



HAL
open science

Mise au point de méthodes pour l'analyse de substances mentionnées dans le règlement Européen REACh et potentiellement présentes dans les process et produits de la filière cuir : formaldéhyde-fluorocarbonés

Caroline Bourgeois

► To cite this version:

Caroline Bourgeois. Mise au point de méthodes pour l'analyse de substances mentionnées dans le règlement Européen REACh et potentiellement présentes dans les process et produits de la filière cuir : formaldéhyde-fluorocarbonés. Chimie analytique. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1011 . tel-03942578

HAL Id: tel-03942578

<https://theses.hal.science/tel-03942578v1>

Submitted on 17 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2022LYSE1011

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Ecole Doctorale de Chimie de Lyon

Spécialité de doctorat : Chimie Analytique

Soutenue publiquement le 07/02/2022, par :
Caroline Bourgeois

Mise au point de méthodes pour l'analyse de substances mentionnées dans le règlement Européen REACh et potentiellement présentes dans les process et produits de la filière cuir. Formaldéhyde-fluorocarbonés

Devant le jury composé de :

Madame Anne PERWUELZ, Professeur, ENSAIT, Roubaix	Rapporteur
Madame Myriam BONOSE, Maître de conférences, Université Paris-Saclay	Rapporteur
Monsieur Joseph CHAMIEH, Maître de conférences, Université Montpellier	Examineur
Monsieur Jérôme RANDON, Professeur, Université Lyon 1	Examineur
Madame Claire DEMESMAY, Professeur, Université Lyon 1	Directrice de thèse
Monsieur Jean-Claude CANNOT, Directeur Technique Normalisation & Certification, CTC	Invité
Monsieur Nicolas BLANC, Docteur chimie analytique, CTC, Lyon	Examineur

Résumé

Le procédé de fabrication du cuir nécessite l'ajout de produits chimiques pour transformer la peau brute en produit fini imputrescible adapté aux cahiers des charges de son utilisation. Afin d'assurer la santé humaine et le respect de l'environnement, différentes réglementations encadrent l'utilisation de ces produits chimiques. Il est donc nécessaire de développer des méthodes pour avoir une quantification exacte de ces substances dans le cuir, une matrice complexe. Dans ce travail, deux exemples sont présentés : le formaldéhyde et les composés poly et perfluorés (fluorocarbonés).

Le formaldéhyde doté d'excellentes propriétés de réticulation est utilisé dans la synthèse de résines de retannage. Cependant, dans les produits finis, le formaldéhyde peut être responsable de réactions allergiques. Appartenant à la liste des substances extrêmement préoccupantes candidates à l'annexe XIV de REACh, le formaldéhyde est donc soumis à des réglementations s'il est présent à plus de 0,1% dans l'article final. Depuis Mai 2021, une teneur limite en formaldéhyde de 30 mg/kg est fixée pour les matériaux en cuir ou en textile dans les jouets. L'évaluation sur une très large gamme de cuirs de la norme ISO 17226-1 de 2019, actuellement en vigueur pour la quantification du formaldéhyde dans les cuirs, a permis de montrer qu'elle présente un biais conduisant à une surestimation des teneurs en formaldéhyde. La première partie de ce projet de thèse a permis d'identifier les biais responsables de cette surestimation et de proposer des modifications garantissant une exactitude lors de la quantification du formaldéhyde, quel que soit le procédé de fabrication du cuir.

D'autre part, les composés poly et perfluorés sont mis en œuvre dans les étapes de finition des cuirs en raison de leurs propriétés répulsives envers le gras et l'eau. Cependant, certains de ces composés présentent des dangers et s'éliminent très lentement dans l'environnement. Par exemple, l'annexe 1 du règlement européen n°850/2004 concernant les Polluants Organiques Persistants définit pour l'acide perfluorooctanesulfonique (PFOS) et ses dérivés une limite de 1 µg/m² pour les textiles et pour les matériaux enduits. La deuxième partie de ce projet de recherche a eu pour objectif d'élargir la gamme de composés poly et perfluorés analysés dans les cuirs et de diminuer leurs limites de quantification afin de répondre aux réglementations. Une étude complète de la quantification de ces composés par LC-MS/MS est proposée. L'étude des effets de matrice dans les extraits de cuir a montré que ces effets sont fortement dépendants des processus de fabrication mis en œuvre. Si l'ajout d'une étape d'extraction sur phase solide permet de s'affranchir de tels effets dans certaines matrices, elle n'est pas toujours suffisante pour les éliminer totalement. Seul l'ajout d'étalons internes marqués pour chaque composé permet de s'affranchir de ces effets afin de garantir une quantification exacte des composés poly et perfluorés dans les cuirs.

Mots clés : formaldéhyde, composés poly et perfluorés, cuir, chromatographie en phase liquide, spectrométrie de masse, dérivation, DNPH, extraction sur phase solide

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé dans le cadre d'un contrat CIFRE entre le Centre Technique Cuir, Chaussure, Maroquinerie (CTC) et l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de l'Université Claude Bernard de Lyon 1, avec l'accompagnement financier de l'Agence Nationale pour la Recherche Technologique (ANRT).

Je remercie Monsieur Yves MORIN (ancien Directeur Général) et Monsieur Jean-Claude CANNOT (Directeur Technique Normalisation & Certification) de m'avoir accueillie à CTC et d'avoir permis la réalisation de ce projet.

Je tiens également à remercier Madame Karine LIO, Directrice adjointe expertises et développements de méthodes de m'avoir intégrée au sein de son équipe et de m'avoir permis de découvrir la normalisation.

Je souhaite remercier sincèrement, Monsieur Nicolas BLANC, Docteur en chimie analytique, mon tuteur scientifique au CTC, de m'avoir aidée tout au long de ce projet et d'avoir partagé son expérience et ses idées. Un grand merci de m'avoir fait découvrir l'intérieur des appareils et les enjeux de la chimie analytique.

J'aimerais tout particulièrement remercier Madame Claire DEMESMAY, ma Directrice de thèse, de m'avoir guidée dans la réalisation de ce projet. Un grand merci pour les précieux conseils, pour la mise en œuvre du montage de dérivation post colonne et pour l'aide et le soutien dans la rédaction de l'article scientifique et du manuscrit.

Je suis sensible à l'honneur que me font Madame Anne PERWUELZ, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Arts et Industries Textiles de Roubaix, et Madame Myriam BONOSE, Maître de Conférences à l'université de Paris Sud, en acceptant de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Jérôme RANDON, Professeur à l'Université de Lyon, et à Monsieur Joseph CHAMIEH, Maître de conférences à l'Université de Montpellier, d'avoir accepté de participer au jury lors de ma soutenance de thèse.

J'aimerais également remercier l'ensemble des personnes que j'ai rencontrées pendant ces trois années.

Je tiens à remercier mes autres collègues R&D, Madame Mathilde FONTAINE et Madame Sophie CHENAVAS pour leur bienveillance et leur aide.

Je remercie tout le laboratoire et notamment Monsieur Éric DELOM (Responsable du laboratoire d'analyses chimiques), Monsieur Aymeric LALLEMAND (Superviseur Laboratoire) et Madame Virginie SAVE-CARLE (Cheffe de la Production) de m'avoir aidée et expliqué les enjeux des analyses en routine.

Je souhaiterais remercier le département cuir et tannerie sous la responsabilité de Monsieur Thierry PONCET. Merci aux Consultants Cuir et Finition, Madame Nathalie HUSTACHE MATHIEU, Monsieur

Lionel LAUTESSE, de m'avoir fait découvrir le cuir. Je remercie Monsieur Maxime JOUINEAU, Consultant Cuir pour son aide et pour la fabrication de cuirs adaptés à mes différentes problématiques. Je remercie également, Madame Marie-Françoise COQUARD et Madame Agathe CHAUPLANNAZ, responsables du centre de documentation, pour leur accueil et leurs conseils.

Je remercie sincèrement l'ensemble des collègues CTC pour leur accueil.

Un grand merci à mes amis pour leurs encouragements et les très bons moments passés ensemble.

Enfin un immense merci à ma famille pour leur soutien quotidien et pour tout le bonheur qu'il m'apporte.

Merci à tous.

Sommaire

Résumé.....	2
Remerciements	3
Sommaire	5
Liste des abréviations.....	10
Introduction générale.....	14
Chapitre 1 Le contexte	15
1 CTC Groupe.....	15
1.1 Son histoire.....	15
1.2 Son emplacement.....	15
1.3 Son financement	15
1.4 Ses secteurs d'activités.....	16
2 Le procédé de fabrication du cuir : un procédé complexe impliquant de nombreux composés chimiques	16
2.1 La peau brute.....	17
2.2 Conservation de la peau brute	18
2.3 Préparation de la peau brute : le travail de rivière	18
2.3.1 La trempe.....	18
2.3.2 L'épilage pelanage	19
2.3.3 L'écharnage	19
2.3.4 Le déchaulage	19
2.3.5 Le confitage	19
2.3.6 Le picklage	20
2.4 Le tannage	20
2.5 Le post tannage ou corroyage	20
2.5.1 Le retannage.....	20
2.5.2 La teinture	21
2.5.3 La nourriture.....	21

2.6	Le finissage	22
2.7	Conclusion	22
3	Cuirs et réglementations	24
3.1	Formaldéhyde.....	24
3.2	Composés per et polyfluorés (PFCs).....	25
4	Conclusion	26
Chapitre 2 : Analyse du formaldéhyde dans le cuir.....		27
1	Introduction : le formaldéhyde dans le procédé de fabrication du cuir	27
2	Bibliographies techniques et références normatives sur la quantification du formaldéhyde dans les cuirs.....	28
2.1	Détermination du formaldéhyde total par hydrolyse acide.....	28
2.2	Détermination du formaldéhyde dégagé par le cuir en bouteille scellée.....	28
2.2.1	Norme VDA-275 : dérivation à l'acétylacétone.....	29
2.2.2	Norme ISO 17226-3 : dérivation au DNPH	30
2.3	Détermination du formaldéhyde libre et du formaldéhyde libéré lors d'une extraction aqueuse	30
2.3.1	Norme ISO 17226-2 : dérivation à l'acétylacétone	31
2.3.2	Norme ISO 17226-1 2019 : dérivation au DNPH	33
2.3.3	Innovation.....	35
3	Vers une modification de la norme ISO 17226-1 : 2019	38
3.1	Les paramètres et limites de la norme ISO 17226-1 2019	38
3.2	Enjeux de la modification de la norme ISO 17226-1 : 2019	40
3.3	Résultats expérimentaux pour la recherche de nouvelles conditions de dérivation.....	40
Towards a Non-Biased Formaldehyde Quantification in Leather: New Derivatization Conditions before HPLC Analysis of 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivatives		42
1.	Introduction.....	42
2.	Results and Discussion.....	45
2.1.	Analysis of Samples Based on EN ISO 17226-1 Standard Conditions: Influence of the Time Frame between Derivatization and Analysis on the Formaldehyde Content	45

2.2. Quantification of Formaldehyde in Dicyandiamide and Melamine Resin Pseudo-Extracts ..	47
2.3. New Derivatization Conditions for the Analysis of Formaldehyde in Dicyandiamide Resin .	48
2.4. Determination of Formaldehyde in Leathers by New Derivatization Conditions.....	51
2.5. Another Alternative to the Standard: Analysis by FIA with On-Line Acetylacetone Derivatization.....	52
3. Experimental Procedures.....	54
3.1. Leather Samples and Resin Samples	54
3.2. Chemicals.....	54
3.3. Sample Preparation and Extraction (Leather Extracts or Resin Extracts).....	55
3.4. DNPH Derivatization and Chromatographic Separation of DNPH Derivatives	55
3.5. Flow Injection Analysis (FIA) with On-Line Derivatization with Acetylacetone	56
4. Conclusion.....	56
References	57
3.4 Comparaison de la norme ISO 17226-1 2019 et de la nouvelle méthode sur plusieurs échantillons de cuirs.....	59
3.5 Comparaison de la norme ISO 17226-1 2019 et de la nouvelle méthode avec plusieurs laboratoires et sur plusieurs échantillons de cuirs	60
3.5.1 Comparaison des teneurs en formaldéhyde obtenues avec la norme ISO 17226-1:2019 après 0 et après 3h de dérivation.....	60
3.5.2 Corrélation entre les teneurs en formaldéhyde obtenues avec la norme ISO 17226-1:2019 vs celles obtenues avec la nouvelle méthode.....	62
3.5.3 Teneurs en formaldéhyde obtenues avec la nouvelle méthode et influence de l'attente sur le passeur63	
3.6 Essais inter laboratoires.....	64
3.7 Conclusion : norme ISO 17226-1 :2021	66
Chapitre 3 : Les composés poly et perfluorés	67
1 Introduction : les PFCs et leurs caractéristiques physico-chimiques	67
2 Bibliographies techniques sur la quantification des PFCs.....	71
2.1 Extraction.....	71
2.2 Purification et/ou préconcentration	73

2.3	Séparation	81
2.3.1	Chromatographie en phase gazeuse.....	82
2.3.2	Chromatographie en phase liquide.....	83
2.4	Détection	85
2.5	Les interférences	88
2.6	Conclusion	90
3	Analyse des PFCs dans le cuir.....	90
3.1	Méthode actuellement utilisée au CTC	90
3.2	But	91
3.3	Optimisation de la séparation et de la détection des PFCs	91
3.3.1	Optimisation de la séparation chromatographique.....	91
3.3.2	Optimisation du gradient	92
3.3.3	Optimisation de paramètres du spectromètre de masse	94
3.3.4	Recherche de contamination du système.....	96
3.4	Une étape de purification nécessaire ?.....	96
3.4.1	Limite de quantification à atteindre.....	97
3.4.2	Dopage d'extraits de cuirs.....	98
3.5	Etape de purification SPE WAX.....	104
3.5.1	Répétabilité de la SPE WAX manuelle	105
3.5.2	Optimisation de la purification SPE WAX	105
3.5.3	Evaluation de la SPE WAX sur des extraits de cuirs.....	108
3.6	Changement de solvant d'extraction	112
3.7	Ajout d'étalons internes	116
3.8	Conclusion	122
Chapitre 4 : Matériels et Méthodes		123
1	Séparation chromatographique.....	123
2	Optimisation des paramètres du spectromètre de masse	123
3	Quantification	124
4	Echantillons de cuirs	126

5 Purification SPE WAX	130
Conclusion Générale	132
Références bibliographiques.....	134
Liste des tableaux.....	142
Liste des figures.....	143
Annexes.....	150
Annexe 1 : Produits commerciaux utilisés pour la fabrication des cuirs.....	150
Annexe 2 : Mode opératoire des cuirs pour l'étude du formaldéhyde.....	152
Annexe 3 : Norme ISO 23702-1 2018.....	154
Annexe 4 : Mode opératoire des cuirs pour l'étude des PFCs	155
Annexe 5 : chromatogramme obtenu en SIM d'une impureté présente dans le méthanol.....	159

Liste des abréviations

10:2 FTOH : 10:2 télomère fluoré alcool

10:2 FTS : 10:2 télomère fluoré sulfonate

4:2 FTOH : 4:2 télomère fluoré alcool

4:2 FTS : 4:2 télomère fluoré sulfonate

4HPFUnA : acide 2H,2H,3H,3H-heptadecafluoroundecanoïque

6:2 FTOH : 6:2 télomère fluoré alcool

6:2 FTS : 6:2 télomère fluoré sulfonate

7HPFHpA : acide 7H-dodecafluoroheptanoïque

8:2 FTOH : 8:2 télomère fluoré alcool

8:2 FTS : 8:2 télomère fluoré sulfonate

AA : acide acétique

Ac : acétate

AcAm : acétate d'ammonium

ACN : acétonitrile

AF : acide formique

APCI : source d'ionisation chimique à pression atmosphérique

B2S : Bureau de Style

C18 : phase stationnaire octadécylsilane

C8 : phase stationnaire octylsilane

CE : Conformité Européenne

CIDIC : Comité Interprofessionnel de Développement des Industries du Cuir

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CPDE : Comité Professionnel de Développement Economique

CTC : Centre Technique du Cuir

d9-N-EtFOSE : 2-(N-ethyl-d₅-perfluoro-1-octanesulfonamido)ethan-d₄-ol

d-N-MeFOSA : N-methyl-d₃-perfluorooctanesulfonamide

DAD : détecteur à barrette de diodes

DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes

DNPH : 2,4-dinitrophenylhydrazine

d_p : diamètre de particules

ECHA : Agence européenne des produits chimiques

EMR : Enhanced Matrix Removal (élimination améliorée de la matrice)

EN : European Norm (norme européenne)

ESI : électrospray

FIA : Flow Injection analysis (Analyse par injection en flux continu)

FOSAs : perfluoro-octanesulfonamides

FOSEs : perfluoro-octanesulfonamido éthanol

FTAs : télomères fluorés acrylates

FTOHs : télomères fluorés alcools

FTS : télomères fluorés sulfonates

GC : Gas Chromatography (chromatographie en phase gazeuse)

GCB : carbone noir graphité

H₂O : eau

HLB : Hydrophilic-lipophilic balanced (équilibre hydrophile-lipophile)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance)

ISO : International Organization for Standardization (Organisation internationale de normalisation)

K_a : constante d'acidité

LC : chromatographie en phase liquide

LOD : Limite de Détection

Log P ou Log K_{ow} : mesure de la solubilité différentielle de deux composés chimiques dans l'eau et l'octanol

LQ ou LOQ : Limite de Quantification

M2-8:2 FTS : sodium 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro-[1,2-¹³C₂]decanesulfonate

M2PFTeA : acide perfluoro-n-[1,2-¹³C₂]tétradécanoïque

M8FOSA : perfluoro-1-[¹³C₈]octanesulfonamide

Me-PFOA : méthyl perfluorooctanoate

MeOH : méthanol

MFBET : 2-Perfluorobutyl-[1,1,2,2-2H₄]-ethanol

MgSO₄ : sulfate de magnésium

MPFBA : acide perfluoro-n-[1,2,3,4-¹³C₄]butanoïque

MPFDoA : acide perfluoro-n-[1,2-¹³C₂]dodécanoïque

MPFOA : PFOA marqué au carbone 13 (acide perfluoro-n-[1,2,3,4-¹³C₄]octanoïque)

MPFOS : PFOS marqué au carbone 13 (sodium perfluoro-1-[1,2,3,4-¹³C₄]octanesulfonate)

MRM : Multiple Reaction Monitoring (surveillance de réactions multiples)

MS : spectromètre de masse

MS/MS : spectromètre de masse en tandem

MTBE : Méthyl Tert-Butyl Ether

MWCNT : nanotubes de carbone à parois multiples
m/z : rapport masse sur charge
N-EtFOSA : N-ethylperfluorooctanesulfonamide
N-EtFOSE : 2-(N-ethylperfluoro-1-octanesulfonamido)-ethanol
N-MeFOSA : N-methylperfluorooctanesulfonamide
N-MeFOSE : 2-(N-methylperfluoro-1-octanesulfonamido)-ethanol
Naph-D₈ : naphthalène-D₈
NF : Norme Française
NH₄OH : ammoniaque
PET : transfert d'électrons photo-induit
PF-3,7-DMOA : acide perfluoro-3,7-diméthyl-octanoïque
PFBS : acide perfluorobutane sulfonique
PFCs : Per- and polyFluorinated Compounds (composés per et polyfluorés)
PFCAs : acides perfluorés carboxyliques
PFASs : acides perfluorés sulfoniques
PFBA : acide perfluorobutanoïque
PFDA : acide perfluorodécanoïque
PFDoA : acide perfluorododécanoïque
PFDS : acide perfluorodécane sulfonique
PFHpA : acide perfluoroheptanoïque
PFHpS : acide perfluoroheptane sulfonique
PFHxA : acide perfluorohéxanoïque
PFHxS : acide perfluorohéxane sulfonique
PFNA : acide perfluorononanoïque
PFNS : acide perfluorononanesulfonique
PFOA : acide perfluorooctanoïque
PFOS : acide perfluorooctanesulfonique
PFOSA : perfluorooctane sulfonamide
PFPeA : acide perfluoropentanoïque
PFTeA : acide perfluorotétradécanoïque
PFTrA : acide perfluorotridecanoïque
PFUnA : acide perfluoroundécanoïque
pH : potentiel Hydrogène
pKa : valeur négative du logarithme de la constante d'acidité
POP : Polluants Organiques Persistants

PSA : amines primaires et secondaires

PTFE : polytétrafluoroéthylène

QC : point de contrôle

QuEChERS : Quick (rapide), Easy (facile), Cheap (peu cher), Effective (efficace), Rugged (robuste) and Safe (sûr)

R² : coefficient de détermination

REACH : Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals (Enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques)

S²⁻ : ion sulfure

SIM : Single Ion Monitoring (surveillance d'ions uniques)

SPE : Solid Phase Extraction (extraction sur phase solide)

t : temps

TBA : hydrogénosulfate de Tétrabutylammonium

TIC : Total Ion Chromatogram (courant ionique total)

t_m : temps mort de la colonne

TQ : triple quadripôle

t_R : temps de rétention

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance)

UV : ultraviolet

VDA : Verband der Automobilindustrie (norme allemande)

WAX : Weak Anion-eXchange (échange d'anions faible)

Introduction générale

Le cuir intervient dans la fabrication de nombreux biens de consommation. Cette matière noble résulte de la transformation de la peau brute des animaux après un long procédé pour devenir un cuir imputrescible aux propriétés adaptées aux cahiers de charges de son utilisation. Afin, d'apporter ses propriétés finales au cuir, l'ajout de nombreux produits chimiques est nécessaire. Ces derniers sont encadrés par plusieurs réglementations ayant pour but de protéger la santé humaine et l'environnement. Ainsi, les produits chimiques doivent être quantifiés dans les cuirs grâce à la mise en œuvre de méthodes analytiques. Ces dernières doivent régulièrement être mises à jour pour répondre à des problèmes de quantification rencontrés pour certains cuirs, pour ajouter de nouveaux composés réglementés à la liste des analytes et pour diminuer les limites de quantification afin de pouvoir répondre aux valeurs seuils indiquées par les exigences réglementaires. Dans ce contexte, il a été choisi de centrer ce travail de thèse sur l'analyse du formaldéhyde et des composés poly et perfluorés dans les cuirs, leur méthode d'analyse nécessitant de nouveaux développements.

