ , caractéristique du matériel récent, peut être en partie éteinte par la présence de benzodiazépine pour l'eau marine alors qu'elle n'est pas du tout diminuée pour l'eau interstitielle (Figure 47) ; l'intensité de cette bande augmente même légèrement (même si cette augmentation n'est pas significative). Par contre, pour ce même échantillon d'eau interstitielle, les intensités des autres bandes de fluorescence diminuent significativement en présence de médicaments. D'autre part, les réactivités contaminant – MOD sont différentes selon le médicament et les interactions sont généralement plus fortes avec le diazépam, surtout pour l'acide humique Aldrich (Figure 48).

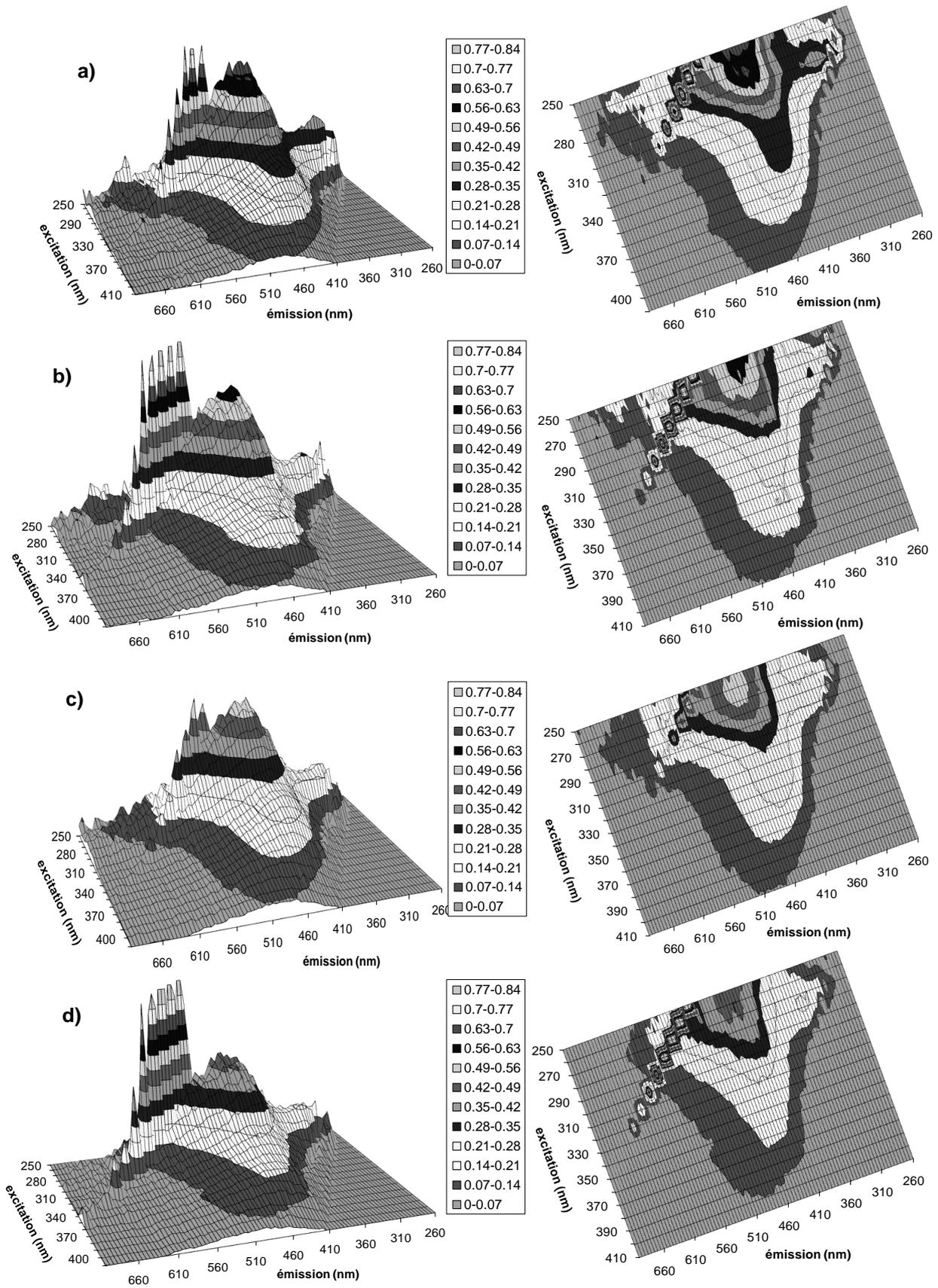


Figure 46. Spectres de fluorescence a) théorique eau marine + carbamazépine, b) expérimental eau marine + carbamazépine, c) théorique eau marine + diazépam, d) expérimental eau marine + diazépam. Les concentrations en médicaments sont de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les intensités sont indiquées en unités Raman.

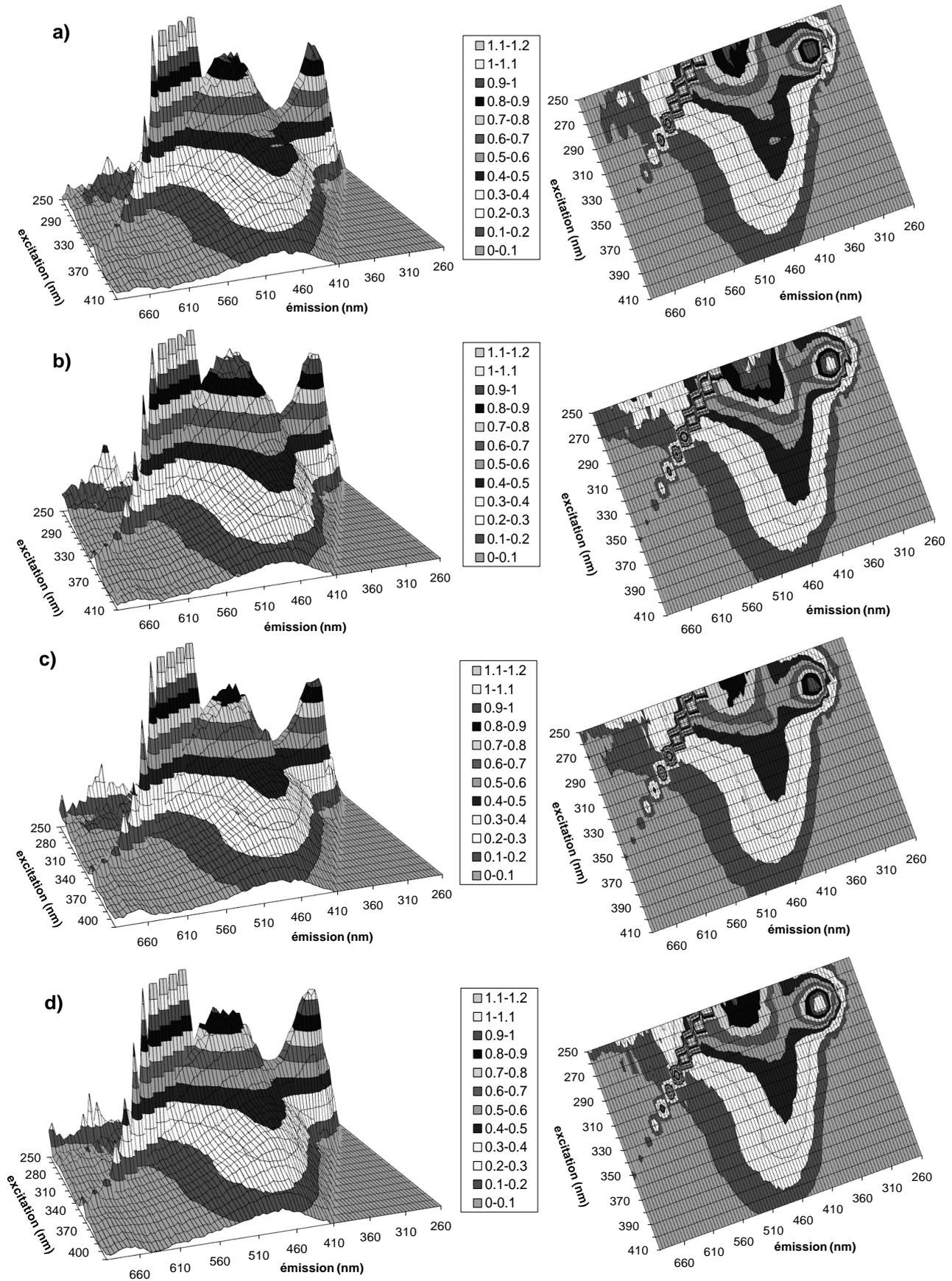


Figure 47. Spectres de fluorescence a) théorique eau interstitielle + carbamazépine, b) expérimental eau interstitielle + carbamazépine, c) théorique eau interstitielle + diazépam, d) expérimental eau interstitielle + diazépam. Les concentrations en médicaments sont de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les intensités sont indiquées en unités Raman.