Le premier chapitre introduit le contexte de cette étude en commençant par la présentation du CTC (Centre Technique Cuir, Chaussure, Maroquinerie), acteur majeur de la filière cuir, assurant la mise en place de méthodes analytiques. Ensuite, le procédé de fabrication du cuir, les principaux produits chimiques impliqués et les différentes réglementations sont détaillés, notamment à travers les exemples des composés poly et perfluorés et du formaldéhyde. Ce dernier est quantifié par la méthode normative ISO 17226-1 présentée dans le deuxième chapitre. Cette méthode nécessite une étape de dérivation du formaldéhyde catalysée en milieu acide pour conduire à un dérivé qui sera détecté en UV après une séparation par chromatographie liquide en phase inverse. Des surestimations de la teneur en formaldéhyde sont observées pour certains cuirs comme ceux retannés avec des résines capables de libérer du formaldéhyde par hydrolyse pendant l'étape de dérivation. Ainsi, le deuxième chapitre vise à proposer de nouvelles conditions de dérivation pour empêcher l'hydrolyse des résines afin de conduire à une quantification exacte du formaldéhyde dans le cuir.

Concernant les composés poly et perfluorés, le nombre de composés réglementés a augmenté et des teneurs seuils réglementaires nécessitent d'atteindre des limites de quantification plus basses. Dans le troisième chapitre, le développement de la méthode de quantification de ces composés par chromatographie liquide en phase inverse avec un spectromètre de masse en tandem est présenté. Différentes stratégies sont mises en œuvre afin de tenter de corriger les effets matrices conduisant à une surestimation ou à une sous-estimation de la teneur de certains composés poly et perfluorés.

Enfin, le quatrième chapitre regroupe l'ensemble des conditions expérimentales utilisées et présente les différents cuirs étudiés.

Chapitre 1 Le contexte

Le cuir est un matériau complexe. En effet, le passage de la peau brute au cuir fini nécessite plusieurs opérations mécaniques et étapes chimiques utilisant de nombreux composés dont des traces peuvent subsister dans le produit fini. Le cuir, comme d'autres biens de consommation, est soumis à des réglementations de plus en plus strictes afin de protéger la santé humaine et l'environnement. CTC est un acteur majeur dans la coordination, le contrôle et la mise en place de méthodes analytiques pour répondre à ces exigences.

1 CTC Groupe

1.1 Son histoire

L'histoire de CTC commence en 1899 avec la création de l'école française de Tannerie à Lyon : maison au service des métiers du cuir, de la chaussure et de la maroquinerie. Il était alors un centre de recherche sur la peau brute. En 1961, il porte le nom de Centre Technique du Cuir et devient un Centre Technique Industriel. L'année 1996 marque le début de son implantation internationale avec le développement de ses activités à Hong Kong. En 2008, CTC Centre Technique Cuir, Chaussure, Maroquinerie forme le CTC actuel en fusionnant avec le CIDIC (Comité Interprofessionnel de Développement des Industries du Cuir) et l'association B2S (Bureau de Style)¹.

1.2 Son emplacement

Le siège social de CTC est situé à Lyon. CTC représente un effectif de 341 collaborateurs dont 155 en France (en 2020). Il est aujourd'hui implanté dans différents continents : en Europe (en Italie et en Espagne), en Asie (au Vietnam, en Chine, au Cambodge, en Indonésie et au Bangladesh) et en Afrique (en Tunisie).

1.3 Son financement

CTC est le Comité Professionnel de Développement Economique (CPDE) de la filière Cuir, Chaussure, Maroquinerie, Ganterie. Une partie de son financement repose sur la taxe fiscale affectée aux entreprises de cette filière². Ces entreprises bénéficient de certains avantages tels qu'une réduction de prix sur certaines prestations de services. La deuxième partie de son financement s'appuie sur son activité commerciale à travers des prestations de service proposées dans ses différents domaines d'activités.

1.4 Ses secteurs d'activités

L'activité de CTC était initialement centrée sur le cuir avec la transformation des peaux brutes, leur qualité et la lutte contre le varron, un parasite. Petit à petit ses activités ont évolué et se sont diversifiées jusqu'à en faire un acteur majeur de sa filière. Il propose par exemple des formations professionnelles et des conseils afin de répondre au mieux aux besoins des Très Petites Entreprises, des Petites et Moyennes Entreprises, des Entreprises de Taille Intermédiaire et des grandes entreprises. CTC assure aussi des essais physiques, des analyses chimiques de produits et d'eau par ses laboratoires accrédités par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) selon la norme ISO/CEI 17025 :2005 qui prouve les compétences techniques de ses laboratoires et le bon management de la qualité³. CTC assure un contrôle qualité pour le cuir, la chaussure, la maroquinerie, le textile et l'habillement dans le respect de son accréditation ISO 17020:2012⁴. CTC peut également réaliser des inspections de matières et produits finis et un marquage Conformité Européenne (CE) des équipements de protection individuelle, également accrédité depuis fin 2018³. De plus, CTC met en œuvre des projets d'innovation, des projets de recherche et développement en chimie et en physique et participe à la normalisation. Ainsi, son expertise et sa vision globale lui permettent d'accompagner les entreprises tout au long de leur projet : du prototype vers la conception et jusqu'à la commercialisation en intégrant les aspects environnementaux et innocuité⁴.

2 Le procédé de fabrication du cuir : un procédé complexe impliquant de nombreux composés chimiques

Le cuir désigne « la peau d'un animal qui a conservé sa structure fibreuse originelle plus ou moins intacte et qui a été tannée de manière à devenir imputrescible »⁵.

Le procédé qui permet d'obtenir un cuir comprend différentes étapes pour que la peau brute putrescible c'est-à-dire pouvant se dégrader, devienne un cuir imputrescible possédant les propriétés adaptées à son utilisation finale comme la couleur, l'épaisseur, la solidité et la souplesse⁶. Ainsi, chaque étape du procédé de fabrication du cuir peut être associée à une liste de produits chimiques. Beaucoup d'autres composés peuvent également être utilisés et de nouveaux sont parfois testés dans les tanneries que ce soit pour remplacer ceux interdits par des réglementations ou pour chercher à obtenir de nouvelles propriétés.

L'ensemble des étapes du procédé de fabrication du cuir (sauf les étapes mécaniques et la finition) est réalisé dans des cuves remplies d'eau, par exemple des foulons⁶.

La peau brute est d'abord conservée puis préparée au tannage qui est complété par un post tannage et une étape de finition pour arriver au cuir adapté à son utilisation finale.

2.1 La peau brute

La peau brute est, dans la grande majorité des cas, issue des abattoirs et dépend donc directement de l'industrie alimentaire⁶. La peau brute est majoritairement composée d'eau et contient aussi des protéines comme le collagène et la kératine⁷. Le collagène est une protéine qui s'organise en fibres. Les étapes du procédé de tannage agissent sur les différents acides aminés constitutifs des protéines en fonction de l'étape réalisée⁸. Pour fabriquer le cuir, seule la couche correspondant au derme de la peau est conservée⁶ (Figure 1). Le derme, situé sous l'épiderme, est principalement composé de collagène. Ces fibres de collagène sont fines et denses dans la première couche sous l'épiderme qui est appelée la fleur. Dans la partie nommée chair, les fibres sont plus épaisses et lâches^{6,8}.

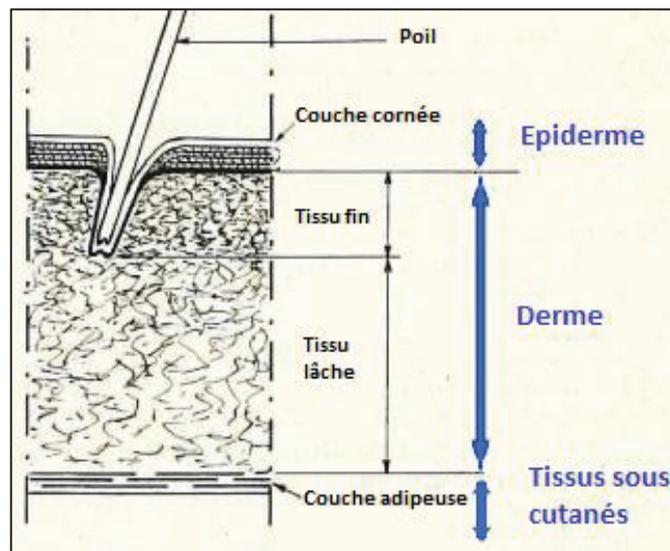


Figure 1 : coupe schématique d'une peau de bovin, adaptée de ⁹

Les autres couches, l'épiderme et les tissus sous-cutanés, sont éliminées au cours de la fabrication du cuir. L'épiderme est la couche la plus superficielle qui agit comme une barrière entre l'animal et son environnement. L'épiderme est principalement constitué de kératine qui contient de la cystine⁸. Le retrait des poils est réalisé par réaction chimique avec la cystine⁸. Enfin, les tissus sous-cutanés, localisés sous le derme, peuvent contenir des tissus gras, des vaisseaux sanguins, des nerfs et des muscles¹⁰.

D'autre part, la peau n'est pas homogène sur sa superficie et présente des différences d'épaisseurs et de structures selon les parties considérées⁶. La Figure 2 montre que la peau est découpée en trois zones appelées le croupon, le collet et les flancs.

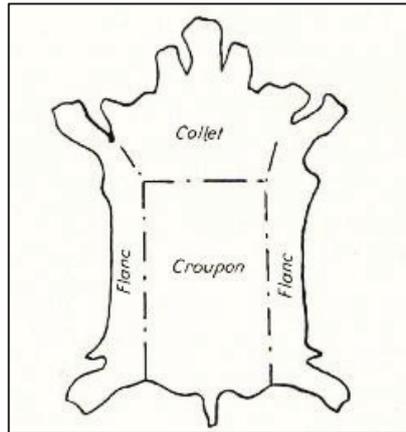


Figure 2 : aspect schématique d'une peau de bovin⁹

Le croupon est la zone du dos et de l'arrière train⁹. C'est la partie la plus homogène, donc la partie la plus souvent utilisée pour fabriquer le cuir⁶. Cette homogénéité est importante notamment pour la pénétration uniforme des produits chimiques⁸.

Les autres parties présentent davantage d'irrégularités, en terme d'épaisseur pour les flancs et le collet et aussi en terme de structure pour les flancs⁶.

Les différences sont plus au moins marquées en fonction de l'animal et aussi de sa taille⁶.

2.2 Conservation de la peau brute

Pour conserver la peau brute, la méthode la plus utilisée reste la déshydratation par l'ajout de sel (chlorure de sodium) complétée éventuellement par l'ajout d'additifs comme le métabisulfite de sodium⁸.

Dès cette étape, des biocides peuvent être ajoutés pour lutter contre le développement des bactéries⁸, par exemple le diméthylthiocarbamate de sodium.

2.3 Préparation de la peau brute : le travail de rivière

Le travail de rivière regroupe un ensemble d'étapes pour préparer la peau brute au tannage^{8,11}.

2.3.1 La trempe

La trempe est la première étape du travail de rivière. Pendant cette étape, le cuir est nettoyé dans l'eau. Le but est d'éliminer le sel, les parties inutiles (sang, boue ...), de réhydrater et d'assouplir la peau¹¹. Le carbonate de sodium ou sulfure de sodium (pH environ 9-10) est ajouté à l'eau⁸. Ce pH est adapté à la réhydratation de la peau et permet aussi de réduire l'activité bactérienne favorisée à un pH physiologique de 7,4⁸.

La réhydratation est accélérée par l'ajout d'enzymes ou de détergents qui permettent de mouiller la structure fibreuse. De plus, certains détergents, comme le dodécylbenzenesulfonate de sodium, aident aussi à retirer la graisse sébacée, sécrétée au niveau des poils⁸.

Le sel peut être utilisé pour retirer l'acide hyaluronique contenu dans la peau car ce dernier pourrait réagir avec le chrome utilisé lors de l'étape de tannage⁸.

Comme lors de l'étape précédente, des biocides peuvent être ajoutés⁸, par exemple le (benzothiazol-2-ylthio) méthyl thiocyanate.

2.3.2 L'épilage pelanage

L'épilage pelanage consiste à traiter la peau avec par exemple de la chaux et avec des agents réducteurs comme le sulfure de sodium pour s'attaquer aux poils ou à la laine et retirer l'épiderme¹¹.

Ainsi, les ions sulfures entraînent la réduction des ponts disulfures contenus dans la cystine (Figure 3), l'acide aminé principal de la kératine des poils⁸. Le pH est maintenu à 12-13,5 grâce à la chaux, une solution d'hydroxyde de calcium, pour que les ions sulfures S^{2-} soient l'espèce prédominante par rapport au sulfure d'hydrogène⁸.

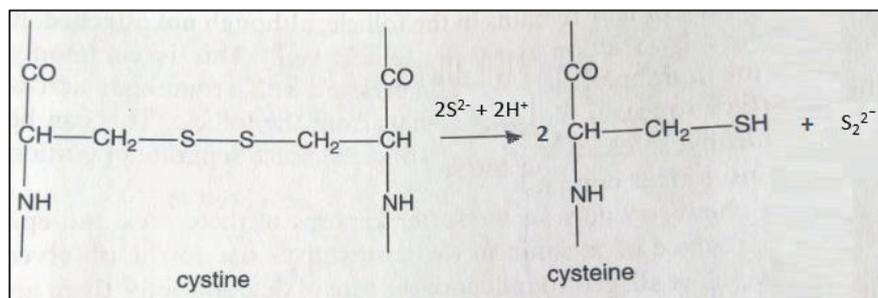


Figure 3 : rupture du pont disulfure dans la cystine de la kératine, adaptée de ⁸

Le but est également d'ouvrir la structure fibreuse¹¹ en dégradant légèrement les fibres de collagène pour améliorer la réactivité de la peau avec les agents de tannage⁶.

2.3.3 L'écharnage

Les tissus sous-cutanés sont éliminés mécaniquement avec une écharneuse, machine constituée de deux cylindres avec des lames⁶.

2.3.4 Le déchaulage

Le but de l'étape déchaulage est d'éliminer la chaux et de réduire le pH pour préparer la peau au confitage^{8,11} grâce à des sels d'ammoniums^{8,12} ou des acides tels que les acides lactique ou carbonique⁶.

2.3.5 Le confitage

Pendant le confitage, certaines protéines, comme l'élastine, sont détruites partiellement ou complètement par des enzymes¹³ afin d'améliorer la souplesse de la peau et de dégrader les pigments résiduels⁶.

2.3.6 Le picklage

Le but du picklage est de préparer le collagène de la peau à l'étape de tannage en ajoutant de l'acide¹¹. Du chlorure de sodium et de l'acide formique et/ou acide sulfurique, sont utilisés^{12,14,15}. Un milieu acide va permettre au tanin, comme le chrome, le glutaraldéhyde ou le tanin phénolique, de pénétrer dans la structure de la peau¹⁶.

2.4 Le tannage

C'est à l'étape de tannage que la peau est transformée en cuir imputrescible en fixant des agents de tannage dans le réseau de fibres de collagène^{14 6}.

La méthode la plus utilisée reste celle au chrome (III)^{14 17} introduit sous forme de sulfate de chrome basique^{8,12}. Le pH est légèrement augmenté par ajout de bicarbonate de soude ou d'oxyde de magnésium pour fixer le chrome au collagène^{6,16}. Le tannage au chrome présente plusieurs avantages, il est rapide (24 heures maximum), simple et moins onéreux que les autres tannages¹⁶. Il permet d'obtenir des cuirs résistants et souples¹⁶.

D'autres tannins minéraux existent comme le titane (IV) ou le zirconium (IV). Il y a aussi des tannins végétaux avec du mimosa, quebracho, châtaignier ou bien synthétiques avec par exemple la triazine (Granophin F90), les aldéhydes⁸, l'oxazolidine obtenu par réaction entre un amino-alcool et le formaldéhyde ou encore le formaldéhyde phosphore pour obtenir des cuirs blancs.

Les composés per et polyfluorés peuvent également être ajoutés dans les cuves remplies d'eau pendant la fabrication du cuir comme agents mouillants.

2.5 Le post tannage ou corroyage

Le corroyage regroupe les opérations mécaniques, le retannage, la teinture et la nourriture.

Lors les opérations mécaniques, il y a un essorage puis un triage du cuir en fonction de l'aspect de sa surface, de sa taille et de son épaisseur. La surface peut présenter des défauts comme les traces provenant d'attaques de parasites ou d'insectes ou des traces de cicatrices⁹. La qualité de la peau est très importante et elle est choisie en fonction de l'utilisation finale du cuir¹⁸. Par exemple, une peau avec très peu de défaut de surface est indispensable pour une finition fine. Ensuite, l'épaisseur est ajustée, notamment, avec l'utilisation d'une refendeuse qui fait passer le cuir entre deux cylindres face à une lame⁶. Les cuirs épais peuvent être divisés en deux parties correspondant au cuir côté fleur et à la croûte de cuir pour la partie côté chair¹⁶.

2.5.1 Le retannage

Le retannage est choisi pour être adapté au tannage qui lui précède et en fonction des propriétés finales souhaitées⁸, telles que le prêtant du cuir qui est la capacité d'un cuir à se déformer⁶, son

esthétique, sa stabilité chimique et hydrothermique⁸. Le retannage peut utiliser les mêmes agents de tannage que ceux utilisés pendant le tannage ou des agents différents⁵.

Ainsi, après un tannage au chrome, un retannage au chrome peut être réalisé⁸, par exemple en ajoutant un surfactant éthoxylaté, de l'acide acétique, du sulfate de chrome et du formiate de sodium¹⁹.

D'autres agents tannants peuvent également être utilisés comme des syntans (dérivés phénoliques), des polymères et des résines⁶. Par exemple, un retannage peut être composé d'un mélange d'aldéhydes, de tannins végétaux, d'un syntan et d'une résine⁸. Un syntan est l'abréviation de tannin synthétique¹¹. Une résine est définie comme une molécule à haut poids moléculaire qui peut être obtenue par polymérisation et/ou condensation¹¹. Par exemple, les résines dicyandiamide-formaldéhyde et mélamine-formaldéhyde résultent de la condensation avec le formaldéhyde⁸. La synthèse de ces résines est rapide, facile et peu onéreuse. Le formaldéhyde est difficile à remplacer par un autre aldéhyde en raison de ses excellentes propriétés de réticulation²⁰. Les résines peuvent se lier au collagène du cuir par formation de liaisons hydrogène⁸. Elles permettent de remplir la structure fibreuse du cuir pour qu'elle soit adaptée aux cahiers des charges de son utilisation et de son esthétique^{8,21}.

2.5.2 La teinture

L'étape de teinture consiste en la fixation de molécules colorantes solubles dans l'eau à la surface et à l'intérieur du réseau de fibres¹⁸. De l'acide formique est ajouté¹⁹ pour fixer les colorants. Des colorants acides sont souvent utilisés comme les colorants acides azoïques⁸, en raison de leur bonne fixation sur les cuirs tannés au chrome⁶. Pour certains colorants acides, l'ajout d'un métal comme par exemple le fer, est nécessaire pour permettre la fixation au collagène⁸.

Il existe aussi des colorants basiques comme les colorants basiques diazoïques⁸ qui ont une grande affinité avec les cuirs au tannage végétal ou autres cuirs anioniques⁸.

2.5.3 La nourriture

Le but de l'étape de nourriture est de préparer la peau au séchage en la lubrifiant pour que les fibres ne se collent pas entre elles pendant le séchage¹⁴.

Ainsi, le cuir est traité avec des huiles, des graisses, des cires ou des matériaux similaires¹¹. Un mélange utilisé pour la nourriture du cuir peut, par exemple, être constitué de bicarbonate de sodium, de formiate de sodium, d'un syntan (tannin synthétique), d'une paraffine sulfochlorée et d'huile végétale¹⁹.

Certaines des huiles utilisées présentent des groupements sulfate ou sulfite qui se fixent au groupe amine du collagène chargé en milieu acide afin de nourrir le cuir⁸.

2.6 Le finissage

En fonction de son utilisation finale, le cuir après corroyage peut être adapté mais la plupart du temps, il doit subir le finissage⁵. Ce sont donc les dernières opérations effectuées sur un cuir⁵.

La couleur finale du cuir est ajustée avec des pigments ou des colorants⁶. La teinture de finition est différente de celle intervenant en corroyage, puisqu'elle est appliquée en surface du cuir pour lui donner ses propriétés esthétiques finales¹⁸.

La formation d'un film protecteur est assurée par des liants comme des résines synthétiques acryliques, polyuréthanes ou nitro-cellulosiques⁶.

Un traitement de finition du cuir avec, par exemple, des composés per et polyfluorés peut lui apporter une résistance à l'eau et au gras²². Ces composés ont une chaîne aliphatique dont le fluor remplace, la plupart des atomes d'hydrogènes (composés polyfluorés) ou bien tous les atomes d'hydrogènes (composés perfluorés)²³.

2.7 Conclusion

Le procédé de fabrication du cuir utilise de nombreux composés chimiques résumés en Figure 4.

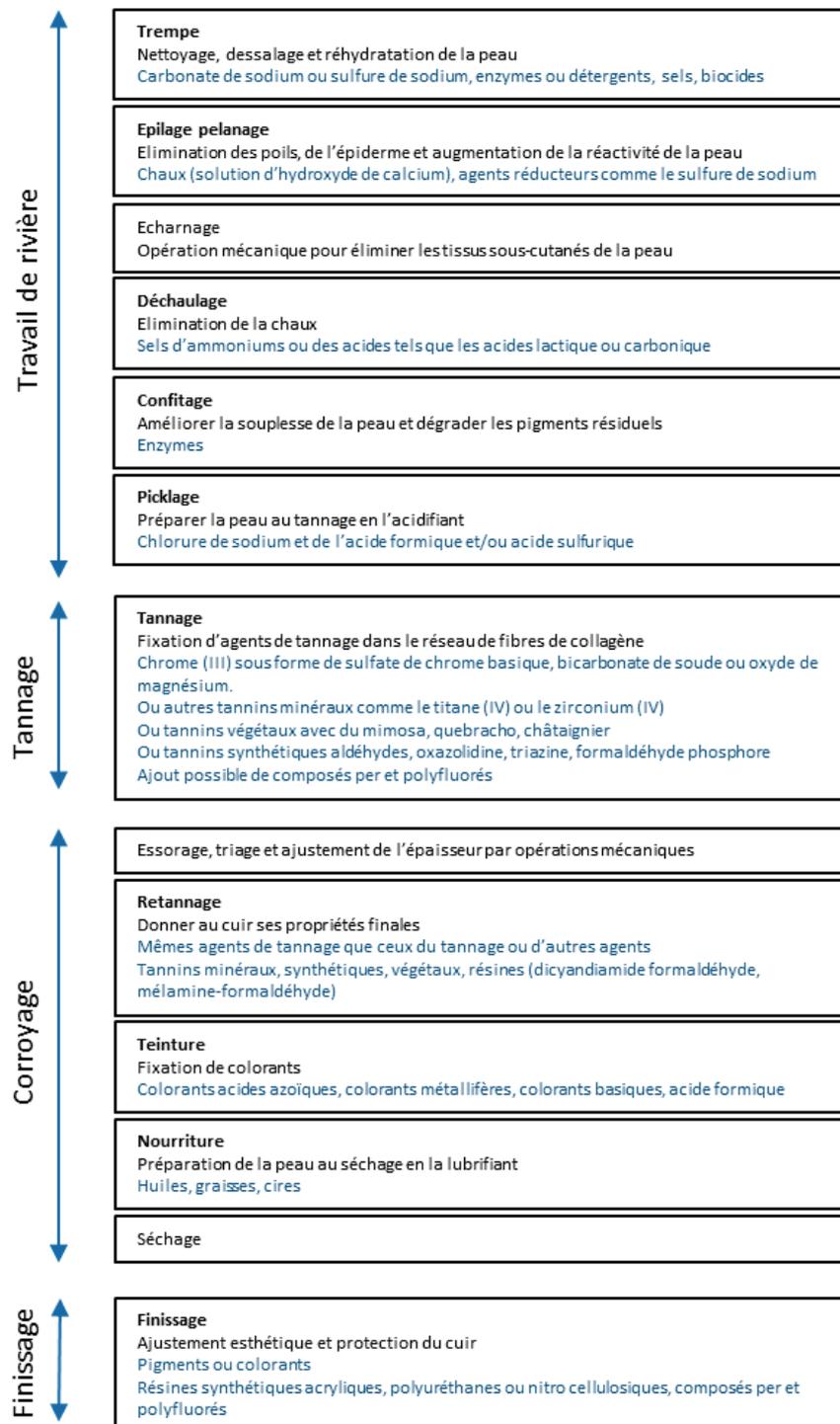


Figure 4 : logigramme des étapes de la fabrication du cuir avec des exemples de produits chimiques pouvant être utilisés, adapté de ¹⁶

Une partie de ces produits chimiques peut contaminer l'eau des cuves¹⁹. D'autres, sont engagés dans des liaisons irréversibles avec le cuir ou en liaisons potentiellement réversibles pouvant dans certains cas être rompues au cours de l'utilisation du cuir (par exemple lors du contact de la peau avec la sueur ou encore sous l'effet de la pluie)²⁴. L'Homme et l'environnement peuvent, ainsi, être directement exposés à certains de ces produits. Il est donc indispensable de contrôler leur présence dans les cuirs.

3 Cuirs et réglementations

Le cuir est soumis à plusieurs réglementations comme REACH et la réglementation sur les Polluants Organiques Persistants. REACH pour «Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals», soit «enregistrement, évaluation et autorisation des substances chimiques» est un règlement de l'Union Européenne²⁵. De plus, le règlement n°850/2004 sur les Polluants Organiques Persistants (POP) impose des restrictions sur les substances persistantes dans l'environnement et possédant de longues demi-vies dans les sols, les sédiments, l'air, les plantes ou les animaux²⁶.

Les règlements POP et REACH ont tous les deux pour objectif la protection de la santé humaine et de l'environnement^{27,28}. Ces règlements sont régulièrement mis à jour.

En 2014, la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) rapporte un grand nombre de cas d'allergies et/ou d'irritations cutanées en lien avec des vêtements et des chaussures²⁹. Pour proposer une solution, la France et la Suède ont déposé un projet afin de restreindre la présence de substances allergènes. La commission européenne est en train de poursuivre ce projet qui pourrait se conclure par un texte dans l'annexe XVII de REACH, annexe qui regroupe les substances soumises à des restrictions. Un des objectifs de ce projet est de diminuer la teneur limite du chrome hexavalent à 1 mg/kg, celle-ci étant actuellement de 3 mg/kg (règlement n°301/2014). En effet, le chrome trivalent, souvent utilisé pour le tannage, peut s'oxyder en chrome hexavalent¹⁶. Ce dernier est allergène et peut nuire à la santé en provoquant notamment des problèmes respiratoires¹⁶.

De nombreuses autres substances présentant des dangers sont soumises à des restrictions. Par exemple, les colorants azoïques sont très utilisés dans les cuirs mais peuvent libérer des amines aromatiques dont certaines sont mentionnées dans l'annexe XVII de REACH en tant que substances cancérigènes³⁰.

Certains biocides sont réglementés, notamment le diméthylfumurate et le pentachlorophénol. Le diméthylfumurate, un anti moisissure à l'origine de sévères réactions cutanées, ne doit pas excéder une teneur de 0,1 mg/kg d'après l'annexe XVII de REACH³¹. Le pentachlorophénol utilisé comme fongicide présente des dangers pour la santé humaine et est considéré comme un polluant organique persistant³². Sa valeur limite est fixée à 5 mg/kg d'après le règlement européen 2021/277.

Le formaldéhyde et les composés per et polyfluorés sont également soumis à des réglementations.

3.1 Formaldéhyde

Comme vu précédemment, le formaldéhyde peut être utilisé, entre autres, pour la synthèse de résine intervenant pendant l'étape de retannage. Cependant, il présente plusieurs dangers. Il est inflammable, irritant pour les voies respiratoires, la peau, les yeux et peut être à l'origine d'une réaction allergique de la peau³³.

Depuis le règlement européen 605/2014, le formaldéhyde est classé cancérigène 1B³⁴. Il appartient donc à la liste des substances extrêmement préoccupantes (SVHC) candidates à l'annexe XIV de REACH qui regroupe les substances soumises à communication si ces substances sont présentes à plus de 0,1% dans l'article final.

Le formaldéhyde peut générer des réactions allergiques par contact cutané. Ainsi, depuis mai 2021, pour les matériaux en cuir ou en textile dans les jouets, la commission européenne a fixé une teneur limite en formaldéhyde de 30 mg/kg. En Chine, la concentration limite en formaldéhyde est de 20 mg/kg pour les cuirs destinés aux produits pour les enfants, 75 mg/kg pour les produits en cuir qui sont en contact direct avec la peau et de 300 mg/kg pour les produits en cuir sans contact avec la peau³⁶. La teneur limite de 75 mg/kg est également mentionnée dans certains cahiers des charges des tanneurs. C'est donc cette limite qui est utilisée comme critère de conformité dans les études suivantes.

3.2 Composés per et polyfluorés (PFCs)

Pour beaucoup de PFCs, leurs liaisons carbone-fluor leur confèrent une grande stabilité³⁷. Ils s'éliminent donc très lentement dans l'environnement⁷ et contaminent les sols, l'eau et la chaîne alimentaire²³. Ainsi, le corps humain est exposé aux PFCs et donc le sang et le lait maternel peuvent contenir ces composés²³.

Or, certains PFCs présentent des dangers pour la santé. En effet, ils peuvent provoquer une diminution de la fertilité et une augmentation du taux de cholestérol pouvant nuire à la santé³⁹. Ils peuvent également nuire aux nourrissons par leur présence dans le lait maternel³⁹. Certains PFCs peuvent être à l'origine de cancer⁴⁰. De plus, la toxicité d'un mélange de PFCs peut être plus élevée que la toxicité individuelle des composés⁴¹.

Ainsi, certains PFCs sont soumis à des réglementations. C'est le cas de l'acide perfluorooctanesulfonique (PFOS) et de ses dérivés dont la limite seuil est fixée à 1 µg/m² pour les textiles et pour les matériaux enduits d'après l'annexe 1 du règlement CE n°850/2004 concernant les Polluants Organiques Persistants⁴². Cette limite est exprimée par rapport à la surface du matériau, en considérant que le PFOS est principalement utilisé en traitement de finition de surface. Un cuir est considéré enduit lorsque l'épaisseur de la couche d'enduction ou de contre collage n'excède pas un tiers de l'épaisseur totale du produit, mais est supérieure à 0,15 mm. Pour les cuirs non enduits la limite en PFOS est de 0,1% en masse.

De plus, l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) appartient à l'annexe XVII de REACH. Ainsi, sa teneur maximale est de 0,025 mg/kg et de 1 mg/kg pour une substance qui lui est apparentée (substance qui est susceptible de se décomposer ou de se transformer en PFOA). Ces teneurs limites sont applicables depuis le 4 juillet 2020 ou le seront en 2023 pour les « vêtements de protection des travailleurs contre

les risques pour leur santé et leur sécurité »⁴³. Une exception est faite pour la « fabrication d'une substance au cours de laquelle le PFOA est un sous-produit inévitable de la fabrication de composés fluorés constitués d'une chaîne carbonée composée de 6 atomes ou moins »⁴³.

Afin d'empêcher la substitution du PFOA par des acides perfluorés carboxyliques à plus longue chaîne, une restriction est inscrite à l'entrée 68 de l'annexe XVII du règlement REACh. Ainsi, les concentrations limites applicables à partir du 25 février 2023 sont de 0,025 mg/kg pour la somme des acides perfluorés carboxyliques ayant entre 9 et 14 carbones et de 0,260 mg/kg pour leurs substances apparentées⁴⁴.

Certains PFCs, comme l'acide perfluorobutanesulfonique (un acide perfluoré carboxylique avec 4 carbones) appartiennent à la liste des substances candidates à autorisation de REACh obligeant à communiquer des informations sur ses substance lorsqu'elles sont contenues dans des articles à plus de 0,1% en masse.

Enfin, des labels comme Standard 100 OEKO TEX (International Association for Research and Testing in the Field of Textile and Leather Ecology) indiquent des teneurs limites pour davantage de PFCs et ces teneurs dépendent de l'utilisation finale du produit⁴⁵.

4 Conclusion

Plusieurs composés utilisés ou générés au cours de la fabrication d'un cuir sont soumis à des réglementations pour assurer la santé humaine et respecter l'environnement.

Il est donc nécessaire de pouvoir les quantifier dans le cuir avec une exactitude satisfaisante. Cet enjeu est traité à travers les exemples du formaldéhyde et des composés poly et perfluorés (PFCs).

Pour le formaldéhyde, il est déjà quantifié dans les cuirs mais il semble exister des biais lors de l'utilisation de la norme ISO 17226-1 de 2019, probablement liés au temps d'attente sur le passeur. Le but est donc de comprendre ces biais et de les éliminer.

Pour les PFCs, la limite maximale est fixée à 1 µg/m² pour le PFOS est la plus stricte des limites. Une quantification à ce niveau est actuellement possible pour les textiles mais ne l'est pas pour les cuirs. L'enjeu est donc d'atteindre cette limite de quantification pour les cuirs. D'autre part, 15 PFCs sont quantifiés alors qu'une quarantaine de PFCs peuvent être utilisés en tannerie ou se retrouver dans cuir par contamination de l'eau ajoutée pendant le procédé de fabrication. Ainsi, le but est d'élargir le nombre de composés analysés afin de répondre aux dernières réglementations en vigueur.

Chapitre 2 : Analyse du formaldéhyde dans le cuir

1 Introduction : le formaldéhyde dans le procédé de fabrication du cuir

Comme vu précédemment, le formaldéhyde peut intervenir dans différentes étapes du procédé de fabrication du cuir représentées en bleu dans la Figure 5. Historiquement, il était utilisé directement comme agent de tannage ou bien comme agent de réticulation dans la finition caséine. Aujourd'hui, le formaldéhyde est surtout présent dans les étapes de tannage et de retannage ou comme excès de la synthèse de certains produits.

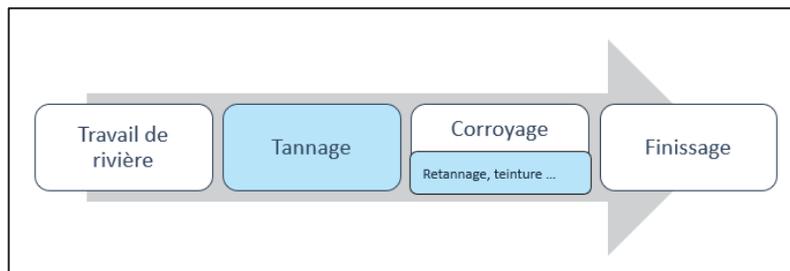


Figure 5 : formaldéhyde dans le procédé de fabrication du cuir avec en bleu les principales étapes où le formaldéhyde peut être utilisé

La source indirecte de formaldéhyde posant le plus de problème correspond aux résines produites initialement par condensation avec le formaldéhyde (comme la résine mélamine et la résine dicyandiamide) et pouvant par la suite libérer le formaldéhyde par hydrolyse.

Par exemple pour la résine mélamine, les liaisons carbone-azote des ponts méthylènes ou des méthylols sont faibles et peuvent donc être rompues, notamment en milieu aqueux^{1,4}. Ainsi, l'ensemble du mécanisme réactionnel de la synthèse de la résine est réversible et peut mener à la libération du formaldéhyde de départ⁴⁶ (Figure 6).

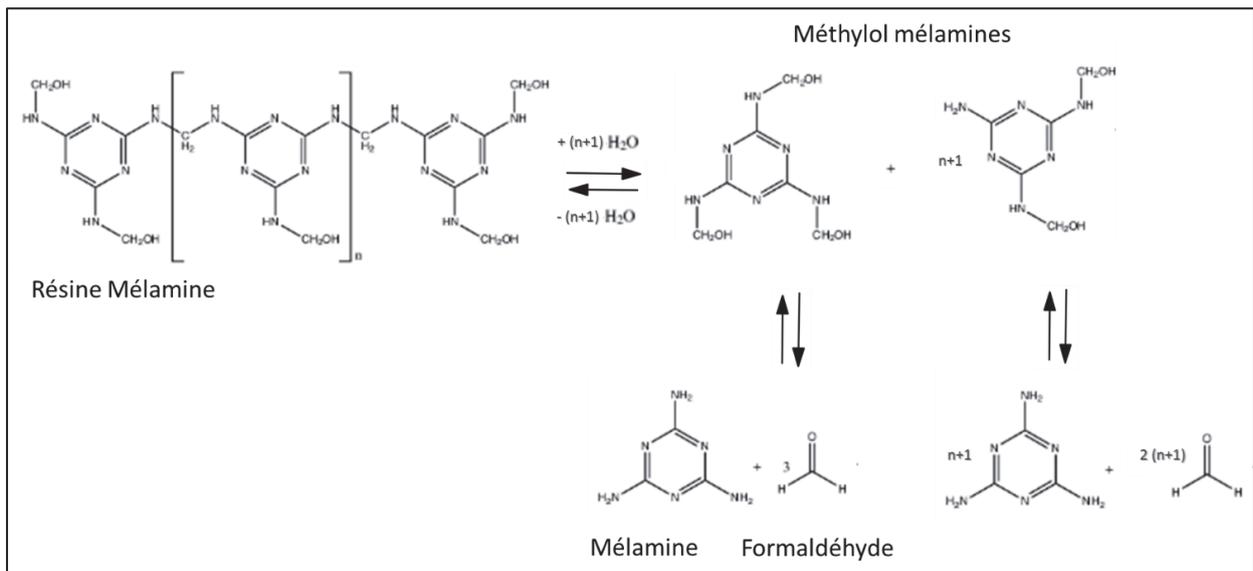


Figure 6 : libération du formaldéhyde par hydrolyse de la résine mélamine, adaptée de ⁴⁷

Ainsi, le formaldéhyde contenu dans le produit final peut provenir du formaldéhyde résiduel de la réaction de synthèse d'une résine ou du formaldéhyde libéré par hydrolyse de certaines résines.

2 Bibliographies techniques et références normatives sur la quantification du formaldéhyde dans les cuirs

Le formaldéhyde se trouve sous différentes formes dans les cuirs. Il peut être libre, c'est-à-dire que le formaldéhyde n'a aucune liaison avec le cuir ni avec d'autres composés chimiques⁴⁸ ou bien le formaldéhyde peut être libéré par dégradation de certains produits. Le choix des méthodes d'analyse repose sur la fraction de formaldéhyde que l'on souhaite analyser, sur les limites autorisées par les réglementations et sur l'utilisation finale du produit. Plusieurs méthodes ont été mises en place pour quantifier le formaldéhyde dans le cuir.