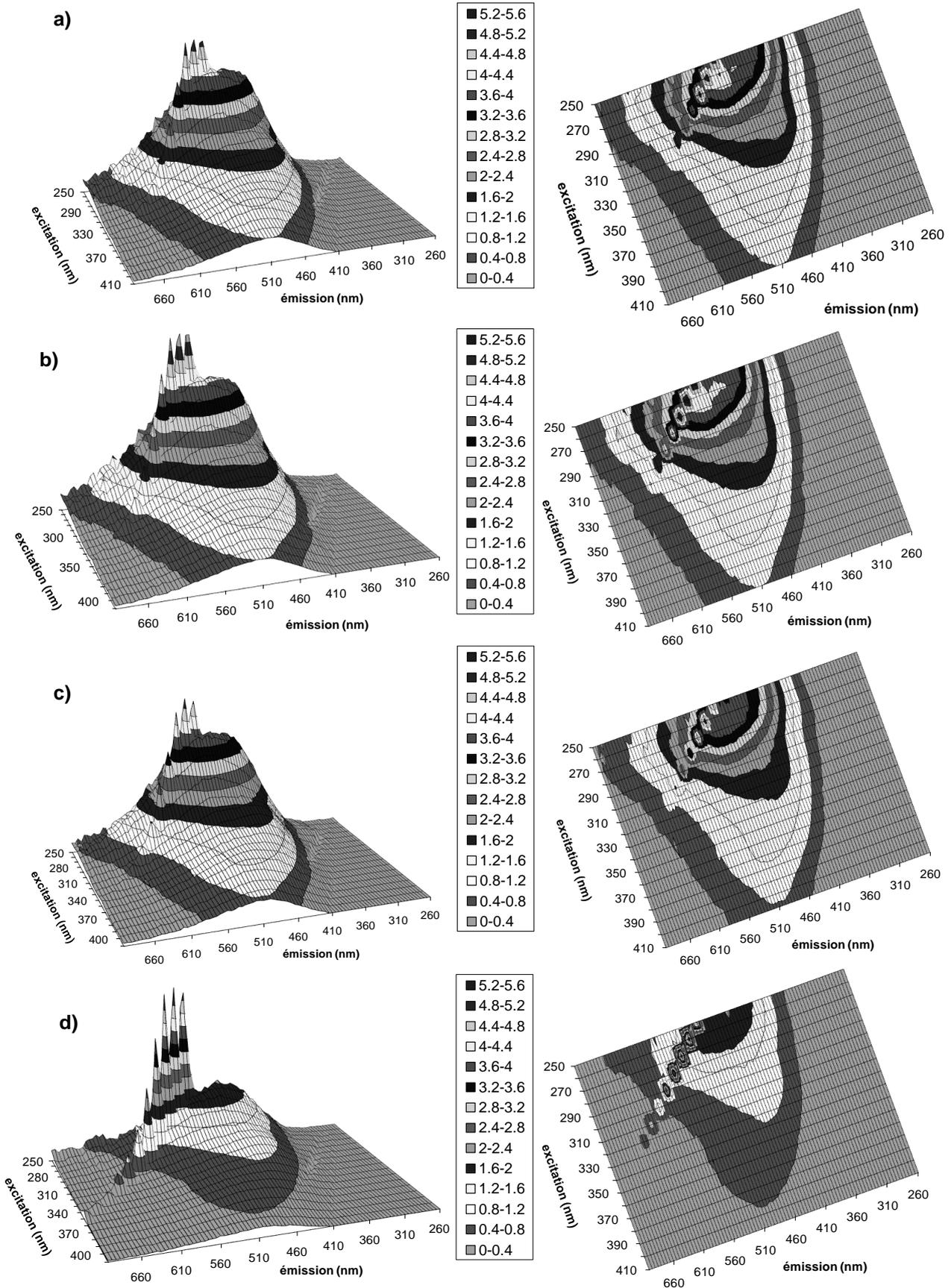


Figure 48. Spectres de fluorescence a) théorique acide humique Aldrich + carbamazépine, b) expérimental acide humique Aldrich + carbamazépine, c) théorique acide humique Aldrich + diazépam, d) expérimental acide humique Aldrich + diazépam. Les concentrations en médicaments sont de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les intensités sont indiquées en unités Raman.

Comme les valeurs de K_{DOC} ont été obtenues pour seulement une concentration en médicaments (à $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, puisqu'à $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ les interactions étaient trop faibles pour être observées), l'extinction de fluorescence a été étudiée plus précisément par spectrofluorimétrie 2D pour des concentrations allant de 2 à $500 \mu\text{g.L}^{-1}$. Ces expériences ont été effectuées pour chaque interaction précédemment observée dans le but de vérifier les résultats obtenus en 3D et d'étudier la linéarité de ces interactions. De ces études en 2D, il en ressort globalement que les bandes de fluorescence α et α' voient leur intensité varier linéairement avec la concentration en médicaments sur la gamme étudiée (Figure 49). Par contre, l'intensité de la bande γ semble beaucoup plus variable mais sans dépendre de la concentration en contaminants. Les résultats obtenus pour les bandes α et α' des MOD naturelles confirment ceux observés par spectrofluorimétrie tridimensionnelle, c'est-à-dire que l'eau de mer réagit plus fortement avec les deux contaminants que l'eau interstitielle, même si la différence entre les deux MOD est moins marquée de par la plus forte variabilité en 2D. D'autre part, les faibles coefficients de corrélation obtenus pour les bandes γ des deux échantillons naturels et les deux médicaments (R^2 de 0,02 à 0,39) laissent penser qu'il n'y a pas ou peu d'interaction avec le matériel récent de la MOD. Il est intéressant de noter que, bien que non significative, la tendance à l'augmentation de l'intensité de fluorescence de l'eau interstitielle en présence de diazépam est également observée par spectrofluorimétrie 2D.

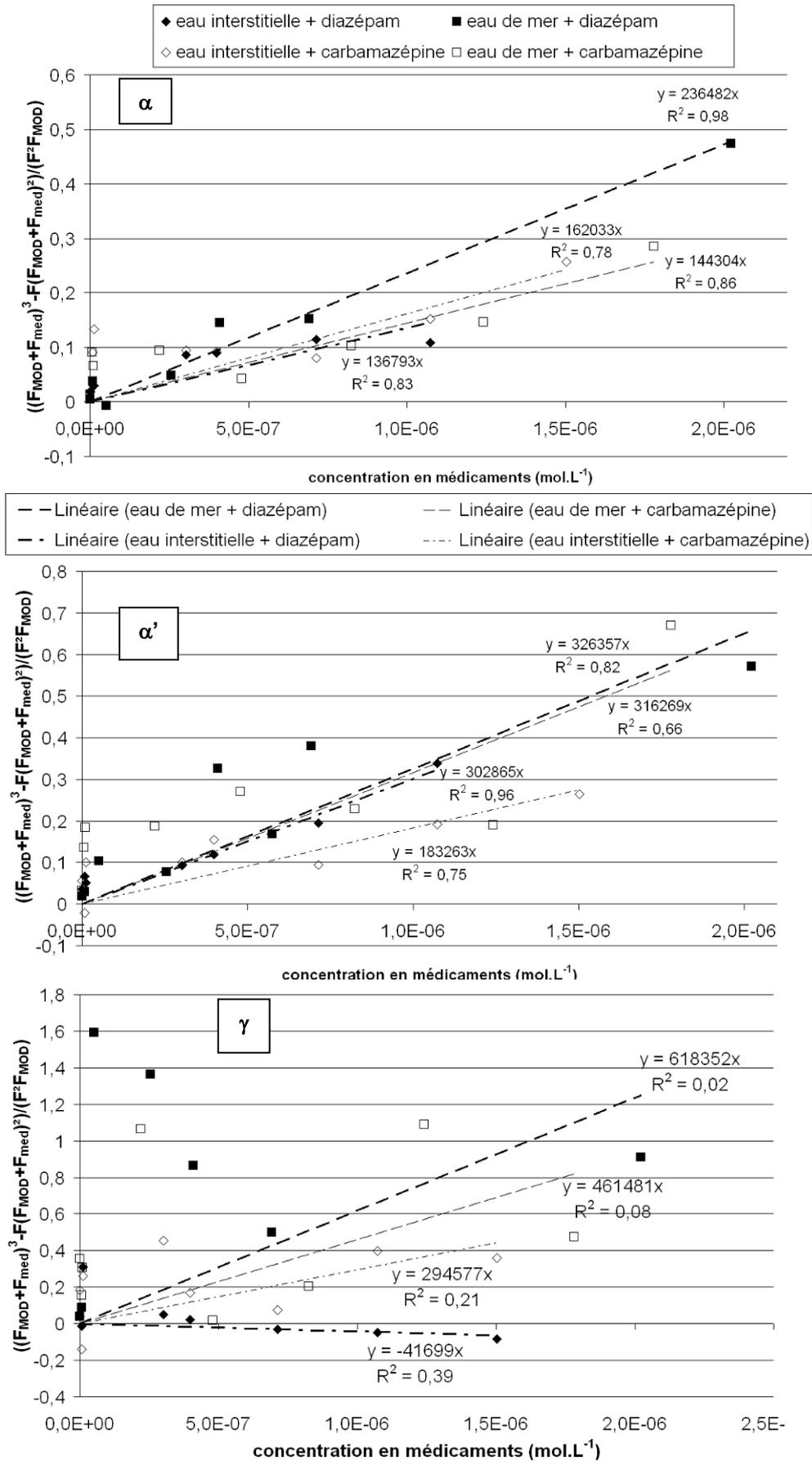


Figure 49. Évolution de l'intensité de fluorescence des eaux de mer et interstitielle en fonction de la concentration en médicaments pour les bandes α (en haut), α' (au milieu) et γ (en bas). F_{MO} = intensité de fluorescence de la MOD seule, F_{med} = intensité de fluorescence des médicaments seuls, F = intensité de fluorescence du mélange médicaments + MOD, les coefficients directeurs des droites de corrélation correspondent aux K_{DOC} exprimés en $L.mol^{-1}$.

La Figure 50 montre que pour l'acide humique Aldrich, les interactions ne semblent pas linéaires. En effet, pour la carbamazépine, l'ajout de médicaments est sans effet sur la fluorescence jusqu'à une certaine concentration, à partir de laquelle la MOD est éteinte. Ceci expliquerait qu'en spectrofluorimétrie tridimensionnelle, ces interactions étaient faibles ou non significatives, puisque certainement étudiées en dessous de ce point limite. En modélisant ces interactions par une droite, les interactions en présence de faibles concentrations en carbamazépine sont certainement surestimées, et au contraire sous-estimées à fortes concentrations. Ce phénomène de non-linéarité pourrait peut-être s'expliquer par des interactions avec des groupements fonctionnels non fluorescents de l'acide humique à faibles concentrations en carbamazépine et une fois tous ces groupements occupés, la carbamazépine interagirait ensuite avec les groupements fluorescents (noyaux aromatiques par exemple). Cependant, ceci n'est pas vérifiable étant donné que les résultats par SPME n'ont pas permis de mettre en évidence des interactions entre la carbamazépine et l'acide humique Aldrich. D'autre part, la non-linéarité observée est due aux points correspondant aux deux échantillons les plus concentrés en carbamazépine. Pour le diazépam, qui a pourtant été fabriqué de façon indépendante, les deux points les plus concentrés semblent également montrer une rupture de la linéarité, mais avec un effet opposé par rapport à la carbamazépine, puisqu'ils entraînent une diminution du K_{DOC} à plus fortes concentrations. Il est donc possible qu'à fortes concentrations en médicaments, un phénomène modifiant la fluorescence ait lieu pour les deux contaminants mais qu'il soit visible de façon différente selon le composé. De plus, si l'on fait abstraction de ces deux points, les résultats sont beaucoup plus cohérents avec la spectrofluorimétrie tridimensionnelle : interactions assez fortes pour le diazépam et très faibles voire non significatives pour la carbamazépine.