2.1 Détermination du formaldéhyde total par hydrolyse acide

Le formaldéhyde total peut être mesuré avec une méthode qui dégrade le produit⁴⁹ par hydrolyse acide. La méthode acide chromotropique repose sur la réaction de la Figure 7 entre l'acide chromotropique et le formaldéhyde en présence de l'acide sulfurique pour former un dérivé violet dibenzoxanthylum⁵⁰.

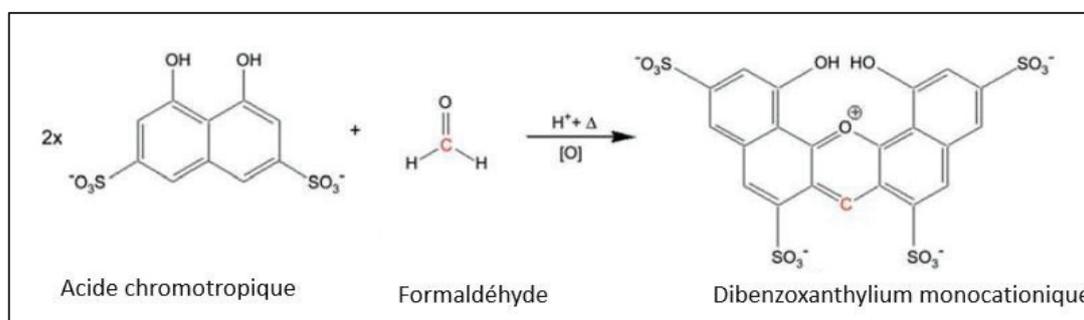


Figure 7 : réaction entre le formaldéhyde et l'acide chromotropique menant à la formation du dibenzoxanthylum monocationique⁵¹

Par exemple la norme textile BS6806-1 sur la détermination du formaldéhyde total et libre (extraction aqueuse) utilisant l'acide chromotropique peut être mise en œuvre.

Le formaldéhyde total pourrait donc être mesuré mais il n'est pas représentatif de ce qui est susceptible d'être libéré lors de l'utilisation du produit fini²⁰. Il existe donc d'autres méthodes reposant, par exemple, sur la détermination du formaldéhyde dégagé par le cuir.

2.2 Détermination du formaldéhyde dégagé par le cuir en bouteille scellée

Pour les cuirs d'ameublement, il paraît plus approprié de prendre en compte le formaldéhyde libéré par le cuir dans une pièce ou tout autre espace fermé. Ainsi, pour se rapprocher le plus possible de

cette utilisation finale, le cuir est suspendu dans une bouteille scellée comme représenté en Figure 8. Le formaldéhyde se vaporise sous l'effet de la chaleur et se solubilise dans l'eau contenue au fond de la bouteille. L'eau est ensuite prélevée, dérivée et analysée. Cette méthode est utilisée par deux normes, la norme VDA-275 et la partie 3 de la norme ISO 17226.

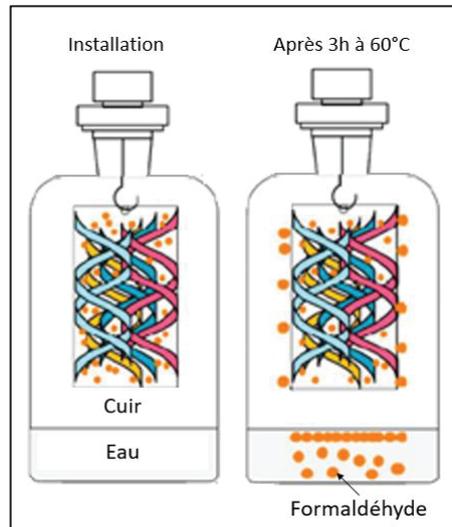


Figure 8 : relargage du formaldéhyde dans le système scellé, adapté de ⁵²

Expérimentalement, une température de 60°C est maintenue pendant 3h. Une étude de Y. Xuzheng *et al.* sur la norme ISO 17226-3 souligne l'importance des paramètres d'extraction tels que la température. Une augmentation de cette dernière a pour conséquence d'accélérer le relargage du formaldéhyde⁵². Après extraction en bouteille scellée, une dérivation du formaldéhyde est nécessaire. La dérivation est une réaction chimique permettant de former un composé formaldéhyde dérivé détectable par UV. Le formaldéhyde contenu dans l'eau est analysé après dérivation préalable au 2,4-dinitrophenylhydrazine (pour la norme ISO 17226-3) ou à l'acétylacétone (pour la norme VDA-275).

2.2.1 Norme VDA-275 : dérivation à l'acétylacétone

La norme VDA-275 utilise l'acétylacétone comme agent de dérivation. La réaction de dérivation correspond au schéma réactionnel de la Figure 9 qui mène à la formation du 3,5-diacétyl-1,4-dihydropyridine, un liquide jaune. Cette réaction de dérivation présente l'avantage d'être réalisée en conditions plutôt douces (pH d'environ 6) et de ne pas dériver les cétones.

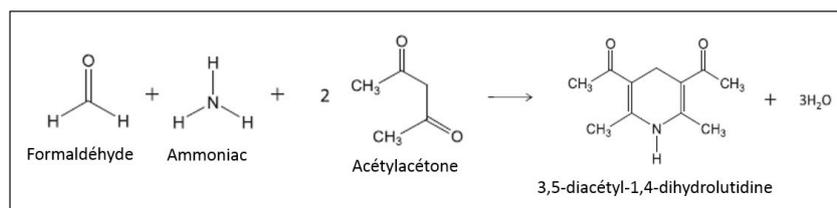


Figure 9 : Schéma réactionnel de la dérivation du formaldéhyde avec l'acétylacétone⁵³

L'acétylacétone absorbe à 295 nm tandis que le formaldéhyde dérivé absorbe à 412 nm. Ces longueurs d'ondes sont suffisamment différentes pour permettre une analyse sans séparation préalable. De plus, comme ce sont uniquement les composés volatils qui sont extraits par la vapeur d'eau, les colorants ne sont pas extraits⁴⁹. La solution de formaldéhyde obtenue après extraction en bouteille scellée est incolore. Les interférents colorés qui peuvent interférer avec une détection par spectromètre UV du formaldéhyde dérivé sont donc évités⁵⁴. D'autres interférents volatils peuvent toutefois persister tels que d'autres aldéhydes que le formaldéhyde.

2.2.2 Norme ISO 17226-3 : dérivation au DNPH

Les conditions d'extraction en bouteille scellée (3h, 60°C) correspondent à une température et une durée élevées et peuvent conduire à la dissociation de certains produits. Ainsi, cette méthode échantillonne essentiellement le formaldéhyde libre mais peut également échantillonner le formaldéhyde libéré dans ces conditions⁴⁹ et certains interférents. Donc, la partie 3 de la norme ISO 17226 propose une analyse UV précédée d'une séparation chromatographique. L'agent de dérivation choisi, le 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) est introduit en excès et est détecté à la même longueur d'onde que le formaldéhyde dérivé (355 nm). Le formaldéhyde dérivé est séparé de l'excès de DNPH et des autres aldéhydes et cétones dérivés par chromatographie en phase liquide en phase inverse. La réaction de dérivation catalysée en milieu acide est présentée en Figure 10. Par rapport à la dérivation à l'acétylacétone, la réaction avec le DNPH présente l'avantage d'être plus rapide (60 min de dérivation pour la norme ISO 17226-3 au lieu de 75 min dans la norme VDA-275).

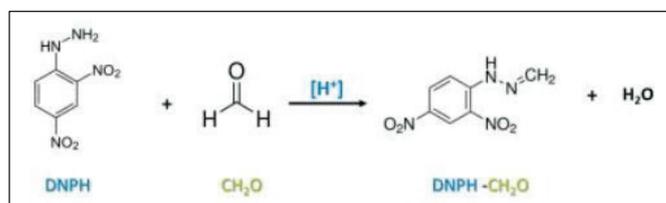


Figure 10 : schéma réactionnel de la dérivation du formaldéhyde avec le 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)⁵⁵

Le formaldéhyde dégagé en phase gazeuse par le cuir et mesuré avec la partie 3 de la norme ISO 17226 n'est pas comparable aux mesures des deux autres parties de cette norme qui reposent sur une extraction aqueuse du formaldéhyde contenu dans le cuir.

2.3 Détermination du formaldéhyde libre et du formaldéhyde libéré lors d'une extraction aqueuse

Les méthodes commençant par une extraction du cuir dans une solution détergente considèrent le modèle de transfert du formaldéhyde du cuir vers l'eau, fraction susceptible d'entrer en contact avec la peau⁵⁶. Ces méthodes sont adaptées pour le dosage du formaldéhyde dans les chaussures sachant qu'elles seront amenées à être mouillées par la pluie ou la sueur²⁴. Le formaldéhyde dosé correspond

à la somme du formaldéhyde libre et du formaldéhyde libéré par le cuir pendant les conditions d'extraction dans le détergent au bain marie à 40°C pendant 1h. Des méthodes innovantes et des méthodes normatives comme la norme ISO 17226 sont utilisées. La partie 2 de cette norme est la méthode la plus ancienne et est inspirée de la norme textile ISO 14184-1. Ces deux parties ayant le même objectif elles sont censées donner la même "tendance" et la partie 1 doit être utilisée en cas de litige. Elles commencent toutes deux par le découpage du cuir en morceaux de 3 mm à 5 mm de côté puis son extraction dans une solution de détergent (1 g/L de dodécylsulfonate de sodium ou de dodécylsulfate de sodium), mais différent à partir de l'étape de dérivation du formaldéhyde.

2.3.1 Norme ISO 17226-2 : dérivation à l'acétylacétone

La partie 2, la plus ancienne, repose sur une dérivation chimique du formaldéhyde puis sa quantification directe par spectrométrie UV. La dérivation du formaldéhyde est réalisée avec comme réactif l'acétylacétone en conditions plutôt douces⁵⁷.

Concrètement, après extraction aqueuse, le formaldéhyde est dérivé sous agitation pendant 30 min à 40°C avec une solution de dérivation d'acétylacétone. Après 30 minutes à température ambiante et dans l'obscurité (le formaldéhyde dérivé est sensible à la lumière), le dérivé est directement détecté par spectrophotométrie UV à 412 nm.

La durée entre la fin de la dérivation et la mesure d'absorbance ne doit pas être supérieure à 1h, probablement pour ne pas risquer de dégrader le formaldéhyde dérivé.

Comme il n'y a pas d'étape de séparation chromatographique, il y a donc davantage de risques d'interférences. En effet, certains colorants jaunes, absorbant à la même longueur d'onde que le formaldéhyde dérivé, peuvent provoquer des interférences⁵⁰.

Ce mode opératoire permet d'atteindre une limite de quantification (LQ) de 0,2 µg/mL correspondant à 5 mg/kg de formaldéhyde dans le cuir. La plage de linéarité s'étend entre 5 mg/kg et 100 mg/kg de cuir.

Un test d'aptitude a été organisé à grande échelle avec 162 participants en Chine et présenté par Y. Zhao *et al.*⁵⁸. Les cuirs étudiés (A et B) ont été préparés en ajoutant différentes quantités d'une résine synthétisée avec le formaldéhyde à une peau de mouton pendant le procédé de fabrication du cuir⁵⁸. 81 laboratoires analysent l'échantillon de cuir A et les 81 autres laboratoires analysent l'échantillon de cuir B en suivant une méthode dont les étapes décrites correspondent à la norme ISO 17226-2⁵⁸. Les valeurs médianes obtenues pour les cuirs A et B sont de 44,0 et 12,7 mg/kg avec des coefficients de variations de 4 et 14% respectivement⁵⁸.

Pour comparer les résultats des laboratoires, les z scores ont été calculés avec la formule de Équation 1⁵⁸.

Équation 1 : calcul du z score de chaque laboratoire participant⁵⁸

$$z \text{ score} = \frac{x - X}{\sigma}$$

avec x : teneur en formaldéhyde obtenue par le laboratoire (en mg/kg)

X : estimation de la valeur vraie à trouver (en mg/kg)

σ : écart type pour l'évaluation de l'essai inter laboratoire, défini comme étant une valeur cible pour l'écart acceptable par rapport à la valeur assignée (en mg/kg) (valeur non indiquée dans l'étude)

La norme NF EN ISO/CEI 17043 donne une interprétation de la valeur absolue des z scores obtenus. Ainsi, si le z score, en valeur absolue, est inférieur ou égal à 2,0, les performances sont dites satisfaisantes. Pour un z score, en valeur absolue, strictement compris entre 2,0 et 3,0, les performances sont discutables. Enfin pour un z score, en valeur absolue, supérieur ou égal à 3,0, les performances sont insatisfaisantes. Ainsi, les z scores permettent d'évaluer les performances des laboratoire pour la méthode analytique utilisée⁵⁸.

La Figure 11 représente en ordonnée les z scores obtenus avec cette méthode, par ordre croissant, pour les différents laboratoires (nommés en abscisse) pour les cuirs A et B. Ainsi, 20 résultats sont surestimés et 10 résultats sont sous-estimés par rapport à la valeur moyenne⁵⁸. Une des raisons possibles pourrait-être la répartition non homogène du formaldéhyde pendant le procédé de fabrication du cuir, mais des essais de répétabilité ont abouti à des écarts types considérés comme négligeables (étant inférieurs à 0,3 fois l'écart type utilisé pour le calcul des z scores). Une autre raison pourrait être des différences lors de la mise en œuvre du mode opératoire dans les laboratoires. D'autre part, la grande majorité des laboratoires a des résultats dans l'intervalle défini par les traits jaunes correspondant à des z scores, en valeur absolue, inférieurs ou égaux à 2,0. La reproductibilité des résultats entre ces laboratoires est donc satisfaisante⁵⁸.

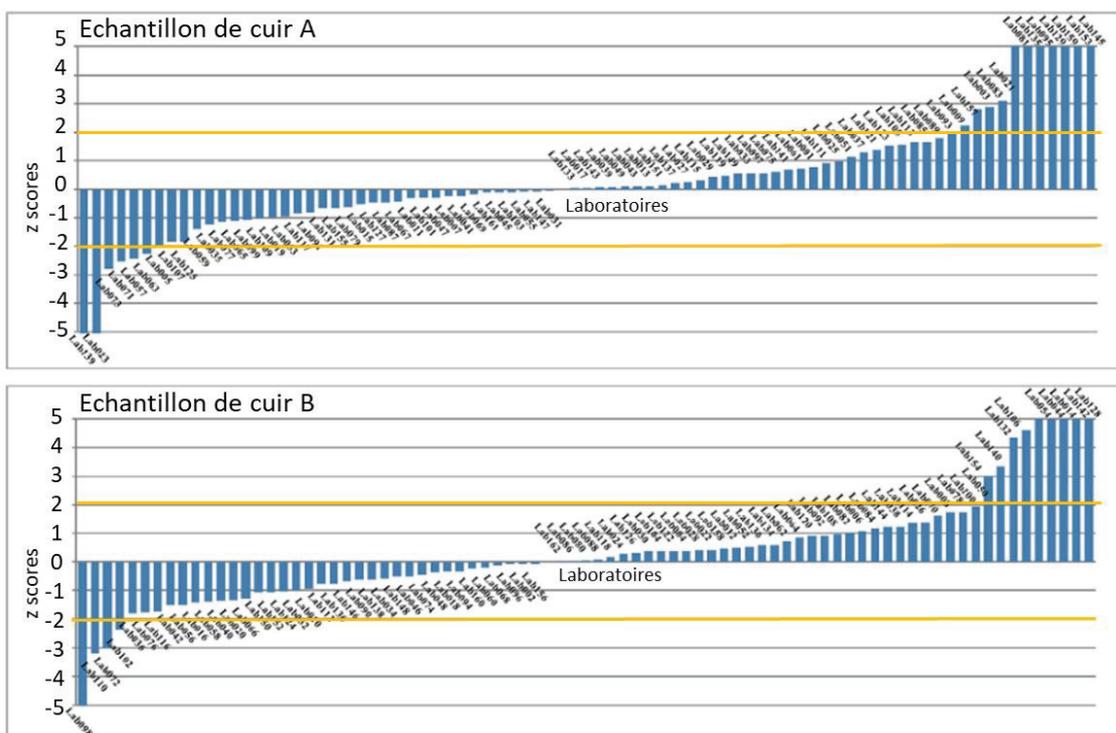


Figure 11 : z scores des différents laboratoires pour la mesure du formaldéhyde dans les échantillons des cuirs A et B avec une méthode proche de la norme ISO 17226-2. En jaune les bornes pour un z score, en valeur absolue inférieur ou égal à 2 signifiant que les performances sont satisfaisantes. Adaptée de ⁵⁸

2.3.2 Norme ISO 17226-1 2019 : dérivation au DNPH

La partie 1 de la norme ISO 17226, à la différence de la partie 2, utilise une séparation chromatographique avant la détection UV du formaldéhyde dérivé au DNPH en condition acide. Cette étape permet de séparer le formaldéhyde dérivé de l'excès de DNPH et des autres aldéhydes et cétones dérivés. La norme précise une fourchette de temps à respecter entre la dérivation et l'analyse, probablement pour des raisons cinétiques ou de stabilité du formaldéhyde dérivé. Compte tenu de la structure de ce dernier, une séparation en phase inverse est choisie avec une colonne C18 et une phase mobile contenant 60/40 en acétonitrile/eau. Le formaldéhyde dérivé est ensuite détecté en UV à 355 nm. La limite de quantification indiquée dans la norme est de 100 µg/L ce qui correspond à 5 mg/kg de formaldéhyde dans le cuir. La plage de linéarité s'étend jusqu'à 2 000 µg/L soit 100 mg/kg.

Différentes études ont permis d'évaluer les performances de cette méthode pour des cuirs ayant des teneurs en formaldéhyde très différentes. Par exemple, un essai inter laboratoire coordonné par l'Igualada Leather Technology School entre 5 laboratoires a été réalisé pour l'analyse du formaldéhyde dans 3 échantillons de cuirs⁵⁴. Les écarts types de répétabilité et de reproductibilité sont donnés dans le Tableau 1. Ils correspondent aux écarts types obtenus dans les conditions définies par la norme ISO 5725-1. Pour les conditions de répétabilité, les résultats sont obtenus avec la même méthode, pour un même échantillon, au même laboratoire, par le même opérateur, en utilisant le même équipement et dans un intervalle de temps court. Pour les conditions de reproductibilité, les résultats sont obtenus

avec une même méthode, pour un même échantillon, mais avec un laboratoire, un opérateur et un équipement différents.

Les écarts types de répétabilité sont compris entre 1,1 et 17 mg/kg pour des teneurs moyennes en formaldéhyde à 31,9 et 681 mg/kg respectivement (Tableau 1)⁵⁴. L'écart type de reproductibilité s'étend entre 2,6 mg/kg et 100 mg/kg pour des teneurs en formaldéhyde de 31,9 mg/kg et 681 mg/kg. Les écarts types relatifs montrent que la méthode ISO 17226-1 a une bonne répétabilité et une bonne reproductibilité.

Tableau 1 : résultats d'un essai inter laboratoire pour l'analyse du formaldéhyde suivant la norme ISO 17226-1. Tableau des moyennes, écarts types de répétabilité et reproductibilité. Adapté de ⁵⁴

Cuir	Nombre de laboratoires	Moyenne (mg/kg)	Ecart type de répétabilité (mg/kg)	Ecart type de reproductibilité (mg/kg)
A	4	681	17	100
B	5	31,9	1,1	2,6
C	4	164	8,3	24

Cet essai inter laboratoire a également mis en évidence que la chromatographie permet de séparer le formaldéhyde des autres aldéhydes comme l'acétaldéhyde⁵⁴. Le chromatogramme obtenu dans les conditions conseillées par la norme et avec une colonne Waters Xterra MS C18 5 µm 3,9 x 150 mm est représenté en Figure 12 pour le formaldéhyde et pour l'acétaldéhyde. Cette figure montre un pic d'intensité élevée correspondant à l'excès de DNPH. Le formaldéhyde et l'acétaldéhyde sont élués à 2,80 et 3,37 min respectivement. Leur temps de rétention est suffisamment éloigné pour permettre un retour à la ligne de base entre les pics empêchant toute interférence.

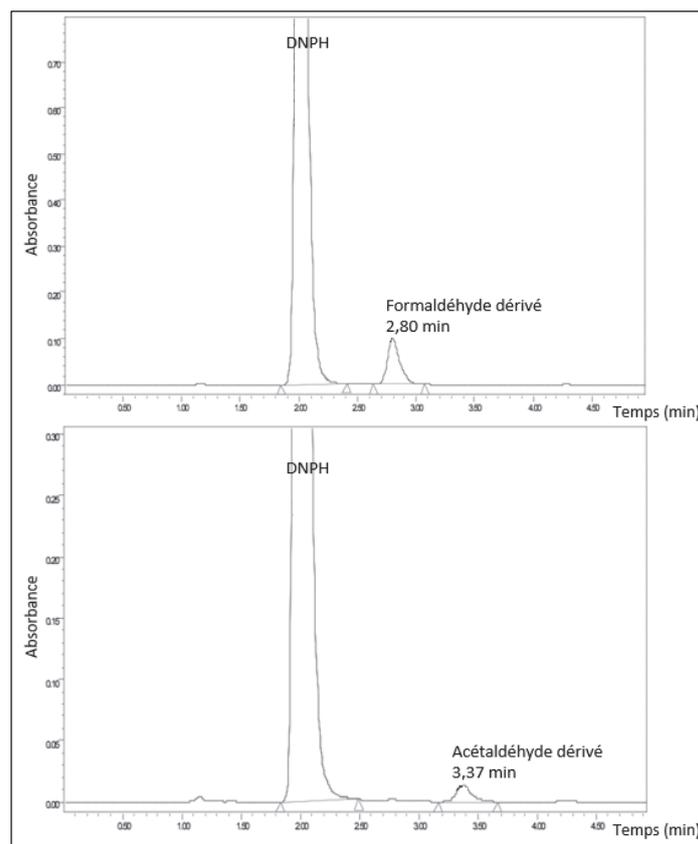


Figure 12 : chromatogrammes pour une solution de formaldéhyde (en haut) et une solution d'acétaldéhyde (en bas) dérivées au DNP-H et analysées dans les conditions de la norme ISO 17226-1 :2019. La séparation est réalisée avec une colonne C18 (150 mm x 3,9 mm 5 μ m), avec un volume d'injection de 20 μ L, à un débit de 1,0 mL/min, avec comme phase mobile l'acétonitrile et l'eau (60/40 v/v). La détection est effectuée à 350 nm. Adaptée de ⁵⁴

Cependant, seulement 5 laboratoires ont participé à cet essai inter laboratoire, il serait intéressant d'effectuer une étude à plus grande échelle.

2.3.3 Innovation

D'autres méthodes peuvent être des alternatives aux méthodes normatives précédentes.

Tout d'abord, le détecteur à barrette de diodes (DAD) de la norme ISO 17226-1 peut être remplacé par un spectromètre de masse en tandem (MS/MS)⁵⁹. Une étude pour comparer ces deux détecteurs a été réalisée au CTC par N. Blanc *et al.* pour la détermination du formaldéhyde dans 17 échantillons de cuir⁵⁹. Les conditions chromatographiques sont les mêmes. Comme le triple quadripôle MS/MS est très sensible, l'extrait est dilué par 5 dans un mélange 50/50 eau/acétonitrile pour être quantifié avec une gamme s'étendant de 10 μ g/L à 500 μ g/L. La source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) en mode négatif permet de garder le même débit que celui utilisé en LC-DAD⁵⁹.

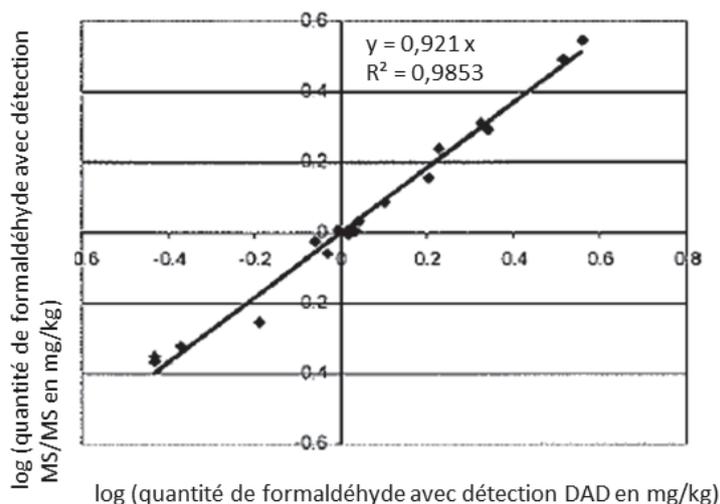


Figure 13 : comparaison de la teneur en formaldéhyde obtenue en LC-MS/MS par rapport à celle obtenue en LC-DAD pour 19 échantillons de cuirs. La séparation LC est réalisée avec une colonne Purospher® Star C18 (25 cm x 3 mm), un volume d'injection de 10 µL, une température de 30°C, un débit de 0,5 mL/min, une phase mobile composée d'acétonitrile et d'eau, un gradient qui commence par 50% en acétonitrile, atteint 66% en 12 min puis 90% après 3 min et maintient 90% en acétonitrile pendant 2 min. Pour la LC-DAD, une LC Agilent 1100S et un DAD Agilent 1100 sont utilisés, le formaldéhyde dérivé est détecté à 360 nm avec une longueur d'onde de référence à 540 nm. Pour la LC-MS/MS, une LC Agilent 1200 est couplée à un triple quadripôle Agilent 6410 avec une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique en mode négatif. Les transitions MRM de quantification et de qualification sont 205->132,8 et 205->76,2 respectivement. Les concentrations sont exprimées en mg/kg dans des échelles logarithmiques⁵⁹.

La Figure 13 représente les résultats obtenus (axes en échelle logarithmique) avec chaque détecteur. La pente de la droite de régression est de 0,921, ce qui respecte le critère de $1 \pm 0,1$. Le coefficient de détermination R^2 est de 0,985, il respecte le critère de R^2 supérieur à 0,98. Les deux détecteurs conduisent donc à des résultats similaires. La MS/MS permet une excellente sélectivité et une limite de quantification plus basse que le DAD mais son prix est plus élevé. La LC-DAD permet de répondre aux exigences réglementaires actuelles. Si ces dernières sont amenées à demander une limite de quantification plus basse, la spectrométrie de masse pourrait être envisagée⁵⁹.

Une autre méthode simple, peu onéreuse et sélective est proposée par Y. Wang *et al.* pour remplacer les méthodes reposant sur les dérivations au DNPH ou à l'acétylacétone⁶⁰. Cette méthode utilise une sonde, c'est-à-dire un composé chimique sensible et sélectif au formaldéhyde. En effet cette sonde ne réagit pas avec les autres aldéhydes. Elle présente aussi l'avantage d'être soluble dans l'eau et l'éthanol. Elle permet donc une quantification rapide et facile du formaldéhyde⁶⁰.

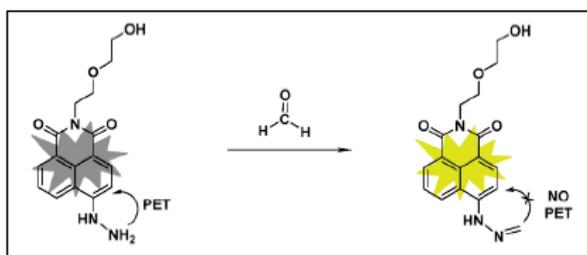


Figure 14 : réaction entre le formaldéhyde et une sonde basée sur la fluorescence⁶⁰. PET correspond au transfert d'électrons photo-induit.

Cette méthode utilise le transfert d'électrons photo-induit (PET) de la Figure 14. Dans la sonde, un électron excité est transféré du donneur (doublet non liant de l'azote) à l'accepteur (le cycle aromatique)⁶¹. Ensuite, par réaction avec le formaldéhyde, les niveaux d'énergies sont modifiés. Par conséquent, le composé formé, de couleur jaune, ne permet plus le transfert d'électron précédent. Ainsi, l'électron excité va descendre dans le niveau d'énergie inférieur en libérant son excès d'énergie sous forme d'un photon et donc de lumière fluorescente. Concrètement, l'extrait de cuir est mélangé à cette sonde et laissé pour incubation⁶⁰. Le maximum d'intensité en fluorescence à 553 nm est atteint après 1h de réaction⁶⁰.

Tableau 2 : comparaison des concentrations en formaldéhyde obtenues, du temps et des limites de détection avec la nouvelle méthode FAB-1 avec la méthode au DNPH et avec celle à l'acétylacétone, adaptée de⁶⁰

Méthodes	Concentration en formaldéhyde (µg/L)	Temps (h)	Limite de Détection (µg/L)
Sonde fluorescente	592 ± 110	1	30
ISO 17226-1 (DNPH)	674 ± 62	1-3	13
ISO 17226-2 (acétylacétone)	2 698 ± 130	>1	60

Cette méthode est comparée aux méthodes au DNPH et à l'acétylacétone dont les modes opératoires sont proches des normes ISO 17226-1 et ISO 17226-2⁶⁰. Ainsi, 3 prélèvements sont effectués sur un cuir de mouton tanné avec des aldéhydes, ils sont analysés par chaque méthode pour déterminer la moyenne des teneurs en formaldéhyde et les incertitudes associées⁶⁰. Les résultats des trois méthodes sont représentés dans le Tableau 2. La nouvelle méthode et la méthode de dérivation au DNPH conduisent à des concentrations en formaldéhyde de 592 ± 110 µg/L (correspondant à 29,6 ± 5,5 mg/kg) et 674 ± 62 µg/L (correspondant à 33,7 ± 3,1 mg/kg) respectivement. Ces deux méthodes donnent donc des résultats comparables. La dérivation à l'acétylacétone est sujette à des problèmes d'interférences, provoquant une surestimation d'un facteur 4 de la teneur en formaldéhyde de ce cuir⁶⁰.

La sonde fluorescente permet une réaction avec le formaldéhyde en 1h ce qui est plus rapide ou au moins aussi rapide que les autres méthodes. De plus, cette sonde permet d'atteindre une limite de détection de 30 µg/L ce qui est 2 fois plus bas que la norme ISO 17226-2 mais 3 fois plus élevé que la norme ISO 17226-1.

3 Vers une modification de la norme ISO 17226-1 : 2019

3.1 Les paramètres et limites de la norme ISO 17226-1 2019

Plusieurs paramètres de la norme ISO 17226-1 ont une influence significative sur la teneur en formaldéhyde mesurée et certaines modifications de cette norme ont été proposées.

Cuadros et son équipe rappellent que la norme ISO 17226, pour l'extraction, ne précise pas les conditions d'agitation et propose d'utiliser du dodecyl sulfonate de sodium ou comme alternative moins onéreuse du dodecyl sulfate de sodium⁶². Les teneurs en formaldéhyde obtenues en utilisant le dodecyl sulfonate de sodium ou du dodecyl sulfate de sodium sont comparées et mènent pour les deux parties de la norme à des résultats non significativement différents⁶².

De plus, l'agitation magnétique et l'agitation linéaire sont comparées pour étudier leur influence sur la teneur en formaldéhyde mesurée⁶². La Figure 15 montre que l'agitation magnétique donne des résultats plus élevés que l'agitation linéaire. Comme la différence entre les deux méthodes d'agitation est significative, le mode d'agitation devrait être précisé dans la norme⁶².

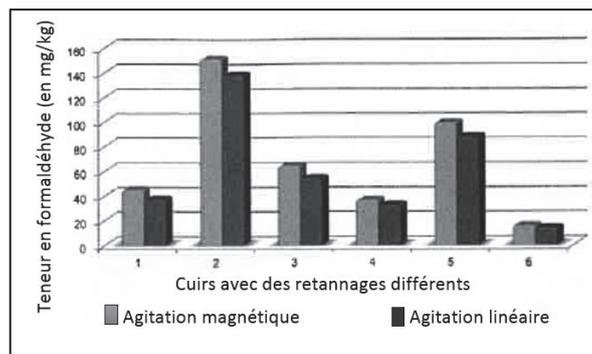


Figure 15 : teneurs en formaldéhyde obtenues avec la norme ISO 17226-2 après une extraction avec agitation magnétique ou linéaire⁶²

L'influence de l'attente des échantillons dérivés sur le passeur d'échantillons avant analyse chromatographique a été étudiée⁶². La Figure 16 montre que la teneur en formaldéhyde mesurée augmente au cours du temps de réaction fixé entre 1h et 3h⁶². La teneur en formaldéhyde peut atteindre jusqu'à 10 mg/kg supplémentaires, soit une augmentation de 40% pendant cette fourchette de temps, par exemple pour un cuir tanné avec du chrome et retanné avec différents produits incluant la résine mélamine⁶². L'explication se trouve dans l'étape d'extraction qui extrait le formaldéhyde libre mais aussi les résines (comme les résines mélamine et dicyandiamide) dont certaines sont capables de libérer le formaldéhyde par hydrolyse⁶². Ainsi, plus le temps d'attente est long plus le formaldéhyde peut être libéré par hydrolyse puis dérivé par l'excès de réactif et donc plus la concentration en formaldéhyde mesurée est élevée⁶². Cette étude montre une surestimation possible de la teneur en formaldéhyde pour certains cuirs, ceux contenant des résines capables de libérer le formaldéhyde par hydrolyse. Les auteurs suggèrent de réduire le laps de temps entre la dérivation et l'analyse⁶².

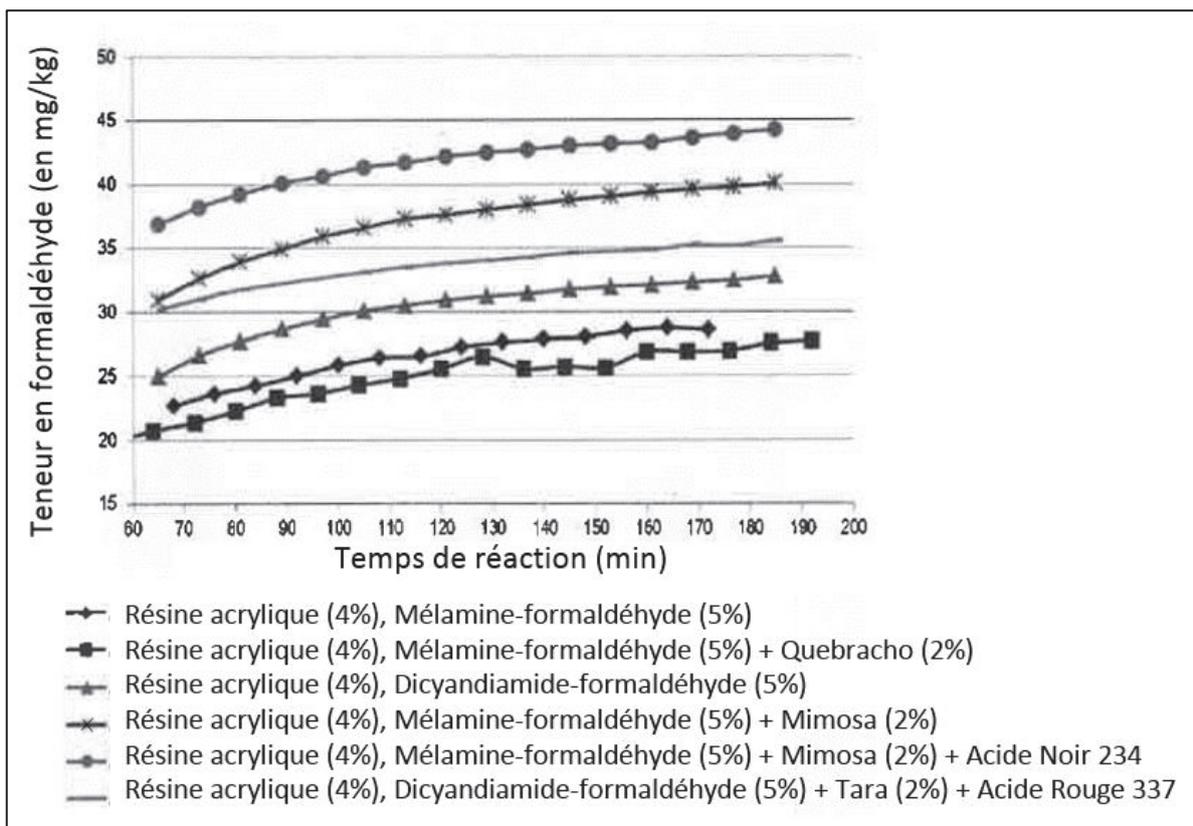


Figure 16 : teneurs en formaldéhyde en fonction du temps de réaction avec le DNPH⁶²

Une autre étude menée par M. Kleban souligne également ce problème. Lorsque l'analyse n'est pas réalisée directement après une heure de dérivation, elle peut mener à de faux positifs⁴⁶.

Les spectres infrarouges de la Figure 18 montrent que le pic d'absorption caractéristique de la liaison $C\equiv N$ de la résine dicyandiamide (Figure 17) à 2170 cm^{-1} est présent dans l'extrait de cuir, confirmant sa co-extraction⁴⁶.

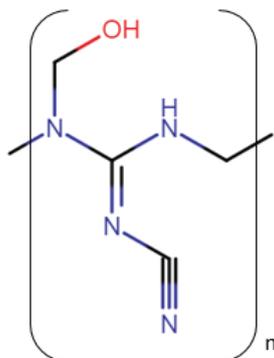


Figure 17 : structure de la résine dicyandiamide⁶³

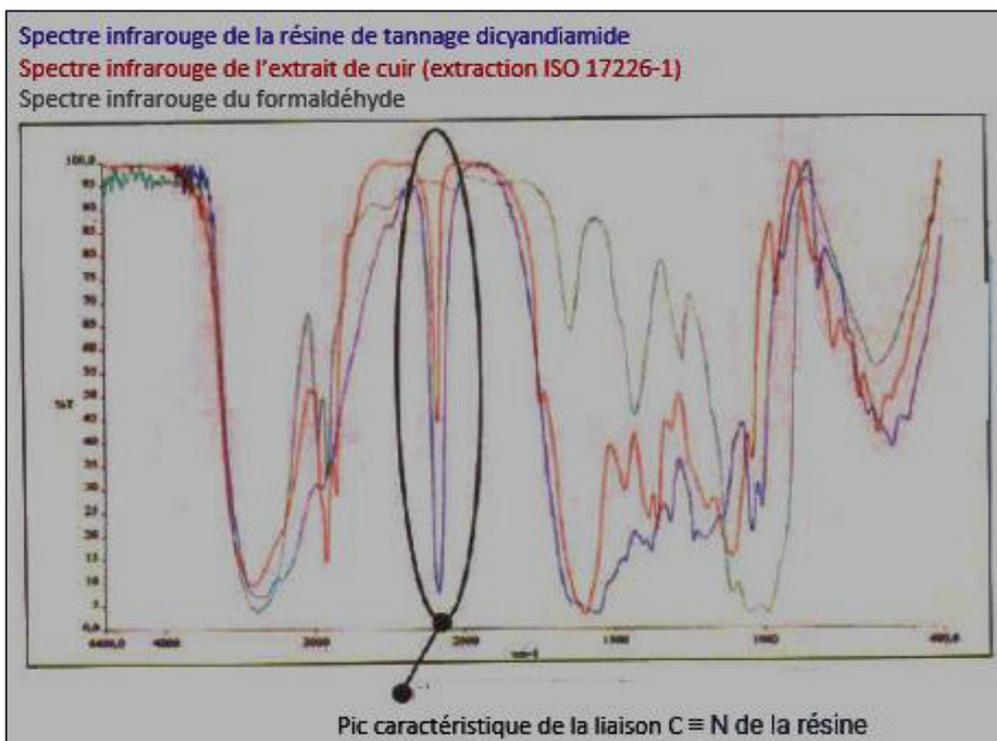


Figure 18 : spectre infrarouge de la résine de tannage (en violet), de l'extrait de cuir obtenu avec la norme ISO 17226-1 (en rouge) et celui du formaldéhyde (en gris), adapté de ⁴⁶

3.2 Enjeux de la modification de la norme ISO 17226-1 : 2019

Dans le but de pouvoir mesurer la concentration en formaldéhyde dans différents cuirs (y compris les cuirs retannés avec des résines synthétisées avec le formaldéhyde), la norme 17226-1 de 2019 doit être modifiée pour éliminer tout biais de quantification et permettre ainsi l'analyse de tous les cuirs, quel que soit leur procédé de fabrication.