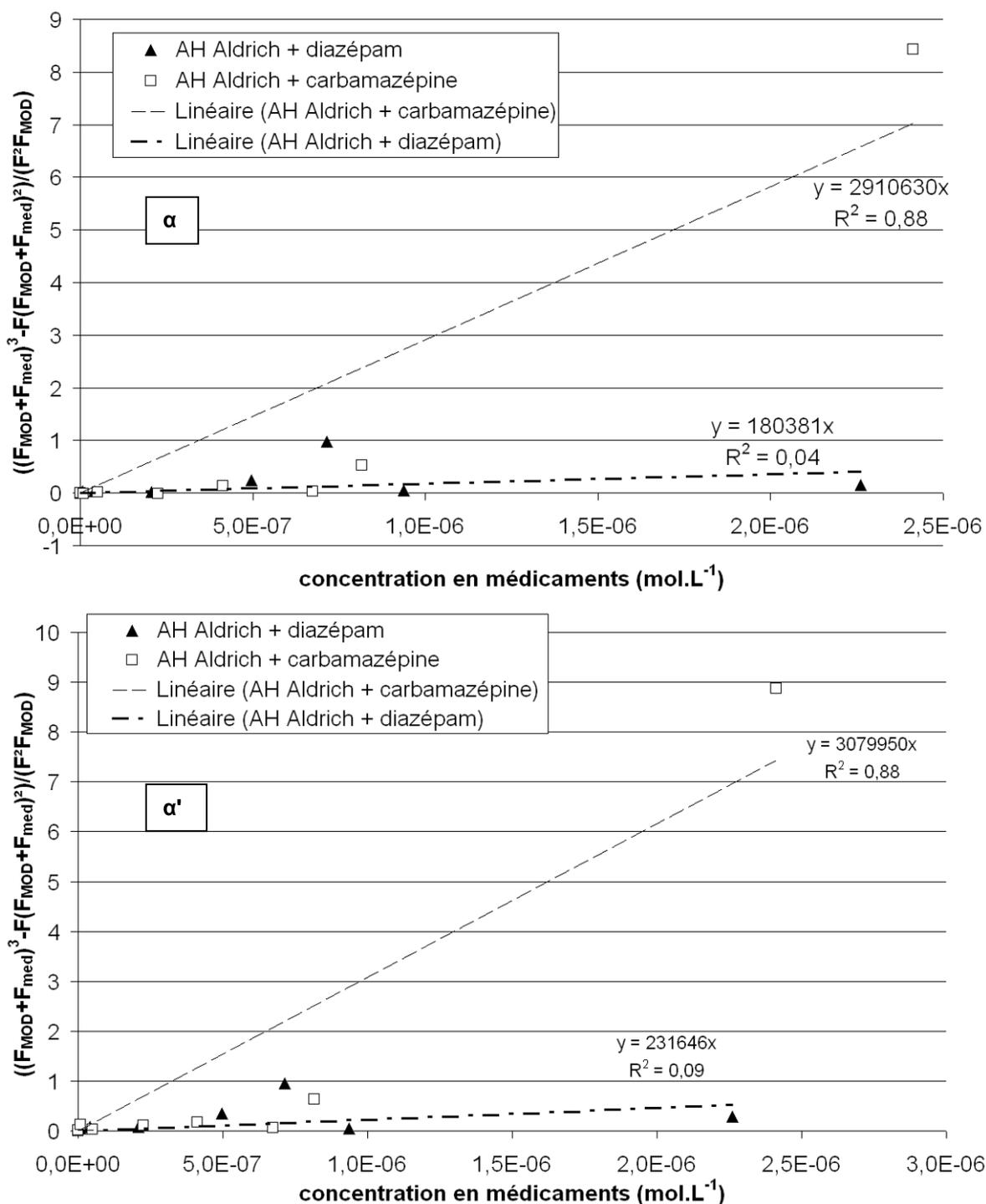


Figure 50. Évolution de l'intensité de fluorescence de l'acide humique Aldrich en fonction de la concentration en médicaments pour les bandes α (en haut) et α' (en bas). F_{MO} = intensité de fluorescence de la MOD seule, F_{med} = intensité de fluorescence des médicaments seuls, F = intensité de fluorescence du mélange médicaments + MOD, les coefficients directeurs des droites de corrélation correspondent aux K_{DOC} exprimés en $L.mol^{-1}$.

Même si la tendance est plus marquée par spectrofluorimétrie tridimensionnelle, le diazépam semble s'associer plus fortement à la MOD pour chaque fluorophore de chaque type de MOD que la carbamazépine. La carbamazépine est plus petite, plus aromatique mais moins polaire et moins hydrophobe que le diazépam. Les deux médicaments possèdent un groupement polaire amide

constitué de deux atomes d'azote et d'un atome d'oxygène et diffèrent essentiellement par leur partie hydrophobe, qui est plane pour la carbamazépine et constituée d'un atome de chlore pour le diazépam. La différence de réactivité des deux molécules est donc très probablement due à leur partie hydrophobe. D'autre part, la forme particulière de la partie hydrophobe de la carbamazépine (noyaux aromatiques conjugués) ne semble pas augmenter la force des interactions avec la MOD puisque le diazépam est plus réactif. Ceci pourrait donc impliquer que les interactions hydrophobes en présence ne sont pas spécifiques et que l'aromaticité du contaminant n'entre pas (ou peu) en compte.

En ce qui concerne la composition de la MOD, l'eau de rivière, essentiellement composée d'acides fulviques (comme l'indique le rapport $E_2/E_3 > 3,5$, Minero et al. 2007), n'interagit pas avec les deux contaminants. Il semblerait donc que ces deux benzodiazépines ne réagissent pas avec les macromolécules plus petites de type acides fulviques, même si le degré d'humification est important ($HIX = 15,3$). Des interactions avec les autres types de MOD, essentiellement composés d'acides humiques, ont pu être mises en évidence pour les deux contaminants. Plus la MOD est aromatique et humifiée, plus les interactions avec le diazépam sont fortes, et ce pour tous les fluorophores observés. Pour la carbamazépine, les mêmes observations peuvent être faites pour les MOD naturelles mais pas pour l'acide humique Aldrich avec lequel elle n'interagit pas ou très peu selon le fluorophore, surtout à faible concentration en carbamazépine. Pour ce contaminant, les valeurs des K_{DOC} sont du même ordre pour les fluorophores α et α' de l'eau interstitielle et de l'acide humique Aldrich. Or ces deux échantillons ont des valeurs d'indices E_2/E_3 et E_4/E_6 très proches (autour de 2-3). De plus, ces indices pour l'eau de rivière, qui ne donne pas d'interactions, ont des valeurs beaucoup plus grandes (5,6 et 15,6) alors que l'eau de mer, la plus réactive, donne des valeurs très faibles (autour de 1). Il semblerait donc que les interactions avec la carbamazépine soient inversement proportionnelles à ces deux indices et donc d'autant plus fortes que les macromolécules sont grosses. Alors que pour le diazépam, les interactions avec la MOD de type acide humique semblent liées à l'aromaticité de cette dernière, impliquant certainement un caractère plus hydrophobe de la MOD, mais ne semblent pas liées à la taille des macromolécules.

Pour conclure, cette étude a permis de mettre en évidence des interactions faibles entre les benzodiazépines et la MOD. La MOD constituée essentiellement d'acides fulviques ne semble s'associer ni avec le diazépam ni avec la carbamazépine alors que la MOD plus fortement concentrée en acides humiques semble plus réactive. Il semblerait que les interactions avec le diazépam soient de nature hydrophobe alors que les interactions avec la carbamazépine semblent avoir un caractère hydrophobe moins marqué et être essentiellement contrôlées par la taille des macromolécules. Enfin, ces interactions ont été observées à de faibles concentrations en MOD (quelques mg.L^{-1} de COD) et ne doivent donc pas être négligées dans des environnements naturels plus fortement concentrés en MOD, où la diminution de la fraction libre de ces médicaments pourrait être plus marquée.

Conclusion et perspectives

Les objectifs de ces travaux de thèse étaient de développer des outils analytiques permettant une étude fiable des interactions entre la matière organique dissoute et les contaminants organiques et d'essayer de comprendre les phénomènes mis en jeu dans ces interactions.

La première partie de ces objectifs a été atteinte grâce au développement de la SPME-GC-MS et de l'extinction de fluorescence. Ces deux techniques ont montré leur adéquation à l'étude des interactions avec la MOD aussi bien pour les HAP que pour les substances pharmaceutiques. Ces techniques sont d'autre part complémentaires puisque la SPME-GC-MS est plus adaptée à l'étude des interactions fortes alors que l'extinction de fluorescence est bien adaptée à l'étude des interactions plus faibles. L'intérêt de cette dernière technique a pu être confirmé pour les contaminants organiques et pas uniquement pour ceux qui fluorescent. D'autre part, la SPME-GC-MS est un excellent outil qui permet non seulement d'étudier les interactions contaminants organiques – MOD mais qui permet également la quantification des contaminants à des concentrations traces dans des échantillons aqueux, même chargés matriciellement. Cette technique possède également un avantage considérable puisqu'elle permet l'étude des interactions contaminants organiques – MOD directement dans des échantillons naturels, sans qu'il soit nécessaire d'ajouter des contaminants ou de la MOD.

Ces techniques ont ensuite pu aider à la compréhension des phénomènes impliqués dans les interactions. Les expériences menées sur l'acide humique Aldrich et les HAP ont montré des phénomènes de compétition entre les contaminants vis-à-vis de la MOD. Il a ainsi été souligné que l'usage d'étalons internes permettant la quantification des contaminants doit être réfléchi car il peut entraîner des modifications des interactions mesurées. D'autre part, la modélisation des interactions par des isothermes linéaires peut entraîner des sous-estimations ou des surestimations de la fraction libre puisque sur des gammes importantes de concentrations en HAP ou en MOD, les interactions sont généralement non linéaires.

La SPME-GC-MS a permis le calcul de K_{DOC} pour de nombreux HAP dans différentes conditions de concentrations en HAP et en COD avec l'acide humique Aldrich. Ces valeurs de K_{DOC} ont permis d'enrichir la littérature car peu de données sont disponibles, sauf pour quelques HAP très étudiés (phénanthrène, pyrène, benzo[a]pyrène par exemple). L'extinction de fluorescence a permis la mesure de K_{DOC} pour quatre HAP (phénanthrène, pyrène, chrysène, benzo[a]pyrène) alors que les plus lourds d'entre eux n'avaient, à notre connaissance, jamais été calculés par cette technique. Il pourrait donc être intéressant d'appliquer cette technique à d'autres HAP et surtout de les étudier simultanément comme par SPME. Pour cela cependant, des traitements mathématiques (PARAFAC par exemple) devront être faits car la fluorescence des HAP se recouvre à certaines longueurs d'onde et il est difficile de déconvoluer les spectres, surtout en présence de MOD elle aussi fluorescente.

L'étude de l'effet des paramètres physico-chimiques sur les interactions HAP-MOD a révélé que la salinité n'a pas d'impact sur ces interactions, au moins en ce qui concerne les MOD étudiées.

Cependant, celles-ci étant de natures très variables (naturelles, commerciales, humifiées, fraîches...), il est très probable que la salinité soit l'un des facteurs les moins influents sur les interactions des HAP avec la plupart des types de MOD. Le pH et la concentration en COD sont, semble-t-il, des paramètres plus importants mais leur impact dépend fortement du type de MOD et de HAP. Une diminution du pH et de la concentration en COD est généralement favorable aux interactions avec les trois types de MOD étudiés mais les effets de ces paramètres peuvent être différents en ce qui concerne les propriétés optiques de la MOD. Ceci peut s'expliquer par le fait que les macromolécules fluorescentes observées ne sont pas de même nature selon le type de MOD et que l'effet de la protonation et de la dilution de la MOD ne peut être visible que sur les chromophores et les fluorophores, qui ne sont pas forcément les macromolécules qui interagissent avec les HAP. Afin de mieux comprendre ce qu'il se passe au niveau de la conformation des macromolécules, il serait donc intéressant de pouvoir étudier l'effet des paramètres physico-chimiques grâce à des techniques permettant l'observation (ou la description) de toutes les macromolécules, même celles qui n'absorbent pas dans l'UV-visible (par microscopie par exemple).

L'application de la SPME-GC-MS à l'étude des interactions HAP-MOD dans les eaux interstitielles du Bassin d'Arcachon a permis de mettre en évidence des associations entre MOD et HAP présents naturellement dans les eaux interstitielles. Ainsi, les HAP présents dans l'environnement aquatique du Bassin d'Arcachon, généralement d'origine pyrolytique, peuvent voir leurs concentrations dans la colonne d'eau augmenter à cause de la MOD. En effet, même si les HAP sont majoritairement présents dans les sédiments en raison de leur faible solubilité aqueuse, leurs interactions avec la MOD dans l'eau interstitielle peuvent favoriser leur migration vers la colonne d'eau et ainsi augmenter leur mobilité. D'autre part, ces effets ont pu être observés pour la plupart des échantillons, aussi bien dans les ports que dans les zones intertidales du Bassin, et ce, quelles que soient la nature et l'origine de la MOD présente.