3.3 Résultats expérimentaux pour la recherche de nouvelles conditions de dérivation

CTC utilise une méthode proche de la norme ISO 17226-1 de 2019 (Figure 19). Comme vu précédemment, cette norme est à préférer à la norme 17226-2 en cas de litige. De plus, cette norme permet de mesurer le formaldéhyde libre et le formaldéhyde devenu libre pendant l'étape d'extraction aqueuse, ce qui se rapproche le plus des conditions d'utilisation des produits finis (les chaussures en cuir, pouvant être en contact avec la pluie et la sueur).

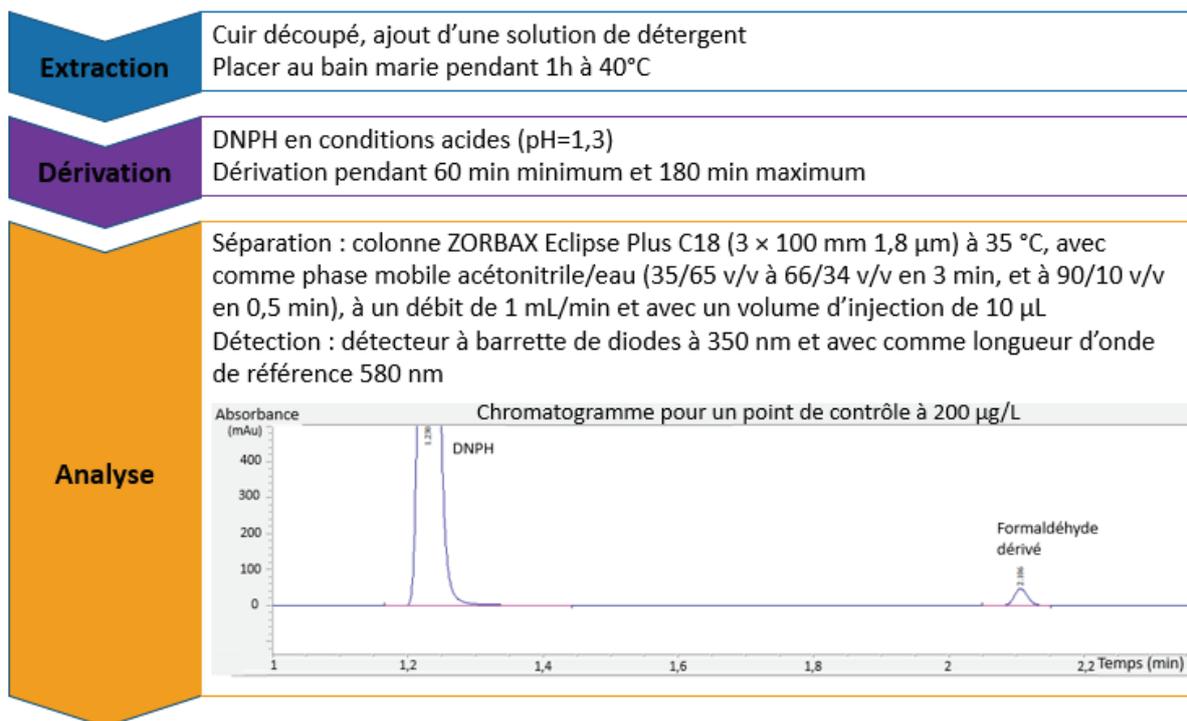


Figure 19 : résumé du mode opératoire (inspiré de la norme ISO 17226-1 2019) pour quantifier le formaldéhyde dans un échantillon de cuir avec la LC-DAD Agilent 1290

Tout d'abord, il est vérifié que le temps d'attente sur le passeur est un facteur amplifiant la disparité des résultats. Ensuite il est prouvé que la surestimation des résultats est due à la libération du formaldéhyde par hydrolyse, pendant la dérivation, de certaines résines co-extraites. Cette réaction d'hydrolyse est favorisée par les conditions acides qui sont nécessaires pour catalyser la réaction de dérivation. Le but est de trouver de nouvelles conditions de dérivation permettant d'empêcher l'hydrolyse des résines au cours de la réaction de dérivation afin de supprimer les biais de quantification. Ainsi, plusieurs conditions de dérivation sont testées sur l'analyse de pseudo-extraits de résines. Seules les conditions sans acidification permettent une teneur en formaldéhyde mesurée indépendante du temps d'attente sur le passeur en empêchant l'hydrolyse des résines. Ces nouvelles conditions de dérivation sont ensuite mises en œuvre pour la quantification du formaldéhyde dans les cuirs (présentés en Annexe 2). Grâce à ces nouvelles conditions de dérivation, les teneurs en formaldéhyde mesurées sont conformes aux valeurs attendues et ne présentent aucune dérive au cours du temps, quel que soit le moment où est effectué l'analyse.

D'autre part, une méthode utilisant une dérivation en ligne à l'acétylacétone permet également d'empêcher l'hydrolyse des résines. En effet, l'échantillon est alors injecté, dérivé et directement détecté par UV. L'ensemble de ces expériences est présenté dans l'article suivant. Ce dernier a été publié le 7 décembre 2020 dans le journal *Molecules*, section « Analytical Chemistry ».

Towards a Non-Biased Formaldehyde Quantification in Leather: New Derivatization Conditions before HPLC Analysis of 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivatives

Caroline Bourgeois ^{1,*}, Nicolas Blanc ¹, Jean-Claude Cannot ¹ and Claire Demesmay ²

¹ CTC, Comité Professionnel de Développement Economique, Cuir, Chaussure, Maroquinerie, Ganterie, 4 Rue Hermann Frenkel, 69007 Lyon, France; nicolas.blanc@ctcgroupe.com (N.B.); jccannot@ctcgroupe.com (J.-C.C.).

² Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 Rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France; claire.demesmay-guilhin@univ-lyon1.fr

* Correspondence: caroline.bourgeois15@gmail.com

Received: 2 November 2020; Accepted: 28 November 2020; Published: 1 December 2020

Abstract: In leathers, formaldehyde is currently analyzed according to EN ISO 17226-1 standard, by reversed phase liquid chromatography after off-line precolumn derivatization with 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) in strong acidic conditions. We first demonstrate that this standard is not adapted to leather retanned with resins likely to release formaldehyde by hydrolysis. Indeed, formaldehyde content may be largely overestimated due to concomitant resin hydrolysis (in harsh acidic conditions) that releases formaldehyde during the derivatization step and during the waiting time on autosampler before analysis. Therefore, we thoroughly studied the derivatization step in order to propose new derivatization conditions. Replacing orthophosphoric acid by less acidic buffer solutions is not enough to avoid hydrolysis. A derivatization without adding acid is realized by solubilizing DNPH in acetonitrile instead of orthophosphoric acid. These conditions lead to a complete derivatization of formaldehyde in 3 h at 50 °C (in a water bath) while avoiding the hydrolysis of co-extracted dicyandiamide and melamine resins. The as-obtained leather extracts are stable over time. Formaldehyde contents found with this method agree with the formaldehyde content measured immediately at the end of derivatization reaction in standard conditions or with formaldehyde content measured by a home-designed flow injection analysis with acetylacetone online derivatization and UV detection.

Keywords: formaldehyde; leather; derivatization; DNPH derivatives; liquid chromatography

1. Introduction

The European commission regulation No 605/2014 classifies formaldehyde as a class 1B carcinogen. Indeed, formaldehyde is dangerous: it is flammable, irritating for the respiratory tract, skin, eyes [1], and may cause an allergic skin reaction [2]. Despite its dangerousness, formaldehyde is used in various industrial fields such as the wood [3], cosmetic [2], textile [4], and leather industries [5–7].

In leather, formaldehyde was previously used for tanning or finishing because of its crosslinking properties [8]. Nowadays, it is mainly used to synthesize quick and easy to use tanning agents (such as dicyandiamide and melamine resins) that give suitable properties to leather [9]. Such dicyandiamide and melamine resins are synthesized by C-N bond formation during polycondensation of dicyandiamide and melamine with formaldehyde. This reaction is known to be reversible: hydrolysis (for example consecutive to rain or perspiration [5]) can cleave these bonds and releases formaldehyde by nucleophilic substitution reaction [5,8]. This releasable formaldehyde is considered as free formaldehyde, which means it is not leather bound to any degree [10]. Therefore, formaldehyde can be found in the leather final product (resins used as tanning agents may contain residual free formaldehyde) but it can also be released during the use of the final leather product.

In leather, formaldehyde could generate allergic skin reaction by skin contact [2]. That is why there are various regulations concerning formaldehyde in leather depending on country and final use. For example, in China (GB 20400), the formaldehyde concentration limit is 20 ppm in leather for children products, 75 ppm for products in direct contact with skin and 300 ppm for products without skin contact. In Europe, there is currently no concentration limit for formaldehyde in leather except for toys, starting from May 2021. For leather or textile toy materials, the European Commission has set the formaldehyde content limit at 30 ppm (COMMISSION DIRECTIVE (EU) 2019/1929).

Therefore, it is of paramount importance to have an analytical method to reliably determine the formaldehyde content in leather. To check regulatory requirements, the EN ISO 17226-1 Standard is the Official Method in the case of leather. It is an analytical method for measuring free formaldehyde and released formaldehyde in leather. The formaldehyde content measured with this standard is defined as “the quantity of free-formaldehyde and formaldehyde extracted through hydrolysis contained in a water extract under standard conditions”. This standard is divided into two parts that aim at measuring formaldehyde in leather samples and should give the same “trend”. In both parts, the initial phase of extraction of formaldehyde present in leather is the same and it is carried out with a suitable detergent solution at 40 °C (1 h stirring in a water bath). The temperature and duration of this extraction step have to be respected because an increase in temperature and/or in time triggers an increase in formaldehyde content [8,11]. The physical state of the sample has also to be strictly controlled as it may have an influence on the formaldehyde content measured [11]. The two parts of the standard implement different quantification procedures to quantify the released formaldehyde. The part 2 is the oldest one whereas the part 1, the latest one, should be used in the case of dispute. In part 2, formaldehyde is off-line derivatized with acetylacetone in mild acidic conditions and the obtained derivative is directly analyzed by colorimetry at 412 nm without any separation step. Some dyes may trigger interferences [12]. Moreover, free formaldehyde can be generated during the heating

step required for the derivatization procedure and derivatives are not stable (photodegradable) and should be analyzed immediately.

In part 1, the quantification of the formaldehyde extracted from leather is carried out by reversed phase HPLC-UV after an off-line pre-column derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). In this part, spectrophotometric interferences can be avoided. Indeed, the off-line pre-column derivatization with DNPH is followed by a liquid chromatographic separation. The introduction of a separation step alleviates spectrophotometric interferences and allows decreasing the limit of quantification [13–15] when compared with part 2. Regarding the chromatographic step of part 1, the standard specifies that samples must be analyzed by chromatography one hour after the beginning of the derivatization (probably for derivatization kinetic purposes) but not more than three hours after the beginning of the derivatization. According to Wu et al. [16] derivatives need to be analyzed soon after reaction due to instability of derivatives. According to Cuadros et al., the hydrolysis of coextracted resins could occur, which could trigger an increase of formaldehyde concentration [17]. Indeed, samples analyzed at the end of the sequence usually present a higher formaldehyde content [17]. According to these authors, some resins (like melamine or dicyandiamide) can be co-extracted during the extraction step and then they can release formaldehyde by hydrolysis over time [17]. For example, for a leather tanned with chromium and retanned with various products including melamine resin, these authors reported a formaldehyde concentration increase of about 25% between extreme recommended analysis time-frame (60 and 180 min) [17].

Considering the chromatographic analysis duration is about 10 min, no more than 15 samples can be analyzed during these 2-h periods of the standard, thus limiting the number of samples to be analysed in one routine sequence. Moreover, one might legitimately wonder about the selection of this specific time frame and about the accuracy of the obtained results. Being stricter on setting the reaction time between dinitrophenylhydrazine and formaldehyde extracted from leather, as recommended by Cuadros [17], does not appear sufficient to ensure the accuracy of the results.

In order to measure non-biased formaldehyde concentrations in leathers (including leathers retanned with formaldehyde-based resins), the standard 17226-1 should be modified with an analytical method more reliable whatever leather preparation. Considering that resins are probably hydrolysed in the acidic media used during the derivatization step, the derivatization conditions have to be modified to avoid such hydrolysis.

The first purpose of this study is to demonstrate that an accurate and non-biased determination of formaldehyde in leathers is not possible with the actual standard EN ISO 17226-1 even in the recommended time-frame and that the hydrolysis of co-extracted resins is responsible for the overestimation of formaldehyde content. New derivatization conditions are then explored to ensure a quantitative and reproducible derivatization of formaldehyde with DNPH while suppressing the

hydrolysis of co-extracted resins. The accuracy of the obtained results is then demonstrated by using an original home-designed FIA-UV method with an on-line derivatization with acetylacetone.

2. Results and Discussion

2.1. Analysis of Samples Based on EN ISO 17226-1 Standard Conditions: Influence of the Time Frame between Derivatization and Analysis on the Formaldehyde Content

In the standard EN ISO 17226-1, samples are derivatized in a strong acidic media (with DNPH solubilized in orthophosphoric acid) immediately after the extraction step. According to this standard, the recommended time frame within they have to be analysed by reversed phase liquid chromatography is set between 1 h and 3 h after the beginning of the derivatization.

In order to study the influence of this time frame (sample waiting time on the autosampler tray), formaldehyde was analyzed in leather samples immediately after preparation of the derivatization flask, and then repeatedly during the time-frame allowed by the standard (1 to 3 h) and also after a longer period of time. Three different leather samples were selected for this study: all of them were tanned with Cr III but they were subjected to different retanning protocols. Two of them (B and C) were retanned with formaldehyde-based resins, whereas the third one (A) was retanned without any resin. These two resins were selected due to their ability to release formaldehyde by hydrolysis.

As can be observed in Figure 1, and as expected, the measured formaldehyde content is higher for the two leathers retanned with resins than for the one retanned without resin (resins contain residual free formaldehyde). One may also observe that for the two leathers retanned with resins, the formaldehyde content continuously increases over time (even during the period allowed by the standard i.e., between 1 h and 3 h after the beginning of the derivatization reaction), whereas it is stable for the leather retanned without any resin. This increase (during the time frame recommended by the standard) is limited to about 10% for the leather retanned with melamine resin but is more pronounced and reaches 25% for the leather retanned with dicyandiamide resin. If the time spent on the autosampler tray further increases, the amount of formaldehyde increases too. 4.5 h after the beginning of the derivatization reaction (it is like the sample is at the end of a 4.5 h sequence of about 30 samples), formaldehyde content measured for the leather retanned with dicyandiamide resin is 30% higher than the one measured three hours earlier. Conversely, the formaldehyde content measured for the leather retanned without any resin is stable over time. If no issues are observed for the extracts from leathers retanned without resins, results obtained for leathers retanned with resins are open to dispute: the formaldehyde content measured according to the standard greatly depends on the time at which measurements are realized. And even more worrying, is the great increase between 0 and 1 h of derivatization for the two leathers retanned with resins: about +100% for the melamine-retanned leather and up to +160% for the dicyandiamide-retanned leather. Such an increase

may be related to the progressive hydrolysis of co-extracted resins since it only occurs for leathers retanned with resins. These results suggest that the standard is not adapted for the determination of formaldehyde in leathers retanned with resin and that a strict control of the time at which measurements are realized is not enough to guarantee an accurate determination of formaldehyde.

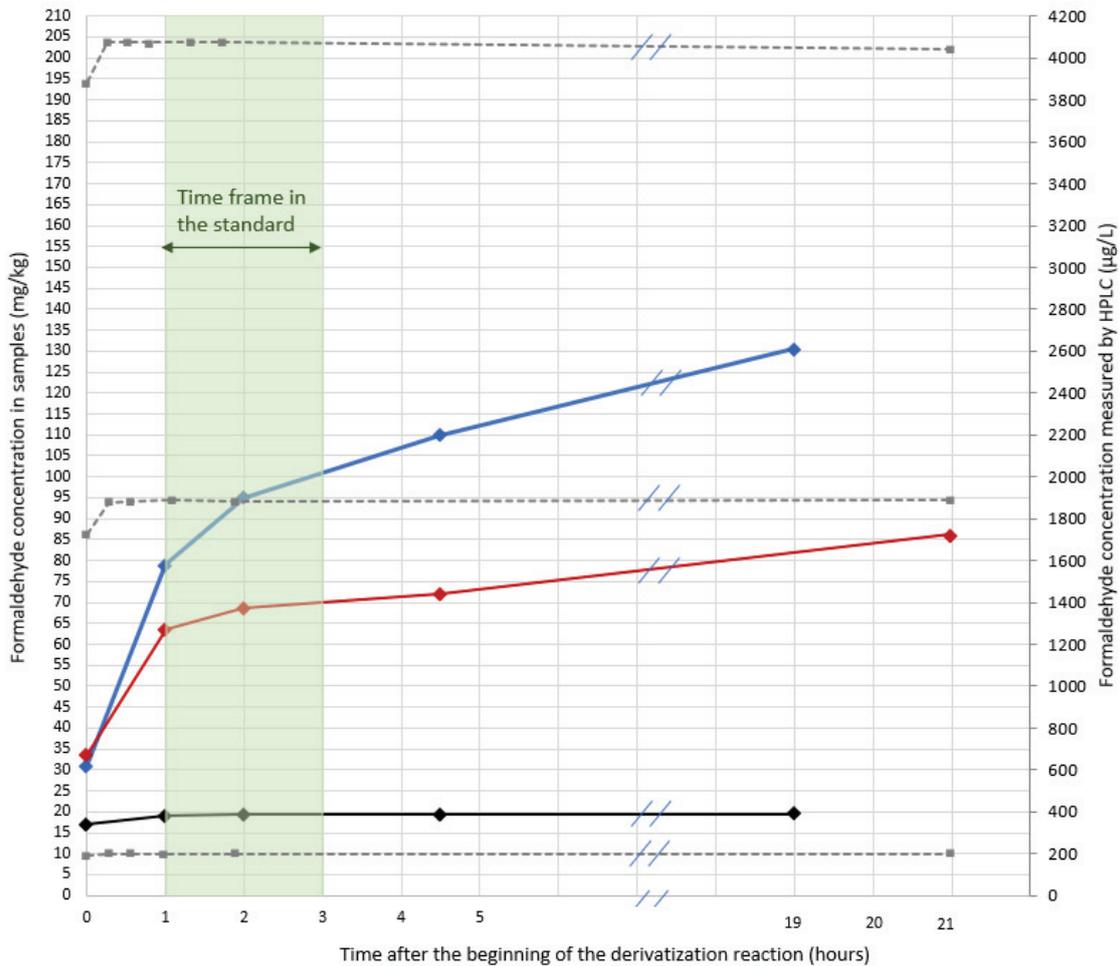


Figure 1. Formaldehyde content over the DNPH derivatization reaction time for lamb leathers tanned with chrome and retanned without resin (in black), with dicyandiamide resin (in blue) or with melamine resin (in red). Samples: prepared, extracted and derivatized following EN ISO 17226-1 standard conditions and analyzed at various time. The green area: the time frame allowed by the standard to analyze samples after their derivatization. Kinetic study of derivatization reaction with quality controls (QC) 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (in grey dotted lines).

It was first verified that the variation of the formaldehyde content during the first hour was not related to kinetic issues (incomplete reaction) for the leathers containing higher amounts of formaldehyde (those for which a great increase is observed over time). Standard solutions at 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of formaldehyde were prepared in the extraction media and then subjected to derivatization and chromatographic analysis. Standard solutions were analyzed immediately after preparing the derivatization flask (sample injected immediately after preparing the derivatization flask) and over time (until 19 h after the beginning of the reaction time).

The results (Figure 1) clearly show that whatever the concentration of the quality controls ranging between 200 to 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ the derivatization is complete in less than 15 min and the amount of formaldehyde quantified is independent of the time laps between derivatization and quantification. Results also demonstrate that no degradation of the derivatives occurs as mentioned earlier in the literature [13]. So, the increase of formaldehyde content previously observed in some resin-retanned leathers during the waiting time on the autosampler tray is related to the presence of resins. These results agree with the trends described by Cuadros et al. [17]. In order to further this assumption, other experiments were carried out by simulating extraction and derivatization with resins.

2.2. Quantification of Formaldehyde in Dicyandiamide and Melamine Resin Pseudo-Extracts

The formaldehyde content in the formaldehyde-based resins used was determined by an adaptation of the EN ISO 17226-1. A given amount of formaldehyde-based resin (0.04 g) was pseudo-extracted with sodium dodecyl sulphate solution. Once extracted and after filtration, an aliquot of the filtrate (pseudo-extract) was reacted with dinitrophenylhydrazine and, afterwards, the derivative was quantified by HPLC. Chromatographic analyses were realized immediately after preparing the derivatization flask and over the time.

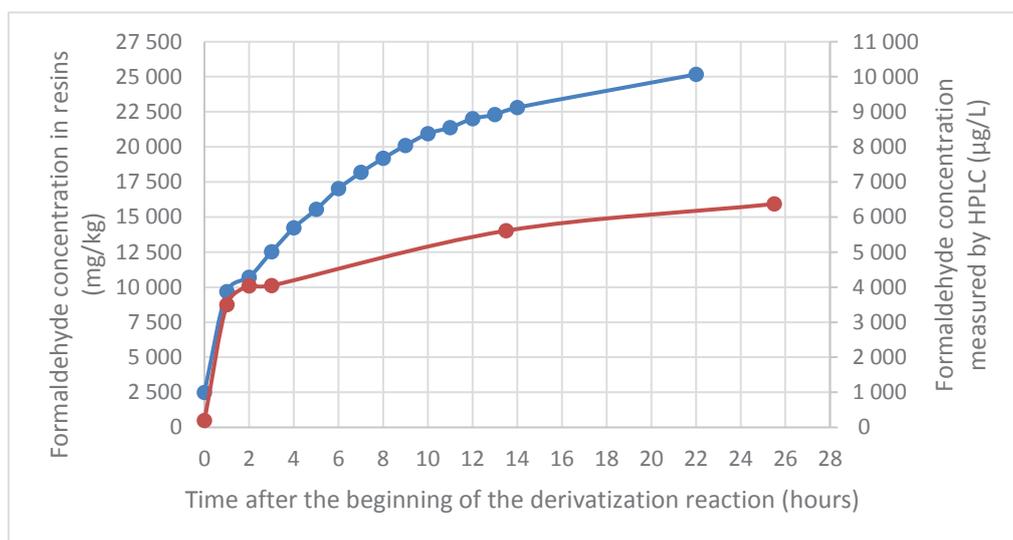


Figure 2. Formaldehyde content in dicyandiamide resin (in blue) and in melamine resin (in red) over the time. Resins (0.04 g) prepared, extracted (50 mL of 0.1% dodecane-1-sulfonic-acid aqueous solution) and derivatized following standard conditions used for leather (EN ISO 17226-1) and analyzed at various time.

For both resins, formaldehyde concentration in pseudo-extracts increases over time especially for dicyandiamide resin (Figure 2). However, it is not a kinetic problem, as seen previously, the reaction is almost immediate. Consequently, the increase is only due to the resin hydrolysis in pseudo-extracts over time and the subsequent derivatization of the formaldehyde released. The hydrolysis is very rapid during the first hour and continues for 24 h.

To guarantee a reliable determination of the formaldehyde content in leathers, it is necessary to find derivatization conditions limiting the hydrolysis of the resins. As trends were similar for melamine resins and dicyandiamide ones, only dicyandiamide resins were studied thereafter.

2.3. New Derivatization Conditions for the Analysis of Formaldehyde in Dicyandiamide Resin

New conditions for DNPH derivatization reactions are necessary as being stricter on setting the reaction time is not enough to guarantee an accurate value of the formaldehyde content. The goal is to avoid resin hydrolysis in order to have a formaldehyde content as defined in EN ISO 17226-1 standard (formaldehyde content is the addition of “free formaldehyde” and “formaldehyde hydrolysed during extraction to produce free formaldehyde”) and this content has to be stable over time. In the EN ISO 17226-1 standard conditions, the DNPH is in an orthophosphoric acid solution. Harsh acidic conditions (the pH in the derivatization flask is about 1.3) are known to catalyse the derivatization reaction with DNPH but also to favour resin hydrolysis [18]. The first alternative consists in using less acidic and/or buffered media. Buffered conditions could be valuable to avoid pH changes that could take place with some leather extracts differing in pH. Therefore, buffered solutions were first evaluated as derivatization media. Since DNPH is not soluble in water, it was first solubilized at high concentration in acetonitrile (stock solution) and then a small aliquot of this stock solution was mixed with buffered solutions. Another alternative evaluated was to work in non-buffered or acidified solutions (buffer replaced by water).

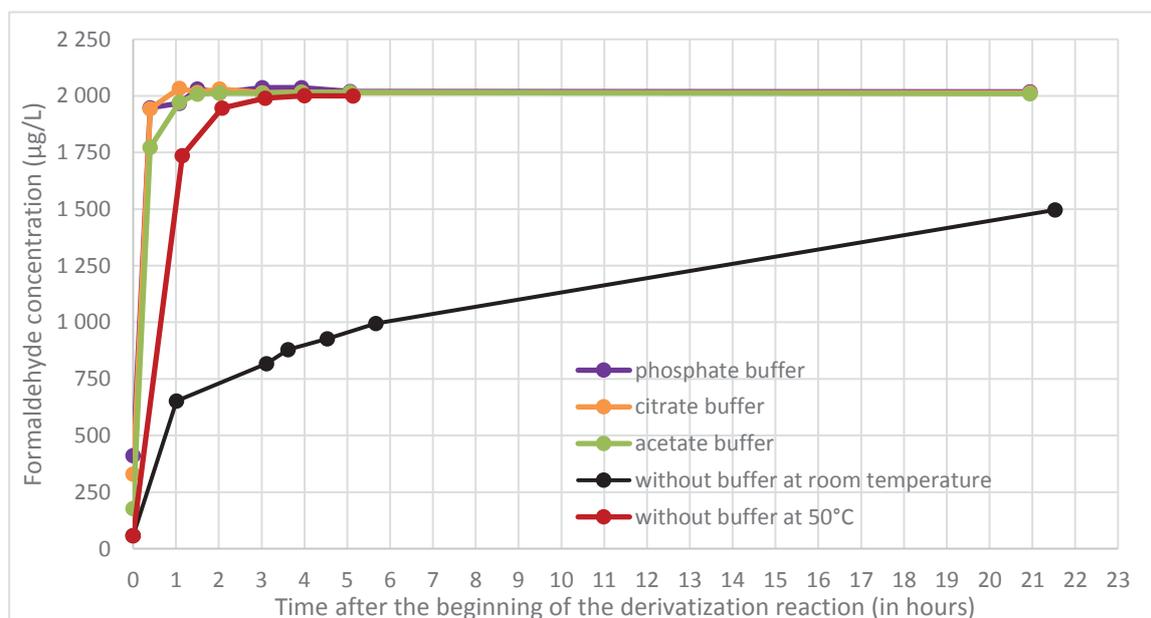


Figure 3. Reaction kinetic on 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ quality control for different derivatization conditions: in purple with phosphate buffer, in orange with citrate buffer, in green with acetate buffer and without adding acid in black (at room temperature) and in red (at 50 °C in a water bath).

First, the kinetics of derivatization step was studied at high concentration level (2000 $\mu\text{g L}^{-1}$) with quality control prepared in the extraction medium. In buffered acidic conditions (phosphate, citrate, and acetate buffer) respectively at pH 2.12, 3.13, and 4.75 the reaction required about 1 to 1.5 hours to be complete and the derivative was stable over a long period (at least 21 hours). In Figure 3, no significant difference in derivatization kinetics was observed for pH ranging from 2.12 to 4.75. Without any acidification, the reaction required about 2–3 days for completion at room temperature but could be catalysed by heating at 50 °C (with a water bath) to be complete in only 3 h. Following table sums up the different reaction times required to complete the derivatization reactions in all conditions tested (Table 1).

Table 1. pH, concentration, DNPH derivatization reaction time and temperature depending on buffer solutions added.

Buffer Solution	Buffer Solution pH (pH = pKa)	Final Buffer Concentration (mol/L)	Time Necessary to Have a Complete Reaction	Temperature (°C)
Phosphate	2.12	0.1	1.5h	Room temperature
Citrate	3.13	0.1	1h	Room temperature
Acetate	4.75	0.1	1.5h	Room temperature
Without buffer	-	-	3 days	Room temperature
Without buffer	-	-	3h	50°C

These optimized derivatization conditions were then tested for the dicyandiamide resin and the results compared with those obtained in harsh acidic conditions. Indeed, our objective was to find conditions for which the derivatization is rapid and for which the waiting time before the chromatographic analysis has no influence on the final formaldehyde content measured. For each condition tested, formaldehyde was analyzed in pseudo-extracts of dicyandiamide resins immediately at the end of the derivatization reaction (just after the time required to complete reaction) and after various waiting times on the tray in order to see the influence on resin hydrolysis. All conditions were assayed the same day. It means derivatizations were realised on different aliquots of the same resin pseudo-extract.

Decreasing the pH of the derivatization medium allows reducing hydrolysis whatever the conditions tested (Figure 4). The increase of buffered solution pH triggers a decrease of resin hydrolysis during derivatization and a decrease of formaldehyde content at the end of derivatization reaction. Regarding the evolution over time of the formaldehyde content determined in dicyandiamide resin pseudo-extracts (Figure 4), it increases for all conditions with acidic buffers (thus indicating that hydrolysis of

the resin still occurs during the waiting time). Conversely, derivatization conditions without adding any acid gives a stable formaldehyde concentration whatever the waiting time.

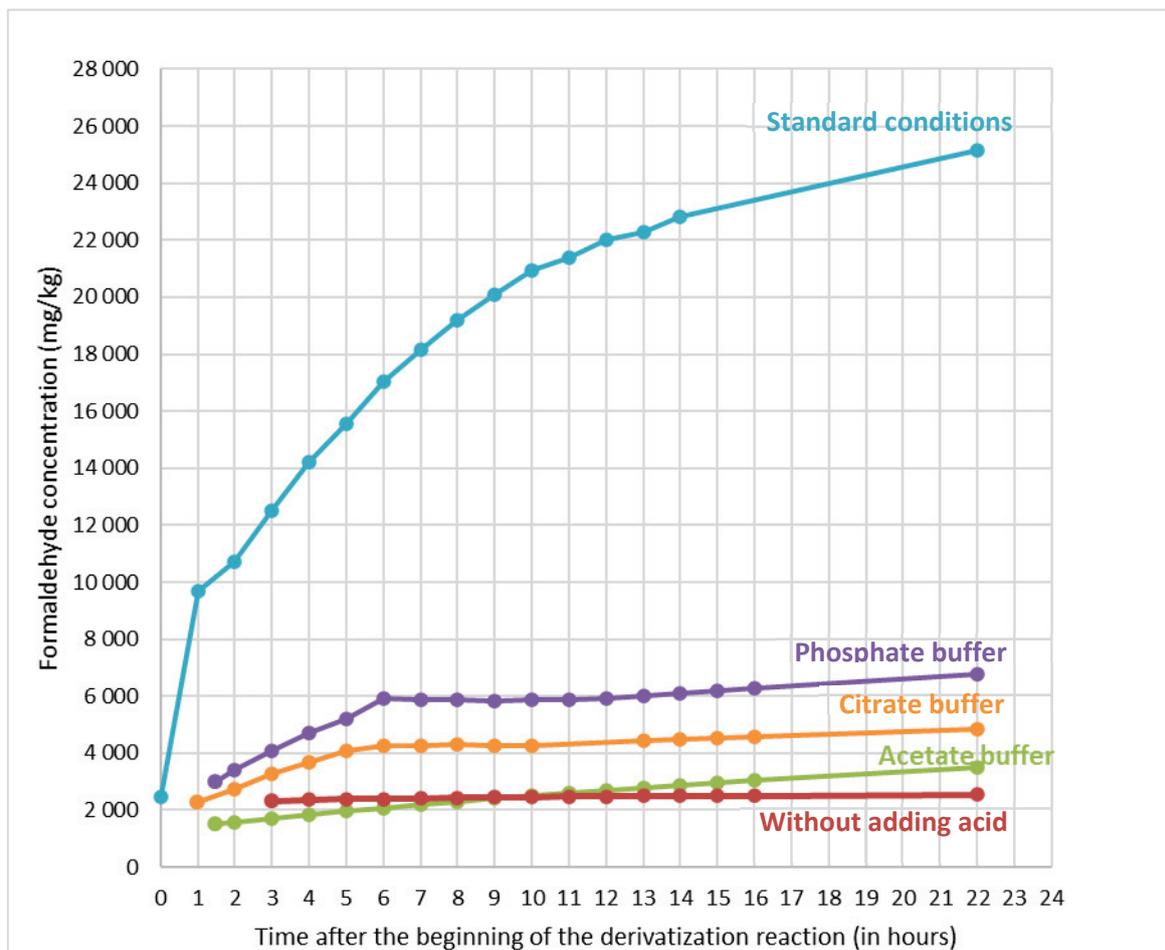


Figure 4. Formaldehyde content measured in dicyandiamide resin pseudo-extracts over derivatization reaction with DNPH in different derivatization conditions: in blue in standard conditions (EN ISO 17226-1), in purple with phosphate buffer, in orange with citrate buffer, in green with acetate buffer and in red without adding acid.

Figure 5 shows that the formaldehyde content (9670 mg/kg) measured in standard conditions (harsh acidic conditions) after 1 hour of derivatization (beginning of the recommended time frame) is 4 times as much as the formaldehyde content (2490 mg/kg) determined immediately at the end of the derivatization reaction (the reaction is complete in few minutes). For non-buffered conditions at 50 °C, the amount of formaldehyde determined in resins is of the same order of magnitude than the one determined in buffered conditions or in harsh acidic conditions immediately after preparing the derivatization flask.

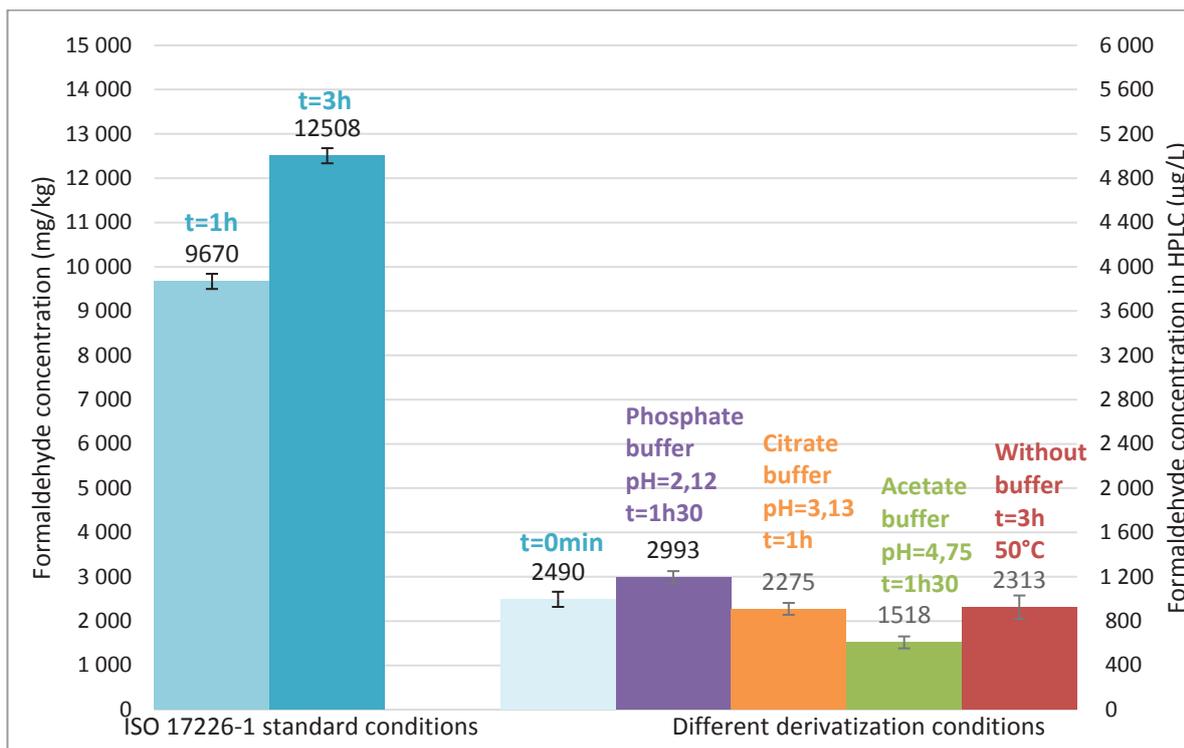


Figure 5. Formaldehyde content (residual free formaldehyde contained in the resin and formaldehyde resulting from resin hydrolysis) for dicyandiamide resin (0.04 g in 50 mL of 0.1% dodecane-1-sulfonic-acid aqueous solution) obtained at the end of reaction in different DNPH derivatization conditions. Uncertainties given as two standard deviations (calculated with three measurements: three independent derivatizations).

As a conclusion, buffered and less harsh acidic conditions did not succeed in avoiding resin hydrolysis even if it was less pronounced. Conversely, conditions with DNPH solubilized in acetonitrile (and without adding any acid) succeeded in avoiding resin hydrolysis: the formaldehyde content measured over time did not vary. Consequently, in these conditions, samples could be analysed few hours after their preparation without any bias related to the waiting time.

2.4. Determination of Formaldehyde in Leathers by New Derivatization Conditions

The three leathers (containing or not resins) were analyzed with this new derivatization method (3 h in a water bath at 50 °C with DNPH in acetonitrile). Results measured over time (dashed lines), are compared with results initially obtained with harsh acidic conditions (solid lines) of EN ISO 17226-1 standard (Figure 6).

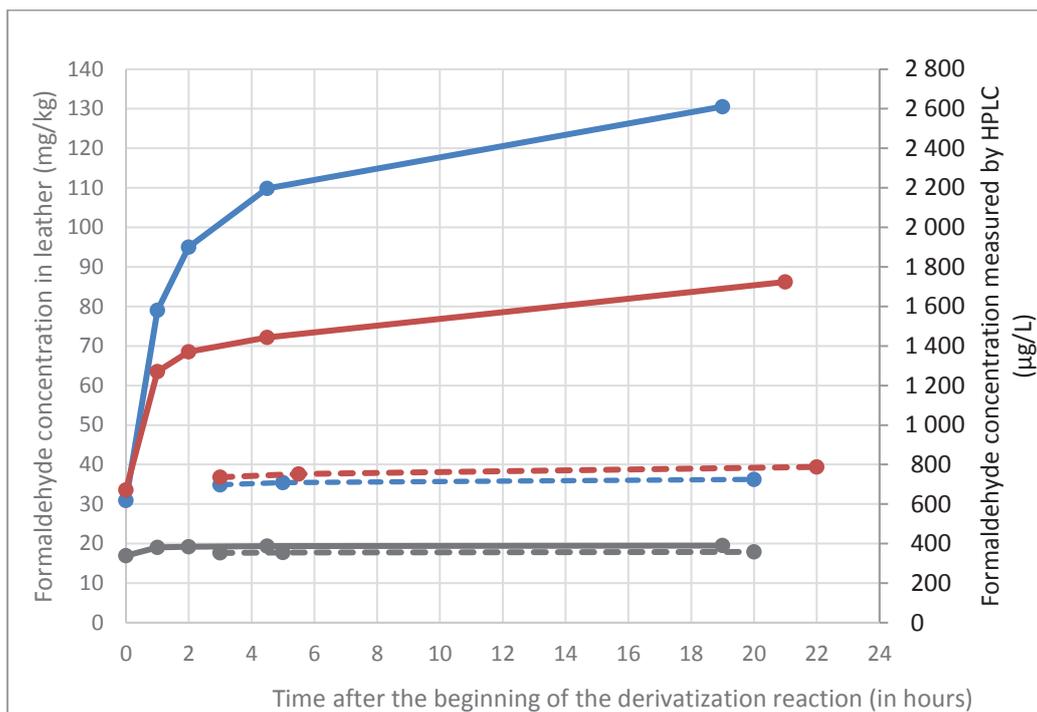


Figure 6. Formaldehyde content over DNPH derivatization reaction time; two derivatization conditions used: EN ISO 17226-1 standard conditions (solid lines), DNPH in acetonitrile at 50 °C during 3 h (dashed lines); lambs tanned with chrome and retanned without resin (in black) or with dicyandiamide resin (in blue) or melamine resin (in red).

Comparable results are found for the three leathers with the new method and with EN ISO 17226-1 standard conditions directly after the beginning of the derivatization reaction. Contrary to standard conditions, for leathers retanned with resins, the new method gives a formaldehyde content stable over time by avoiding resin hydrolysis.