L'applicabilité de la SPME au milieu naturel est un formidable atout qui pourrait aider à la compréhension des interactions grâce à la possibilité d'étudier les interactions HAP-MOD dans de nombreux milieux naturels et cela de façon aisée. En couplage avec l'analyse de la MOD, il pourrait ainsi peut-être se dégager des relations entre les K_{DOC} et les propriétés de la MOD. En effet, même si ceci a été initié dans ces travaux, les échantillons naturels utilisés étaient en nombre trop faible et avec des propriétés trop peu différentes pour qu'il se dégage une corrélation marquée qui soit valable pour tous les échantillons.

Les échantillons du Bassin d'Arcachon ainsi que ceux utilisés pour les études avec la MOD d'origine algale ont permis de mettre en évidence l'importance du matériel organique récent pour les interactions avec les HAP. En effet, il a pu être observé une corrélation négative avec l'humification de la MOD et une corrélation positive avec l'intensité de la bande γ (macromolécules de type protéines) pour les échantillons d'eaux interstitielles. D'autre part, la MOD d'origine algale, pour laquelle cette bande est largement majoritaire, a montré des interactions plus fortes avec les HAP lourds qu'une eau

de rivière où cette bande n'est pas présente. Ces observations ont donc permis de souligner l'importance du matériel récent par rapport au caractère humifié et aromatique de la MOD et supportent également l'hypothèse avancée par Kopinke et al. (2001) sur le fait que les petites chaînes aliphatiques, grâce à leur flexibilité, pourraient interagir fortement avec les HAP.

Concernant les interactions substances pharmaceutiques – MOD, il a été suggéré que les interactions avec la carbamazépine sont principalement corrélées avec la taille des macromolécules alors que celles du diazépam seraient mieux corrélées à leur caractère hydrophobe. Ces conclusions pourraient éventuellement être confirmées ou infirmées grâce à l'étude des interactions envers des macromolécules fractionnées selon leur caractère hydrophobe ou leur taille. D'autre part, il serait intéressant d'étudier les interactions sur un plus grand nombre d'échantillons de MOD afin de pouvoir documenter plus précisément l'effet de l'origine et de la composition de la MOD sur les interactions avec les médicaments.

Il pourrait aussi être intéressant d'améliorer la SPME-GC-MS pour l'analyse des substances pharmaceutiques pour essayer de détecter leurs interactions avec la MOD, même si elles sont faibles. Il faudrait pour cela pouvoir diminuer la variabilité ainsi que les limites de détection, ce qui permettrait également de pouvoir l'appliquer à des milieux aqueux environnementaux. Pour cela, la spectrométrie de masse en tandem pourrait être utilisée ainsi que le couplage à la chromatographie liquide. D'autre part, la plupart des substances pharmaceutiques étant faiblement hydrophobes et pouvant être ionisées au pH environnemental, cette dernière méthode permettrait de pouvoir étendre l'étude des interactions à l'ensemble des médicaments. En parallèle, la dialyse pourrait être développée pour ces substances, car, même si les contaminants hydrophobes comme les HAP posent des problèmes d'adsorption, les substances plus hydrophiles devraient être moins problématiques et il serait alors possible de comparer les trois techniques pour la détermination des K_{DOC} .

Bibliographie

- Abrajano Jr, T.A., Yan, B., Song, J., Bopp, R., O'Malley, V., Heinrich, D.H. & Karl, K.T.** (2003) 9.13 High-Molecular-Weight Petrogenic and Pyrogenic Hydrocarbons in Aquatic Environments. In *Treatise on Geochemistry*, Vol. 9, pp. 1-50. Oxford: Pergamon.
- Action Nationale de Recherche et de Réduction des Rejets de Substances Dangereuses dans les Eaux**, Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de la Mer, Circulaire du 05/01/09 [en ligne], annexe 1, <<http://rsde.ineris.fr/>>, mise à jour du 28.05.2009 (consulté le 01.09.09)
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments – Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (Afssa-ANMV)**, Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2007 [en ligne], février 2009, <<http://www.anmv.afssa.fr/>>, mise à jour du 01/10/2009 (consulté le 01.10.09)
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afssaps)**, Analyse des ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France données 1997-2007 (29.04.2009), 9^{ème} édition [en ligne], <<http://www.afssaps.fr/Afssaps-media/Publications/Bilans>> (consulté le 01.09.09)
- Akkanen, J. & Kukkonen, J.V.K.** (2001) Effects of water hardness and dissolved organic material on bioavailability of selected organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(10), 2303-2308.
- Akkanen, J.** (2002) Does dissolved organic matter matter? - Implications for bioavailability of organic chemicals. In *Department of Biology*: University of Joensuu.
- Akkanen, J., Vogt, R. & Kukkonen, J.K.** (2004) Essential characteristics of natural dissolved organic matter affecting the sorption of hydrophobic organic contaminants. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* **66**(2), 171.
- Akkanen, J., Tuikka, A. & Kukkonen, J.V.K.** (2005a) Comparative Sorption and Desorption of Benzo[a]pyrene and 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl in Natural Lake Water Containing Dissolved Organic Matter. *Environmental Science and Technology* **39**(19), 7529-7534.
- Akkanen, J., Lyytikäinen, M., Tuikka, A. & Kukkonen, J.V.K.** (2005b) Dissolved organic matter in pore water of freshwater sediments: Effects of separation procedure on quantity, quality and functionality. *Chemosphere* **60**(11), 1608-1615.
- Albani, J.R.** (2001) *Absorption et fluorescence. Principes et applications*. Londres - Paris - New-York: Editions TEC&DOC.
- Baalousha, M., Motelica-Heino, M. & Coustumer, P.L.** (2006) Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **272**(1-2), 48-55.
- Bai, Y., Fengchang Wu, Congqiang Liu, Jianyang Guo, Pingqing Fu, Wen Li & Xing, B.** (2008) Interaction between carbamazepine and humic substances: a fluorescence spectroscopy study. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(1), 95-102.
- Bejarano, A.C., Chandler, G.T. & Decho, A.W.** (2005) Influence of natural dissolved organic matter (DOM) on acute and chronic toxicity of the pesticides chlorothalonil, chlorpyrifos and fipronil

- on the meiobenthic estuarine copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **321**(1), 43-57.
- Borisover, M., Laor, Y., Bukhanovsky, N. & Saadi, I.** (2006) Fluorescence-based evidence for adsorptive binding of pyrene to effluent dissolved organic matter. *Chemosphere* **65**(11), 1925-1934.
- Boti, V.I., Sakkas, V.A. & Albanis, T.A.** (2007) Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples: Part II. Solid-phase extraction from environmental natural waters. *Journal of Chromatography A* **1146**(2), 148-156.
- Brown, J.N. & Peake, B.M.** (2003) Determination of colloiddally-associated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fresh water using C18 solid phase extraction disks. *Analytica Chimica Acta* **486**(2), 159-169.
- Brun, G.L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P. & Lee, H.-B.** (2006) Pharmaceutically active compounds in Atlantic canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**(8), 2163-2176.
- Carlsson, C., Johansson, A.-K., Alvan, G., Bergman, K. & Kühler, T.** (2006) Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of The Total Environment* **364**(1-3), 67-87.
- Carmosini, N. & Lee, L.S.** (2009) Ciprofloxacin sorption by dissolved organic carbon from reference and bio-waste materials. *Chemosphere* **77**(6), 813-820.
- Carr, K.H., Coyle, G.T. & Kimerle, R.A.** (1997) Bioconcentration of [¹⁴C]butyl benzyl phthalate in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**(10), 2200-2203.
- Carter, C.W. & Suffet, I.S.** (1982) Binding of DDT to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology* **16**(11), 735-740.
- Chen, J.A., Li, X., Li, J., Cao, J., Qiu, Z., Zhao, Q., Xu, C. & Shu, W.** (2007) Degradation of environmental endocrine disruptor di-2-ethylhexyl phthalate by a newly discovered bacterium, *Microbacterium* sp. strain CQ0110Y. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(3), 676-682.
- Chin, Y.P., Aiken, G.R. & O'Loughlin, E.** (1994) Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology* **28**(11), 1853-1858.
- Chin, Y.P., Aiken, G.R. & Danielsen, K.M.** (1997) Binding of Pyrene to Aquatic and Commercial Humic Substances: The Role of Molecular Weight and Aromaticity. *Environmental Science and Technology* **31**(6), 1630-1635.
- Chiron, S., Minero, C. & Vione, D.** (2006) Photodegradation Processes of the Antiepileptic Drug Carbamazepine, Relevant To Estuarine Waters. *Environmental Science and Technology* **40**(19), 5977-5983.
- Cleuvers, M.** (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* **142**(3), 185-194.

- Comerton, A.M., Andrews, R.C., Bagley, D.M. & Yang, P.** (2007) Membrane adsorption of endocrine disrupting compounds and pharmaceutically active compounds. *Journal of Membrane Science* **303**(1-2), 267-277.
- Cornelissen, G., Pettersen, A., Broman, D., Mayer, P. & Breedveld, G.D.** (2008) Field testing of equilibrium passive samplers to determine freely dissolved native polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(3), 499-508.
- Costa, L.G., Giordano, G., Tagliaferri, S., Caglieri, A. & Mutti, A.** (2008) Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects. *Acta Biomed* **79**, 172-183.
- Danielsen, K.M., Chin, Y.P., Buterbaugh, J.S., Gustafson, T.L. & Traina, S.J.** (1995) Solubility enhancement and fluorescence quenching of pyrene by humic substances: the effect of dissolved oxygen on quenching processes. *Environmental Science and Technology* **29**, 2162-2165.
- David, A., Fenet, H. & Gomez, E.** (2009) Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations. *Marine Pollution Bulletin* **58**(7), 953-960.
- De Maagd, P.G.-J., ten Hulscher, D.T.E.M., van den Heuvel, H., Opperhuizen, A. & Sijm, D.T.H.M.** (1998) Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and Henry's law constants. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(2), 251-257.
- De Paolis, F. & Kukkonen, J.** (1997) Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere* **34**(8), 1693-1704.
- De Wit, C.A.** (2002) An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* **46**(5), 583-624.
- Dichtl, N., Rogge, S. & Bauerfeld, K.** (2007) Novel Strategies in Sewage Sludge Treatment. *CLEAN - Soil, Air, Water* **35**(5), 473-479.
- Doll, T.E., Frimmel, F.H., Kumke, M.U. & Ohlenbusch, G.** (1999) Interaction between natural organic matter (NOM) and polycyclic aromatic compounds (PAC) – comparison of fluorescence quenching and solid phase micro extraction (SPME). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **364**(4), 313-319.
- Doll, T.E. & Frimmel, F.H.** (2005) Photocatalytic degradation of carbamazepine, clofibric acid and iomeprol with P25 and Hombikat UV100 in the presence of natural organic matter (NOM) and other organic water constituents. *Water Research* **39**(2-3), 403-411.
- Durjava, M.K., ter Laak, T.L., Hermens, J.L.M. & Struijs, J.** (2007) Distribution of PAHs and PCBs to dissolved organic matter: High distribution coefficients with consequences for environmental fate modeling. *Chemosphere* **67**(5), 990-997.
- Duursma, E.K. & Dawson, R.** (1981) *Marine organic chemistry. Evolution, composition, interactions and chemistry of organic matter in seawater.* Amsterdam - Oxford - New York: Elsevier Oceanography Series.

- Europa, le portail de l'union européenne**, Directive-cadre dans le domaine de l'eau [en ligne], <http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/environment/l28002b_fr.htm>, mise à jour du 18.04.2008 (consulté le 01.09.09)
- Filella, M.** (2009) Freshwaters: which NOM matters? *Environmental Chemistry Letters* **7**(1), 21-35.
- Gauthier, T.D., Shane, E.C., Guerin, W.F., Seitz, W.R. & Grant, C.L.** (1986) Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology* **20**, 1162-1166.
- Gauthier, T.D., Seitz, W.R. & Grant, L.** (1987) Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on Pyrene Koc values. *Environmental Science and Technology* **21**(3), 243-248.
- Georgi, A. & Kopinke, F.-D.** (2002) Validation of a modified Flory-Huggins concept for description of hydrophobic organic compound sorption on dissolved humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(9), 1766-1774.
- Gielen, G.J.H.P., Heuvel, M.R.v.d., Clinton, P.W. & Greenfield, L.G.** (2009) Factors impacting on pharmaceutical leaching following sewage application to land. *Chemosphere* **74**(4), 537-542.
- Goldschmid, O.** (1954) Determination of phenolic hydroxyl content of lignin preparations by ultraviolet spectrophotometry. *Analytical Chemistry* **26**(9), 1421-1423.
- Gonçalves, C. & Alpendurada, M.F.** (2002) Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues in water samples: structure and efficiency. *Journal of Chromatography A* **963**(1-2), 19-26.
- Goupy, J.** (1988) *La Méthode des plans d'expériences: optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats*. Paris: Dunod.
- Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W. & Steinberg, C.** (1998) Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – a review-. *Chemosphere* **37**(7), 1335-1362.
- Harvey, H.** (2006) Sources and Cycling of Organic Matter in the Marine Water Column. In *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*, pp. 1-25.
- Hawthorne, S.B., Grabanski, C.B., Miller, D.J. & Kreitinger, J.P.** (2005) Solid-Phase Microextraction Measurement of Parent and Alkyl Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Milliliter Sediment Pore Water Samples and Determination of K_{DOC} Values. *Environmental Science and Technology* **39**(8), 2795-2803.
- He, Y., Yediler, A., Sun, T. & Kettrup, A.** (1995) Adsorption of fluoranthene on soil and lava: Effects of the organic carbon contents of adsorbents and temperature. *Chemosphere* **30**(1), 141.
- Hennion, M.-C.** (1999) Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **856**(1-2), 3-54.
- Herbert, B.E., Bertsch, P.M. & Novak, J.M.** (1993) Pyrene Sorption by water-soluble organic carbon. *Environmental Science and Technology* **27**(2), 398-403.
- Heringa, M.B. & Hermens, J.L.M.** (2003) Measurement of free concentrations using negligible depletion-solid phase microextraction (nd-SPME). *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**(9), 575-587.

- Hertkorn, N., Ruecker, C., Meringer, M., Gugisch, R., Frommberger, M., Perdue, E., Witt, M. & Schmitt-Kopplin, P.** (2007) High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**(5), 1311-1327.
- Hesketh, N., Jones, M.N. & Tipping, E.** (1996) The interaction of some pesticides and herbicides with humic substances. *Analytica Chimica Acta* **327**, 191-201.
- Huguet, A.** (2007) Mise au point de procédés membranaires pour l'étude de la matière organique dissoute en milieux côtiers. Thèse n°3504 : Université Bordeaux 1.
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.M. & Parlanti, E.** (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* **40**(6), 706-719.
- Hur, J. & Kim, G.** (2009) Comparison of the heterogeneity within bulk sediment humic substances from a stream and reservoir via selected operational descriptors. *Chemosphere* **75**(4), 483-490.
- INERIS** (Institut National de l'Environnement industriel et des RISques), fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques [en ligne], <http://www.ineris.fr/index.php?module=cms&action=getContent&id_heading_object=3>, dernière mise à jour le 10.07.09 (consulté le 01.09.09)
- INRS** (Institut National de Recherche et de Sécurité), bases de données [en ligne], fiches toxicologiques, <<http://www.inrs.fr/>>, mise à jour du 12.10.09 (consulté le 14.10.09)
- Jota, M.A.T. & Hassett, J.P.** (1991) Effects of environmental variables on binding of a PCB congener by dissolved humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* **10**, 483-491.
- Jürgens, M. D., Holthaus, K. I. E., Johnson, A. C., Smith, J. J. L., Hetheridge, M. & Williams, R. J.** (2002) The Potential for Estradiol and Ethinylestradiol Degradation in English Rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(3), 480-488.
- Khetan, S.K. & Collins, T.J.** (2007) Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chemical Reviews* **107**(6), 2319-2364.
- King, A.J., Readman, J.W. & Zhou, J.L.** (2004) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **523**(2), 259-267.
- Kopinke, F.-D., Georgi, A. & Mackenzie, K.** (2001) Sorption of Pyrene to Dissolved Humic Substances and Related Model Polymers. 1. Structure-Property Correlation. *Environmental Science and Technology* **35**(12), 2536-2542.
- Kuivikko, M., Kotiaho, T., Hartonen, K., Tanskanen, A. & Vähätalo, A. V.** (2007) Modeled Direct Photolytic Decomposition of Polybrominated Diphenyl Ethers in the Baltic Sea and the Atlantic Ocean. *Environmental Science and Technology* **41**, 7016-7021.
- Kukkonen, J., McCarthy, J.F. & Oikari, A.** (1990) Effects of XAD-8 fractions of dissolved organic carbon on the sorption and bioavailability of organic micropollutants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **19**(4), 551-557.

- Kukkonen, J. & Pellinen, J.** (1994) Binding of organic xenobiotics to dissolved organic macromolecules: comparison of analytical methods. *The Science of the Total Environment* **152**, 19-29.
- Kuramochi, H., Maeda, K. & Kawamoto, K.** (2007) Physicochemical properties of selected polybrominated diphenyl ethers and extension of the UNIFAC model to brominated aromatic compounds. *Chemosphere* **67**, 1858–1865.
- Lam, M.W. & Mabury, S.A.** (2005) Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* **67**(2), 177-188.
- Landrum, P.F., Nihart, S.R., Eadie, B.J. & Gardner, W.S.** (1984) Reverse-phase separation method for determining pollutant binding to Aldrich humic acid and dissolved organic carbon of natural waters. *Environmental Science and Technology* **18**(3), 187-192.
- Laor, Y. & Rebhun, M.** (1997) Complexation-Flocculation: A New Method To Determine Binding Coefficients of Organic Contaminants to Dissolved Humic Substances. *Environmental Science and Technology* **31**(12), 3558-3564.
- Laor, Y. & Rebhun, M.** (2002) Evidence for Nonlinear Binding of PAHs to Dissolved Humic Acids. *Environmental Science and Technology* **36**(5), 955-961.
- Lee, D.Y. & Farmer, W.J.** (1989) Dissolved organic matter interaction with napropamide and four other nonionic pesticides. *Journal of Environmental Quality* **18**, 468-474.
- Lepane, V., Leeben, A. & Malashenko, O.** (2004) Characterization of sediment pore-water dissolved organic matter of lakes by high-performance size exclusion chromatography. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* **66**(2), 185-194.
- Lertsirisopon, R., Soda, S., Sei, K. & Ike, M.** (2009) Abiotic degradation of four phthalic acid esters in aqueous phase under natural sunlight irradiation. *Journal of Environmental Sciences* **21**(3), 285-290.
- Li, N. & Lee, H.K.** (2000) Tandem-Cartridge Solid-Phase Extraction Followed by GC/MS Analysis for Measuring Partition Coefficients of Association of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Humic Acid. *Analytical Chemistry* **72**(21), 5272-5279.
- Li, X.-H., Cheng, X.-L., Zhang, R.-Z. & Yang, X.-D.** (2005) Quantum Chemical Study on Structure-activity Relationship of Several Kinds of Drugs. *Chinese Journal of Structural Chemistry* **24**(5), 513-520.
- Lin, A. Y.-C., Plumlee M. H. & Reinhard M.** (2006) Natural Attenuation of Pharmaceuticals and Alkylphenol Polyethoxylate Metabolites during River Transport: Photochemical and Biological Transformation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**(6), 1458–1464.
- Liu, Y., Peng, P., Li, X., Zhang, S. & Ren, M.** (2008) Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in water and suspended particulate matter from the Xijiang River, China. *Journal of Hazardous Materials* **152**, 40–47.
- Löffler, D., Rombke, J., Meller, M. & Ternes, T.A.** (2005) Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environmental Science and Technology* **39**(14), 5209-5218.

- Lord, H. & Pawliszyn, J.** (2000) Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* **885**(1-2), 153-193.
- Lou, T., Xie, H., Chen, G. & Gagne, J.-P.** (2006) Effects of photodegradation of dissolved organic matter on the binding of benzo(a)pyrene. *Chemosphere* **64**(7), 1204-1211.
- Lucio, M. & Schmitt-Kopplin, P.** (2006) Modeling the binding of triazine herbicides to humic substances using capillary electrophoresis. *Environmental Chemistry Letters* **4**(1), 15-21.
- Lüers, F. & ten Hulscher, T.E.M.** (1996) Temperature effect on the partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons between natural organic carbon and water. *Chemosphere* **33**(4), 643-657.
- Luo, Y., Pan, L. & Pawliszyn, J.** (1998) Determination of five benzodiazepines in aqueous solution and biological fluids using solid-phase microextraction with carbowax/DVB fiber coating. *Journal of Microcolumn Separations* **10**(2), 193-201.
- MacDonald, B.C., Lvin, S.J. & Patterson, H.** (1997) Correction of fluorescence inner filter effects and the partitioning of pyrene to dissolved organic carbon. *Analytica Chimica Acta* **338**(1-2), 155.
- Machatha, S.G. & Yalkowsky, S.H.** (2004) Estimation of the ethanol/water solubility profile from the octanol/water partition coefficient. *International Journal of Pharmaceutics* **286**(1-2), 111-115.
- Mader, B.T., Uwe-Goss, K. & Eisenreich, S.J.** (1997) Sorption of Nonionic, Hydrophobic Organic Chemicals to Mineral Surfaces. *Environmental Science and Technology* **31**(4), 1079-1086.
- Maskaoui, K., Hibberd, A. & Zhou, J.L.** (2007) Assessment of the Interaction between Aquatic Colloids and Pharmaceuticals Facilitated by Cross-Flow Ultrafiltration. *Environmental Science and Technology* **41**(23), 8038-8043.
- McCarthy, J.F. & Jimenez, B.D.** (1985) Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: binding and dissociation. *Environmental Science and Technology* **19**(11), 1072-1076.
- McCarthy, J.F., Roberson, L.E. & Burrus, L.W.** (1989) Association of benzo(a)pyrene with dissolved organic matter: prediction of K_{dom} from structural and chemical properties of the organic matter. *Chemosphere* **19**(12), 1911-1920.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B. & Santodonato, J.** (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology* **26**(7), 1278-1284.
- Minero, C., Lauri, V., Falletti, G., Maurino, V., Pelizzetti, E. & Vione, D.** (2007) Spectrophotometric Characterisation of Surface Lakewater Samples: Implications for the Quantification of Nitrate and the Properties of Dissolved Organic Matter. *Annali di Chimica* **97**(10), 1107-1116.
- Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de la Mer,** Réglementation REACH [en ligne], dossier de presse, Juin 2008, <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/DP_Reach_cle55acde.pdf> (consulté le 01.09.09)
- Moeder, M., Schrader, S., Winkler, M. & Popp, P.** (2000) Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples. *Journal of Chromatography A* **873**(1), 95-106.
- Nghiem, L.D., Schafer, A.I. & Elimelech, M.** (2006) Role of electrostatic interactions in the retention of pharmaceutically active contaminants by a loose nanofiltration membrane. *Journal of Membrane Science* **286**(1-2), 52-59.

- Nunes, B., Carvalho, F. & Guilhermino, L.** (2005) Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**, 413-419.
- Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T. & Oehlmann, J.** (2005) Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part I. The Antiepileptic Drug Carbamazepine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **49**(3), 353-361.
- Pan, B., Ghosh, S. & Xing, B.** (2007a) Nonideal Binding between Dissolved Humic Acids and Polyaromatic Hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* **41**(18), 6472-6478.
- Pan, B., Xing, B., Liu, W., Xing, G. & Tao, S.** (2007b) Investigating interactions of phenanthrene with dissolved organic matter: Limitations of Stern-Volmer plot. *Chemosphere* **69**(10), 1555-1562.
- Pan, B., Ning, P. & Xing, B.** (2008) Part IV—sorption of hydrophobic organic contaminants. *Environmental Science and Pollution Research* **15**(7), 554-564.
- Pan, B., Ning, P. & Xing, B.** (2009) Part V—sorption of pharmaceuticals and personal care products. *Environmental Science and Pollution Research* **16**(1), 106-116.
- Parker, C.A.** (1968) *Photoluminescence of solutions*. Amsterdam - London - New York: Elsevier Publishing Company.
- Parlanti, E., Worz, K., Geoffroy, L. & Lamotte, M.** (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* **31**(12), 1765-1781.
- Pawliszyn, J. & Pedersen-Bjergaard, S.** (2006) Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends. *Journal of Chromatographic Science* **44**(6), 291-307.
- Perdue, E.M. & Ritchie, J.D.** (2003) Dissolved organic matter in freshwaters. In *Surface and ground water, weathering and soils*, Vol. 5, pp. 273-318. Edited by J.I. Drever. Oxford: Elsevier-Pergamon.
- Perminova, I., Grechishcheva, N. & Petrosyan, V.** (1999) Relationships between Structure and Binding Affinity of Humic Substances for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relevance of Molecular Descriptors. *Environmental Science and Technology* **33**, 3781-3787.
- Poerschmann, J., Zhang, Z., Kopinke, F.D. & Pawliszyn, J.** (1997) Solid Phase Microextraction for Determining the Distribution of Chemicals in Aqueous Matrices. *Analytical Chemistry* **69**(4), 597-600.
- Porschmann, J., Kopinke, F.D. & Pawliszyn, J.** (1998) Solid-phase microextraction for determining the binding state of organic pollutants in contaminated water rich in humic organic matter. *Journal of Chromatography A* **816**, 159-167.
- Puchalski, M.M., Morra, M.J. & Von Wandruszka, R.** (1992) Fluorescence quenching of synthetic organic compounds by humic materials. *Environmental Science and Technology* **26**(9), 1787-1792.
- Raber, B. & Kögel-Knabner, I.** (1997) Influence of origin and properties of dissolved organic matter on the partition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *European Journal of Soil Science* **48**(3), 443-455.

- Rahman, F., Langford, K.H., Scrimshaw, M.D. & Lester, J.N.** (2001) Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *The Science of The Total Environment* **275**(1-3), 1-17.
- Schäfer, A.I., Mastrup, M. & Jensen, R.L.** (2002) Particle interactions and removal of trace contaminants from water and wastewaters. *Desalination* **147**(1-3), 243-250.
- Schlautman, M.A. & Morgan, J.J.** (1993) Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology* **27**(5), 961-969.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. & Negele, R.D.** (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* **68**(2), 141-150.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M. & Imboden, D.M.** (1993) *Environmental Organic Chemistry*. New York: J. Wiley & Sons.
- Senesi, N.** (1990) Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta* **232**, 77-106.
- Shirey, R.** (2007) Selecting the Appropriate SPME Fiber Coating – Effect of Analyte Molecular Weight and Polarity. In *The Reporter*, Vol. 28, pp. 13-15.
- Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E. & Soriano-Sierra, E.J.** (2005) Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* **58**(6), 715-733.
- Sila-On, W., Vardhanabhuti, N., Ongpipattanukul, B. & Kulvanich, P.** (2008) Influence of incorporation methods on partitioning behavior of lipophilic drugs into various phases of a parenteral lipid emulsion. *AAPS PharmSciTech*. **9**(2), 684-692.
- Simpson, M.J., Simpson, A.J. & Hatcher, P.G.** (2004) Noncovalent interactions between aromatic compounds and dissolved humic acid examined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(2), 355-362.
- Sinkkonen, S. & Paasivirta, J.** (2000) Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. *Chemosphere* **40**, 943-949.
- Soclo, H.H., Garrigues, P. & Ewald, M.** (2000) Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. *Marine Pollution Bulletin*, **40**(5), 387-396.
- Spohn, U., Paul, W., Alan, T. & Colin, P.** (2005) *Membrane Techniques | Dialysis and Reverse Osmosis*. pp. 515-524. Oxford: Elsevier.
- Srogi, K.** (2007) Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters* **5**(4), 169.
- Stein, K., Ramil, M., Fink, G., Sander, M. & Ternes, T.A.** (2008) Analysis and Sorption of Psychoactive Drugs onto Sediment. *Environmental Science and Technology* **42**(17), 6415-6423.
- Suffet, I.H., Jafvert, C.T., Kukkonen, J., Servos, M.R., Spacie, A., Williams, L.L. & Noblet, J.A.** (1994) *Synopsis of Discussion Session: Influences of Particulate and Dissolved Material on*

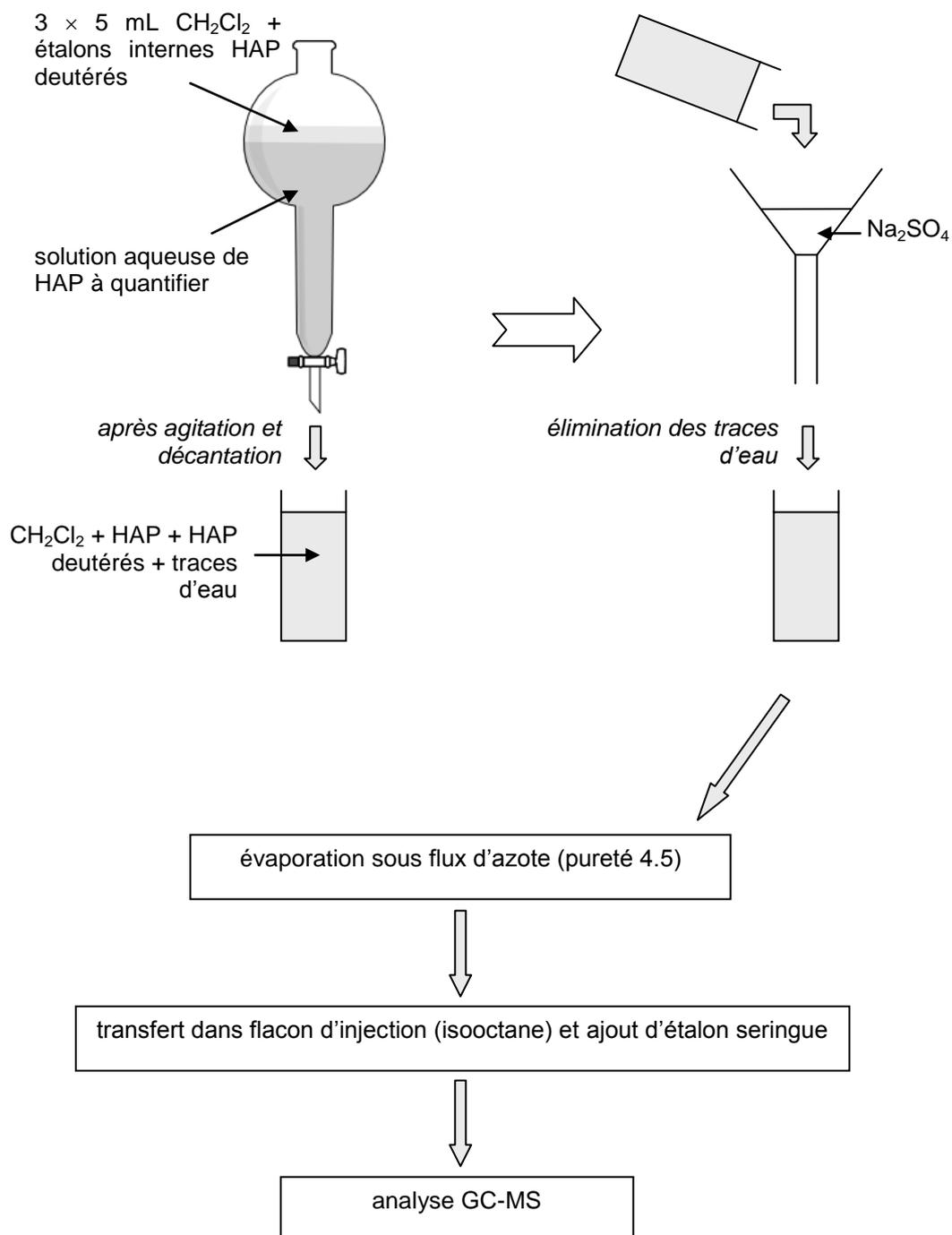
- the Bioavailability Of Organic Compounds. Chapitre 3 dans Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions.* Ann Arbor, MI: Lewis Publishers.
- Sun, W.L., Ni, J.R., Xu, N. & Sun, L.Y.** (2007) Fluorescence of sediment humic substance and its effect on the sorption of selected endocrine disruptors. *Chemosphere* **66**, 700-707.
- Supelco**, Polyethylene Glycol (PEG) SPME Fibers, Product information T407068 [en ligne], http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/t407068.Par.0001.File.tmp/t407068.pdf (consulté le 01.09.09)
- Ter Laak, T.L., Agbo, S.O., Barendregt, A. & Hermens, J.L.M.** (2006a) Freely Dissolved Concentrations of PAHs in Soil Pore Water: Measurements via Solid-Phase Extraction and Consequences for Soil Tests. *Environmental Science and Technology* **40**(4), 1307-1313.
- Ter Laak, T.L., Barendregt, A. & Hermens, J.L.M.** (2006b) Freely dissolved pore water concentrations and sorption coefficients of PAHs in spiked, aged, and field-contaminated soils. *Environmental Science and Technology* **40**(7), 2184-2190.
- Thacker, S.A., Tipping, E., Baker, A. & Gondar, D.** (2005) Development and application of functional assays for freshwater dissolved organic matter. *Water Research* **39**, 4559-4573.
- Thomsen, M., Dobel, S., Lassen, P., Carlsen, L., Bügel Mogensen, B. & Erik Hansen, P.** (2002) Reverse quantitative structure-activity relationship for modelling the sorption of esfenvalerate to dissolved organic matter: A multivariate approach. *Chemosphere* **49**(10), 1317-1325.
- Tolls, J.** (2001) Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environmental Science and Technology* **35**(17), 3397-3406.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay, C., Lorgeoux, C., Mouchel, J.-M., Buzier, R., Gilbin, R., Seidel, J.-L. & Elbaz-Poulichet, F.** (2007) Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of The Total Environment* **375**(1-3), 244-256.
- Valeur, B.** (2004) *Invitation à la fluorescence moléculaire.* Bruxelles: De Boeck.
- Voulvoulis, N.** (2006) Antifouling Paint Booster Biocides: Occurrence and Partitioning in Water and Sediments. In *Antifouling Paint Biocides*, pp. 155-170.
- Wang, C.X., Yediler, A., Peng, A. & Kettrup, A.** (1995) Photodegradation of phenanthrene in the presence of humic substances and hydrogen peroxide. *Chemosphere* **30**(3), 501-510.
- Watanabe, I. & Sakai, S.-i.** (2003) Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environment International* **29**(6), 665-682.
- Wijnja, H., Pignatello, J.J. & Malekani, K.** (2004) Formation of pi-pi Complexes between Phenanthrene and Model pi-Acceptor Humic Subunits. *Journal of Environmental Quality* **33**, 265-275.
- Woolgar, P.J. & Jones, K.C.** (1999) Studies on the Dissolution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Contaminated Materials Using a Novel Dialysis Tubing Experimental Method. *Environmental Science and Technology* **33**(12), 2118-2126.
- Yamamoto, H., Liljestrand, H.M., Shimizu, Y. & Morita, M.** (2003) Effects of Physical-Chemical Characteristics on the Sorption of Selected Endocrine Disruptors by Dissolved Organic Matter Surrogates. *Environmental Science and Technology* **37**(12), 2646-2657.

- Yates, L.M.I., Engerbretson, R.R., Haakenson, T.J. & Wandruszka, R.V.** (1997) Immobilization of aqueous pyrene by dissolved humic acid. *Analytica Chimica Acta* **356**, 295-300.
- Ying, G.-G.** (2006) Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International* **32**(3), 417-431.
- Zhang, Y-Z, Tang, C-Y., Song, X-F. & Li, F-D.** (2009) Behavior and fate of alkylphenols in surface water of the Jialu River, Henan Province, China. *Chemosphere* **77**, 559–565.
- Zimmermann, U., Skrivanek, T. & Löhmannsröben, H.-G.** (1999) Fluorescence quenching of polycyclic aromatic compounds by humic substances. Part 1. Methodology for the determination of sorption coefficients. *Journal of Environmental Monitoring* **1**(6), 525-532.

Annexes techniques

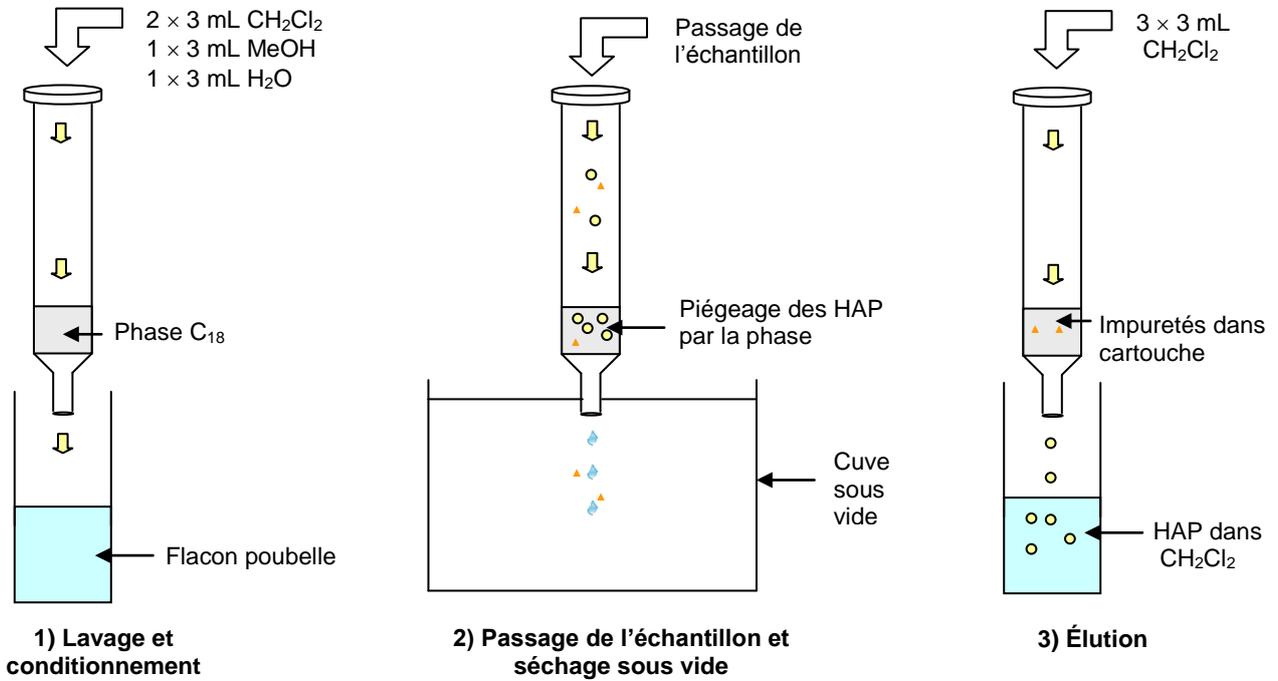
ANNEXE 1

Conditions d'extraction LLE des HAP



ANNEXE 2

Conditions d'extraction SPE des HAP



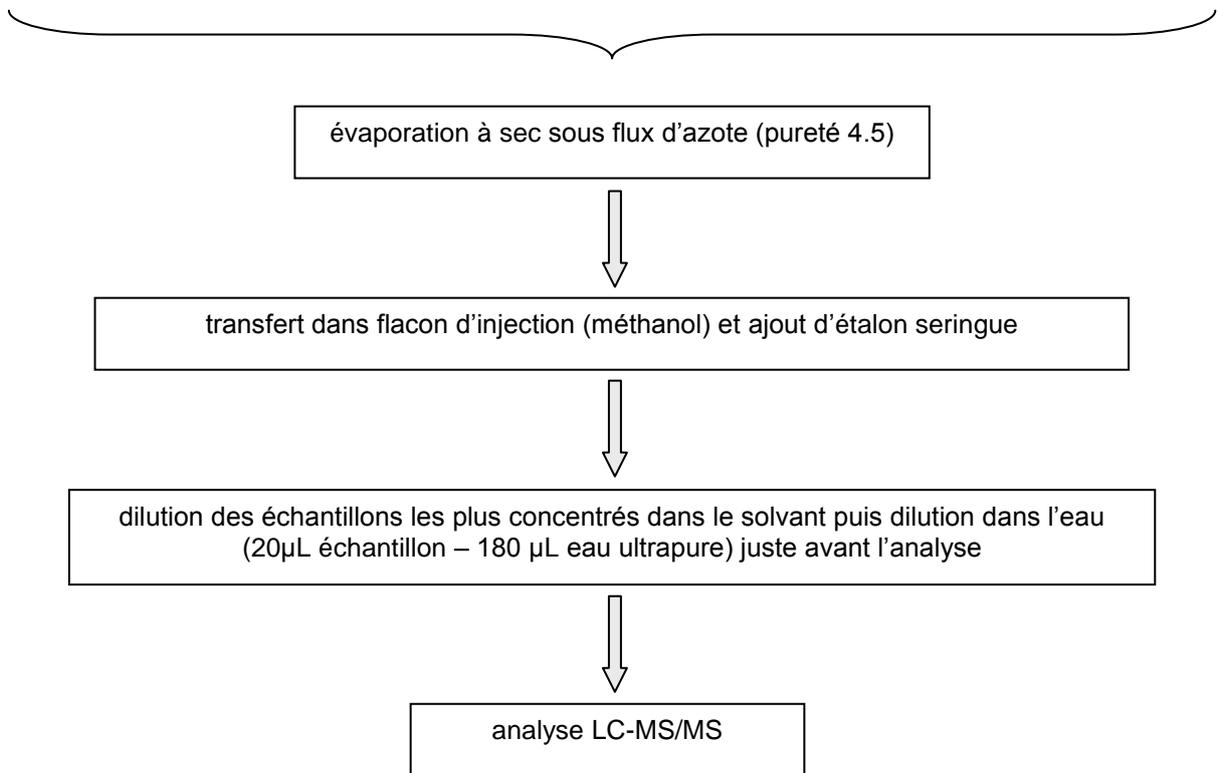
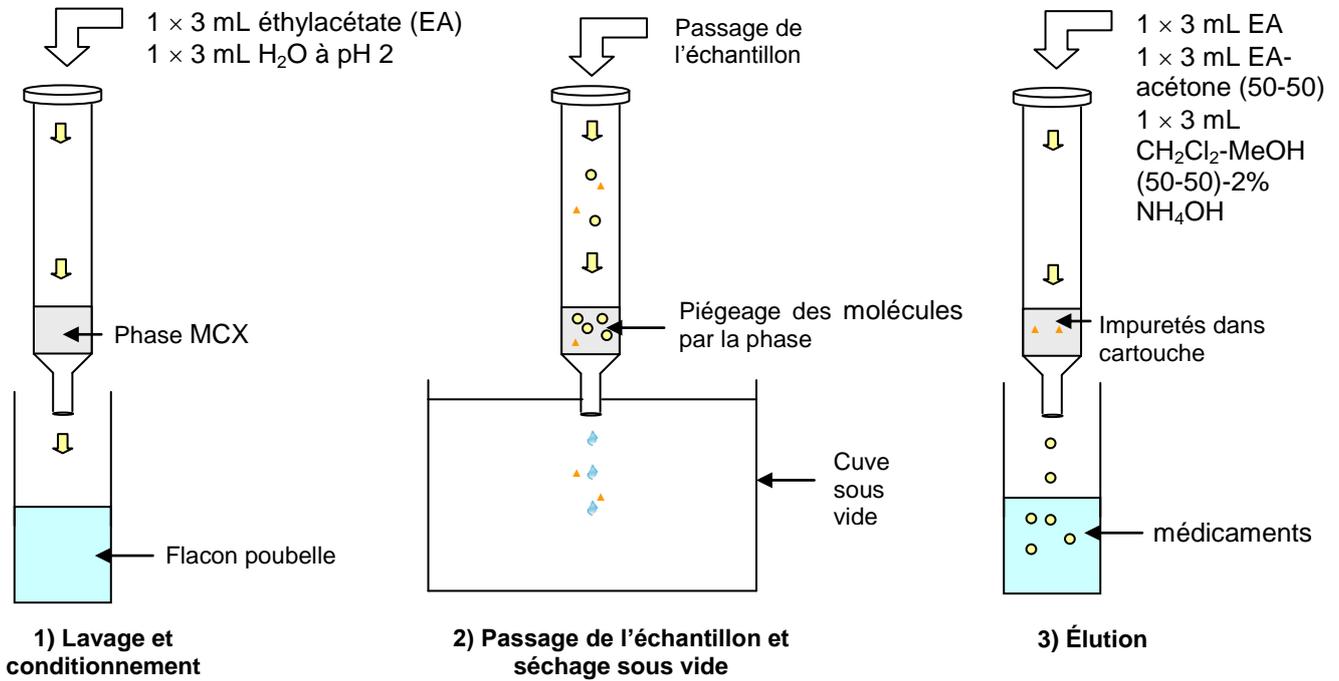
évaporation sous flux d'azote (pureté 4.5)

transfert dans flacon d'injection (isooctane) et ajout d'étalon seringue

analyse GC-MS

ANNEXE 3

Conditions d'extraction SPE des médicaments



ANNEXE 4

Conditions d'extraction SPME

Appareil : CombiPal (CTC Analytics)

Tête injection GC-MS : septum ou Merlin Microseal® (avec les fibres de gauge 23)

Volume des flacons : 10 mL

	Blanc	Echantillon
Temps de pré-incubation (s)	50	50
Température d'incubation (°C)	40	40
Vitesse de préagitation (tours.min ⁻¹)	250	250
Pénétration dans le flacon (mm)	22	22
Temps d'extraction	10 s	30 min
Pénétration dans l'injecteur (mm)	50	50
Temps de désorption (min)	30	30

ANNEXE 5

Conditions d'analyses par GC-MS

Chromatographe en phase gazeuse : Agilent 6890 Series

Spectromètre de masse : 5972

Colonne : HP-5MS (5 % phényl - méthylsiloxane) de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne et de 0,25 µm d'épaisseur de film.

Gaz vecteur : hélium de pureté 5.6

Débit : 1,3 ml.min⁻¹ en mode débit constant.

Composés analysés	HAP	médicaments		
Injecteur :				
- température	250 °C	250 °C		
- mode injection	splitless pulsé (30 psi - 1 min)	splitless pulsé (30 psi - 1 min)		
- débit de purge	55 mL.min ⁻¹ après 2 min	55 mL.min ⁻¹ après 2 min		
- économiseur de gaz	20 mL.min ⁻¹ après 15 min	20 mL.min ⁻¹ après 15 min		
Programmation du four :				
- température initiale	60 °C pendant 2 min	60 °C pendant 2 min		
- rampe 1	20 °C.min ⁻¹ jusqu'à 150 °C	20 °C.min ⁻¹ jusqu'à 280 °C		
- rampe 2	15 °C.min ⁻¹ jusqu'à 250 °C			
- rampe 3	10 °C.min ⁻¹ jusqu'à 310 °C			
- température finale	310 °C pendant 3 min	280 °C pendant 6 min		
- durée totale d'analyse	22,17 min	19 min		
Spectromètre de masse :				
- délai du solvant	4,5 min	4,5 min		
- ionisation	électronique	électronique		
- énergie	70 eV	70 eV		
- mode	SIM	SIM		
- voltage du multiplicateur d'électrons	2000 V	2000 V		
- temps d'accumulation	80 ms	90 ms		
- cycles/seconde	1,31	1,18		
	N	128	Carbamazépine	165
	N d8	136		193
	Acy	152		236
	Acy d8	160	Carbamazépine	203
	Ace	154	d10	246
	Ace d10	164	Diazépam	256
	Flu	166	Diazépam d5	261
	Flu d10	176	Imipramine	234
	Phe - An	178		
	Phe d10 - An d10	188		
	DBT	184		
	DBT d8	192		
	Fluo - Pyr	202		
	Fluo d10 - Pyr d10	212		
	BaA - Chrys	228		
	BaA d12 - Chrys d12	240		
	BbF + BkF - BeP - BaP - Per	252		
	BbF d12 + BkF d12 - BeP d12 - BaP d12 - Per d12	264		
	IP - BP	276		
	IP d12 - BP d12	288		
	DahA	278		
	DahA d14	292		

Les ions m/z en italique sont des ions de confirmation (non utilisés pour la quantification).

ANNEXE 6

Conditions d'analyses par GC-MS/MS

Appareil : Quattro micro GC 6890N Micromass MS Technologies de Waters

Colonne : HP-5MS (5 % phénylméthylsiloxane) de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre et de 0,25 µm d'épaisseur de film.

Gaz vecteur : hélium de pureté 6.0

Débit : 1,3 mL.min⁻¹ en mode débit constant.

Composés analysés	HAP			
Injecteur :				
- température	250 °C			
- mode injection	splitless			
- débit de purge	60 mL.min ⁻¹ après 1,5 min			
- économiseur de gaz	20 mL.min ⁻¹ après 10 min			
Programmation du four :				
- température initiale	60 °C pendant 2 min			
- rampe 1	20 °C.min ⁻¹ jusqu'à 150 °C			
- rampe 2	15 °C.min ⁻¹ jusqu'à 250 °C			
- rampe 3	10 °C.min ⁻¹ jusqu'à 310 °C			
- température finale	310 °C pendant 3 min			
- durée totale d'analyse	22,17 min			
Spectromètre de masse :				
- délai du solvant	4,5 min			
- ionisation	électronique			
- énergie	70 eV			
- mode	SIM			
- voltage du photomultiplicateur	580 V			
- temps d'accumulation	80 ms			
- cycles/seconde	1,25			
Ions m/z et transitions	N	128	128-128 (15)	<i>128-102 (15)</i>
m/z-m/z (énergies de	N d8	136	136-136 (10)	<i>136-108 (10)</i>
collision en eV)	Acy	152	152-152 (20)	<i>152-151 (21)</i>
recherchés :	Acy d8	160	160-160 (20)	<i>160-158 (15)</i>
	Ace	154	154-153 (20)	<i>154-152 (27)</i>
	Ace d10	164	164-162 (10)	<i>164-160 (25)</i>
	Flu	166	166-165 (20)	<i>166-164 (35)</i>
	Flu d10	176	176-174 (15)	<i>176-172 (25)</i>
	Phe - An	178	178-178 (14)	<i>178-152 (14)</i>
	Phe d10 - An d10	188	188-188 (18)	<i>188-160 (18)</i>
	DBT	184	184-184 (14)	<i>184-152 (14)</i>
	DBT d8	192	192-192 (15)	
	Fluo - Pyr	202	202-202 (20)	<i>202-200 (20)</i>
	Fluo d10 - Pyr d10	212	212-212 (20)	<i>212-208 (20)</i>
	BaA - Chrys	228	228-228 (20)	<i>228-226 (23)</i>
	BaA d12 - Chrys d12	240	240-240(18)	<i>240-236(18)</i>
	BbF + BkF - BeP - BaP - Per	252	252-252 (25)	<i>252-250 (30)</i>
	BbF d12 + BkF d12 - BeP d12 - BaP d12 - Per d12	264	264-264 (25)	<i>264-260 (25)</i>
	IP - BP	276	276-276 (25)	<i>276-274 (45)</i>
	IP d12 - BP d12	288	288-288 (25)	<i>288-284 (30)</i>
	DahA	278	278-278 (25)	<i>278-276 (27)</i>
	DahA d14	292	292-292 (25)	<i>292-288 (30)</i>

Les transitions en italique sont des transitions de confirmation (non utilisées pour la quantification).

ANNEXE 7

Conditions d'analyses par LC-MS/MS

Appareil : Agilent 1200 Series 6410 Triple Quad LC/MS

Colonne : Zorbax SB C18, 50 × 2,1 mm ; 1,8 µm

Générateur d'azote : Mistral (Schmidlin-DBS AG)

Composition de la phase mobile : - solvant voie A : eau ultrapure, 0,1 % acide formique
- solvant voie B : méthanol, 0,1 % acide formique

Débit de la phase mobile : 0,5 mL.min⁻¹

Volume d'injection : 5 µL

Gradient d'élution :		Voie B (%)	
- 0-12 min		0	
- 12-13 min		65	
- 13-15 min		100	
- 15-20 min		0	
- durée totale d'analyse		20 min	

Spectromètre de masse :			
- mode d'ionisation		électronébulisation	
- polarité		positive	
- mode d'acquisition		MRM	
- potentiel du capillaire		3000 V	
- température du gaz		300 °C	
- débit du gaz		11 mL.min ⁻¹	
- pression nébulisateur		30 psi	
- temps d'accumulation		10 ms	

Transitions m/z-m/z (énergies du fragmenteur ; énergies de collision, en eV) observées :			
	carbamazepine	237-194 (130 ; 20)	<i>237-192 (120 ; 20)</i>
	diazépam	285-154 (120 ; 28)	<i>285-256.7 (120 ; 22)</i>
	diazépam d5	290-154 (120 ; 30)	
	imipramine d4	285-85.7 (120 ; 22)	

Les transitions en italique sont des transitions de confirmation (non utilisées pour la quantification).

ANNEXE 8

HAP natifs et deutérés utilisés

HAP	Pureté (%)	Fournisseur	m/z	Étalons internes	Pureté isotopique (%)	Fournisseur	m/z
Naphtalène (N)	99+	Aldrich	128	N d8	98	EGA-Chemie	136
Acénaphthylène (Acy)	99+	Aldrich	152	Acy d8	98	Promochem (CIL)	160
Acénaphène (Ace)	99	Aldrich	154	Ace d10	99	Promochem (CIL)	164
Fluorène (Flu)	99+	Aldrich	166	Flu d10	98	Promochem (CIL)	176
Dibenzothiophène (DBT)	99	Acros	184	DBT d8	99	MSD Isotopes	192
Phénanthrène (Phe)	99	Aldrich	178	Phe d10	98	CIL	188
Anthracène (An)	98	Labosi	178	An d10	98	CIL	188
Fluoranthène (Fluo)	99	Aldrich	202	Fluo d10	99.2	MSD Isotopes	212
Pyrène (Pyr)	99+	Fluka	202	Pyr d10	98	CIL	212
Benzo[a]anthracène (BaA)	99	Aldrich	228	BaA d12	98	Promochem (CIL)	240
Chrysène (Chrys)	99+	Fluka	228	Chrys d12	98	MSD Isotopes	240
Benzo[b]fluoranthène (BbF)	99	Aldrich	252	BbF d12	98	CIL	264
Benzo[k]fluoranthène (BkF)	98	Aldrich	252	BkF d12	98	Promochem (CIL)	264
Benzo[e]pyrène (BeP)	99	Aldrich	252	BeP d12	98	CIL	264
Benzo[a]pyrène (BaP)	97	Aldrich	252	BaP d12	98	CIL	264
Pérylène (Per)	99+	Aldrich	252	Per d12	99.5	MSD Isotopes	264
Indeno[1,2,3-cd]pyrène (IP)	99	Promochem	276	IP d12	98+	Promochem (CIL)	288
Benzo[g,h,i]pérylène (BP)	99.7	Promochem	276	BP d12	98	CIL	288
Dibenz[a,h]anthracène (DahA)	97	Aldrich	278	DahA d14	98	Promochem (CIL)	292

ANNEXE 9

Conditions expérimentales de la spectrofluorimétrie

Appareil : Fluorolog FL3-22 (Jobin-Yvon)

Temps d'intégration : 0,5 s

Incrément longueurs d'onde d'émission : 1 nm

Bandes passantes d'excitation et d'émission : 4 nm

Spectrofluorimétrie tridimensionnelle : accumulation de 17 spectres 2D :

- $\lambda_{\text{excitation}}$ de 250 à 410 nm, incrément de 10 nm
- $\lambda_{\text{émission}}$ de 260 à 700 nm