2.5. Another Alternative to the Standard: Analysis by FIA with On-Line Acetylacetone Derivatization

Another solution to avoid the delay time between derivatization and analysis (and the subsequent hydrolysis of resins co-extracted), could be an online derivatization. An online derivatization should be almost immediate, what is the case for the DNPH derivatization in harsh acidic conditions. However, such harsh acidic conditions are hardly compatible, in terms of chemical resistance of the pre-column reactor and tubing. Derivatization with acetylacetone (used in Part 2 of the standard) should be more adapted since the derivatization is implemented in mild conditions (at pH around 6) [19]. Furthermore, the absorption wavelengths of acetylacetone (412 nm) differs from the one of its derivatives with formaldehyde (295 nm). Thus, no chromatographic separation is more required provided that no dyes trigger interferences [12]. An on-line flow injection analysis set-up with on-line derivatization was home-designed. The flow injection analysis (FIA) with on-line derivatization was implemented with a LC-2040C Shimadzu system (without column). The FIA solvent (water/acetonitrile, 15/85 v/v) flow rate was set at 0.25mL/min; the sample was injected (50 µL) via the autosampler and then on-line

derivatized with an acetylacetone solution pumped at 0.25 mL/min. After the mixing in a zero-dead volume mixing tee, the reaction occurred in a 0.5 mL reactor (PTFE tube 0.25mm i.d., 10 m in length), heated in an oven (column oven CTO-6A Shimadzu) at 90 °C. It corresponds to a derivatization duration of 1 min (the relative flow rates and the temperature were optimized to maximize the signal to noise ratio). Finally, the UV detection was achieved in the UV detector (cell volume 6 µL) at 412 nm. Because there is no delay between the end of the derivatization and the analysis, the resin hydrolysis should not occur during the derivatization. The three leathers studied did not have dyes that could generate interferences with acetylacetone derivatization. They were extracted according to the same protocol.

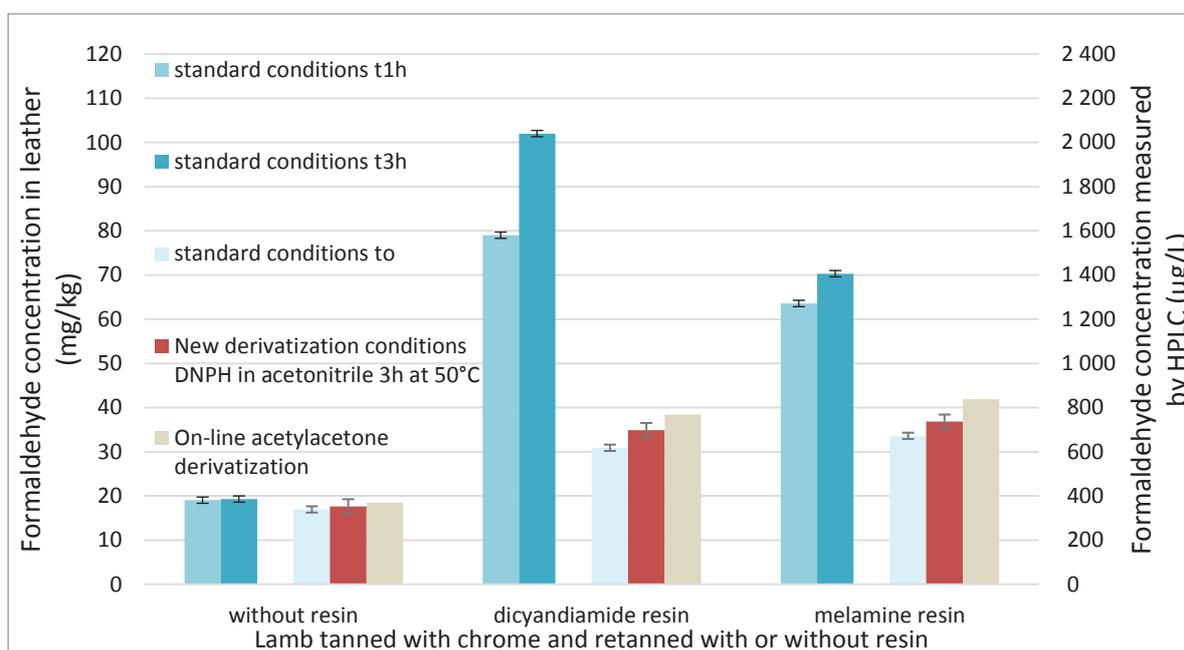


Figure 7. Comparison of three derivatization methods to determine formaldehyde in leathers: EN ISO 17226-1 standard conditions directly after the beginning of the derivatization reaction (in light blue), derivatization with DNPH in acetonitrile 3 h in a water bath at 50 °C (red) and acetylacetone derivatization with an online montage (in beige). For the standard conditions, the formaldehyde concentration analyzed during the time laps of the standard: in blue for 1 h and in dark blue for 3h after the beginning of the derivatization reaction. Uncertainties given as two standard deviations (calculated with three measurements: three independent derivatizations).

Figure 7 shows that for leather retanned without any resin, all the derivatization methods (the standard one, the method with modified derivatization conditions or modified time frame and the FIA method) lead to comparable results (about 20 mg of free formaldehyde per kg of leather) and can be indifferently used. It also demonstrates that the FIA method with on line derivatization is a viable alternative for the automated determination of the formaldehyde content of leathers free of dyes. The total analysis time of the FIA method, from the automated injection by the autosampler of the chromatographic system to the UV detection, is less than 2 min, thus allowing the analysis of 30 samples per hour.

All these methods were then applied to quantify formaldehyde in leathers retanned with resins (dicyandiamide and melamine ones). The same extract of each leather was used for all the methods using DNPH derivatization whereas another extract of the same leathers was used for the FIA method with acetylacetone. The obtained results clearly show that the FIA method, the standard conditions with an immediate analysis and the new derivatization conditions lead to comparable results. This different extract could explain the little deviation obtained with the acetylacetone derivatization. In order for the reaction to be quick enough, a high temperature in the reactor is needed, and this high temperature can hydrolyse resin according to the literature [12].

3. Experimental Procedures

3.1. Leather Samples and Resin Samples

Leather samples were prepared in the tannery of the French Technical Center for Leather, footwear and leather goods (CTC, Centre Technique Cuir, Chaussure, Maroquinerie, Ganterie). Three lamb leathers were tanned with chromium. Then, the first leather (A) was retanned without resin, the second one (B) was retanned with 6% dicyandiamide resin and the third one (C) with 6% melamine resin (6 kg of resin for 100 kg of squeeze skin leather). For confidential reasons, resin suppliers are not mentioned.

3.2. Chemicals

Water was produced by a Milli-Q Ultra-pure water purification system (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). For extraction: dodecane-1-sulfonic-acid sodium salt was obtained from Supelco (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). For DNPH derivatization: 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) was bought from Supelco (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), orthophosphoric acid 85+% and hydrochloric acid 37% were purchased from Fisher Chemical (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), glacial acetic acid and sodium hydroxide were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) and citric acid and sodium acetate were bought from Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

For acetylacetone derivatization: acetylacetone was purchased from Fluka (Thermo Fisher Scientific Illkirch-Graffenstaden, France), glacial acetic acid, and ammonium acetate were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

For chromatography: Acetonitrile (HiperSolv gradient grade) was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), quality controls and calibration are made with a solution of formaldehyde 100 µg/mL in water purchased from AccuStandard (Techlab, Metz, France) and with a formaldehyde-2,4-DNPH solution 100 µg/mL in acetonitrile purchased from Supelco (Merck).

Buffers solutions, were prepared at 2 mol L⁻¹. Orthophosphoric acid 85+% and citric acid were respectively used for the preparation of phosphate solution (pKa = 2.12) and citrate solution (pKa =

3.13). For each buffer solution a suitable amount of sodium hydroxide was added to reach pKa. For the acetate buffer solution (pKa = 4.75) glacial acetic acid and sodium acetate were mixed to reach the desired pH.

3.3. Sample Preparation and Extraction (Leather Extracts or Resin Extracts)

Leather samples were manually cut into small pieces (from 3 mm to 5 mm side length) in accordance with ISO 4044. Then, 2 g of leather pieces were weighed. For resin samples, 0.04 g of resin powder were weighed. The same extraction procedure was used for all the samples. This extraction is based on EN ISO 17226-1 standard. 50 mL of 0.1% dodecane-1-sulfonic-acid aqueous solution were added and samples were linear stirred in a water bath at $40 \pm 1^\circ\text{C}$ for 60 ± 2 min. Then, leather extracts (or resin extracts) were immediately filtered on a glass fibre filter, cooled down to room temperature and derivatized.

3.4. DNPH Derivatization and Chromatographic Separation of DNPH Derivatives

Derivatization: The derivatization with DNPH was realized off-line, before the chromatographic separation. The DNPH solution was prepared by dissolving 0.06 g of DNPH either in 20 mL of orthophosphoric acid (for standard conditions) or in acetonitrile for buffered conditions.

A 10 mL derivatization flask was filled with 5 mL of leather extract, 4 mL of acetonitrile, 500 μL of DNPH solution and filled up to the mark with water. For buffered conditions, 500 μL of buffer solution were also added to reach a final buffer concentration of 0.1 mol L^{-1} in the flask. For each derivatization condition, a derivatization blank was run alongside the sample. For derivatization blank preparation, the leather extract was replaced by 5 mL of the extraction medium (0.1% dodecane-1-sulfonic-acid aqueous solution). Whatever the derivatization conditions, no artefact peaks were detected in the time range of formaldehyde. For quality controls, the leather extract was replaced by 5 mL of a formaldehyde standard solution prepared in the extraction medium (0.1% dodecane-1-sulfonic-acid aqueous solution). For experiments with resins, 5 mL of resin extract were used. The derivatization flasks were briefly shaken by hand. They were analysed after a given period of time as specified in the text.

Chromatographic analysis: The separation and quantification of DNPH derivatives were implemented in reversed phase chromatography. Analyses were realized with an Agilent Series 1290 Infinity UPLC and a 1290 Infinity Diode Array Detector (DAD). The software was OpenLab CDS ChemStation Rev C.01.03.

Analyses were realized with a ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent) $3 \times 100 \text{ mm}$ ($d_p = 1.8 \mu\text{m}$) column, at 35°C , with an acetonitrile/water mobile phase (from 35/65 v/v to 66/34 v/v in 3 min, and to 90/10 v/v in 0.5 min), at a flow rate of 1 mL min^{-1} and with an injection volume of 10 μL . The formaldehyde

derivative was detected by UV at 350 nm with a reference wavelength of 580 nm. The calibration solutions (from 50 µg/L to 4000 µg/L) were prepared by diluting the commercial formaldehyde-2,4-DNPH solution (100 µg/mL) with a mixture of 50/50 acetonitrile/water. In the chromatograms obtained the first peak (at 1.2 min) is the residual derivatization reagent (DNPH). Formaldehyde-2,4-DNPH standard gave a reference retention time (2.1 min) and allowed to register the formaldehyde derivative spectra at 350 nm in the library. Formaldehyde derivative in samples were identified by comparison of retention time and UV spectra with formaldehyde derivative reference retention time and UV spectra in the library. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) (respectively 17 µg L⁻¹ and 50 µg L⁻¹) were determined according to NF T90-210 standard. Given the sample preparation conditions, these two values correspond to a LOD of 0.9 mg kg⁻¹ and to a LOQ of 2.5 mg kg⁻¹. The repeatability of the new derivatization method has been evaluated with 3 replicates (3 independent derivatizations). The relative standard deviation is less than 4%.

3.5. Flow Injection Analysis (FIA) with On-Line Derivatization with Acetylacetone

The flow injection analysis (FIA) with on-line derivatization was implemented with a LC-2040C Shimadzu system (without column). The FIA solvent was a water/ acetonitrile mixture (15/85, v/v). The flow rate was set at 0.25 mL/min; the sample was injected (50 µL) via the autosampler and then on-line derivatized with an acetylacetone solution (0.01 M acetylacetone, 0.025 M glacial acetic acid and 1 M ammonium acetate) pumped at 0.25 mL/min. The mixing of the eluent and derivatization solution was implemented in a zero-dead volume mixing tee and then the reaction occurred in a 0.5 mL reactor (PTFE tube 0.25 mm i.d., 10 m in length), heated in an oven (column oven CTO-6A Shimadzu) at 90 °C. It corresponds to a derivatization duration of 1 min. Finally, the UV detection was achieved in the UV detector (cell volume 6 µL) at 412 nm (in LC-2040C Shimadzu). Calibration solutions were prepared from 50 µg/L to 4000 µg/L by diluting the commercial formaldehyde solution at 100 µg/mL with detergent solution (0.1% dodecane-1-sulfonic-acid sodium salt).

4. Conclusion

First, we have demonstrated that the EN ISO 17226-1 standard is not adapted to leather samples retanned with resins likely to release formaldehyde by hydrolysis. Indeed, we have shown that the formaldehyde content of leathers retanned with resins is largely overestimated according to this standard. This overestimation is due the concomitant hydrolysis of resins (in harsh acidic conditions) that releases formaldehyde during the derivatization step and during the waiting time on the autosampler before chromatographic analysis (the higher the waiting time, the higher the formaldehyde content measured).

A thorough study of the derivatization step has shown that replacing orthophosphoric acid with less acidic buffer solutions is not enough to avoid hydrolysis. Alternative derivatization conditions (3 h at 50 °C in a water bath) with DNPH solubilized in acetonitrile (instead of orthophosphoric acid) would allow a complete derivatization of formaldehyde while avoiding the hydrolysis of co-extracted dicyandiamide and melamine resins. Moreover, the as-obtained leather derivatized extracts are stable over time and their analysis can be delayed in time without any restriction. An alternative method is also proposed (for leathers containing no dyes) with a home-designed FIA method with on-line derivatization with acetylacetone and UV detection. Formaldehyde contents determined with this FIA method agree with the formaldehyde content measured immediately at the end of derivatization reaction in standard conditions or with the formaldehyde content measured with the new derivatization conditions.

Given that the proposed modification of the derivatization step avoids the problem of the hydrolysis of resins in the HPLC determination of formaldehyde, this upgrade should be disseminated beyond the leather sector and support textile testing. This is more important given that the ECHA has recently modified the ANNEX XVII TO REACH to more severely restrict formaldehyde content in textile garments.

Author Contributions: C.B, N.B., C.D., and J.-C.C. did the conceptualization; C.B. performed the experiments and summarized experimental results; C.B., N.B., and C.D. analyzed results; C.B., C.D., N.B., and J.-C.C. drew conclusions from results; C.B., C.D., and N.B. wrote the manuscript; J.-C.C. validated the manuscript as C.T.C. standards director. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, for three-year CIFRE PhD grant number 2018/0502.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Kim, K.-H.; Jahan, S.A.; Lee, J.-T. Exposure to Formaldehyde and Its Potential Human Health Hazards. *J. Environ. Sci. Health Part C* **2011**, *29*, 277–299. doi:10.1080/10590501.2011.629972.
2. Fasth, I.M.; Ulrich, N.H.; Johansen, J.D. Ten-year trends in contact allergy to formaldehyde and formaldehyde-releasers. *Contact Dermat.* **2018**, *79*, 263–269. doi:10.1111/cod.13052.
3. Frihart, C.R. Wood Adhesion and Adhesives. In *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*, 2nd ed. CRC Press edition, Boca Raton (Florida); Rowell, R.M. (publisher).; 2012; pp. 255–319.
4. Hewson, M. Formaldehyde in textiles. *J. Soc. Dyers Colour.* **1994**, *110*, 140–142.
5. Wolf, G. Formaldehyde in leather: Causes and avoidance. *World Leather* **2002**, *15*, 46–52.

6. BLC Leather Technology Centre Ltd. Formaldehyde. *Leather* **2008**, 4788, 28–29.
7. Wilgenburg, P. What you need to know about formaldehyde. *Leather* **2009**, 211, 36–37.
8. Wolf, G.; Huffer, S. Formaldehyde in Leather—A Survey. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **2002**, 97, 456–464.
9. Bayramoglu, E.E.; Yorgancioglu, A.; Onem, E. Analysis of Release of Free Formaldehyde Originated from THP Salt Tannages in Leather by High Performance Liquid Chromatography: Origanum Onites Essential Oil as Free Formaldehyde Scavenger. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **2013**, 108, 411–419.
10. Stoppa, E. Formaldehyde in leathers: Remedies and solutions. *Leather Int.* **2005**, 207, 24–26.
11. Kleban, M. Free formaldehyde—A practical guide. *Leather Int.* **2003**, 205, 26–29.
12. Gryllaki-Berger, M.; Mugny, C.; Perrenoud, D.; Pannatier, A.; Frenk, E. A comparative study of formaldehyde detection using chromotropic acid, acetylacetone and HPLC in cosmetics and household cleaning products. *Contact Dermat.* **1992**, 26, 149–154. doi:10.1111/j.1600-0536.1992.tb00284.x.
13. Blanc, N.; Humbert, N.; Cannot, J.-C. HPLC versus Spectrophotometry for the Quantitation of Trace Amounts of Formaldehyde in Leathers. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **2009**, 104, 1–8.
14. Giovando, S. How to reduce formaldehyde in tannery. *ARS Tannery* **2010**, 2, 58–65.
15. Yilmaz, B.; Asci, A.; Kucukoglu, K.; Albayrak, M. Simple high-performance liquid chromatography method for formaldehyde determination in human tissue through derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Sep. Sci.* **2016**, 39, 2963–2969. doi:10.1002/jssc.201600345.
16. Wu, P.-W.; Chang, C.-C.; Chou, S.-S. Determination of Formaldehyde in Cosmetics by HPLC Method and Acetylacetone Method. *J. Food Drug Anal.* **2003**, 11, 8.
17. Cuadros, S.; Font, J.; Izquierdo, F.; Cuadros, R.M.; Ollé, L.; Marsal, A. Determination of Formaldehyde Content in Leather Standard EN ISO 17226 (Parts 1 and 2), Revision and Possible Improvements. *Soc. Leather Technol. Chem. J.* **2016**, 100, 167–174.
18. Bicking, M.K.L.; Cooke, W.M.; Kawahara, F.K.; Longbottom, J.E. Effect of pH on the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine with formaldehyde and acetaldehyde. *J. Chromatogr. A* **1988**, 455, 310–315. doi:10.1016/S0021-9673(01)82130-0.
19. Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **1953**, 55, 416–421. doi:10.1042/bj0550416.

Sample Availability: Leather samples (lamb leathers tanned with chromium and retanned without resin or with dicyandiamide resin or with melamine resin) are not available from the authors.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

En conclusion, les études présentées dans cet article ont permis de trouver de nouvelles conditions de dérivation : au bain marie pendant 3h à 50°C avec le DNPH en solution dans l'acétonitrile et sans ajout d'acide. Ces conditions de dérivation permettent d'empêcher l'hydrolyse des résines aboutissant à une teneur en formaldéhyde mesurée stable pendant l'attente sur le passeur. Ainsi, le biais de quantification est éliminé.

3.4 Comparaison de la norme ISO 17226-1 2019 et de la nouvelle méthode sur plusieurs échantillons de cuirs

La nouvelle méthode de dérivation (au DNPH sans ajout d'acide en se plaçant à 50°C pendant 3h) et l'ancienne méthode (avec le DNPH dans l'acide orthophosphorique) ont été comparées seulement pour trois échantillons de cuir correspondant à un agneau tanné au chrome sans résine de retannage ou avec résine de retannage mélamine ou dicyandiamide. Il est intéressant de poursuivre cette comparaison sur un plus grand nombre d'échantillons.

Ainsi, 10 échantillons de cuir contenant du formaldéhyde ont été pris au hasard parmi les échantillons analysés en routine, ce qui signifie qu'il n'y a aucune donnée sur le procédé de tannage de ces cuirs. Ils sont analysés suivant la norme ISO 17226-1:2019 en vigueur, immédiatement après le début de la dérivation, après 1h, après 3h et avec la nouvelle dérivation au DNPH dans l'acétonitrile avec une dérivation à 50°C pendant 3h. La Figure 20 présente les concentrations en formaldéhyde obtenues en mg/kg pour ces différentes méthodes et avec les incertitudes associées à chaque méthode. Les incertitudes correspondent à deux fois les écarts types mesurés avec trois mesures (trois dérivations indépendantes).

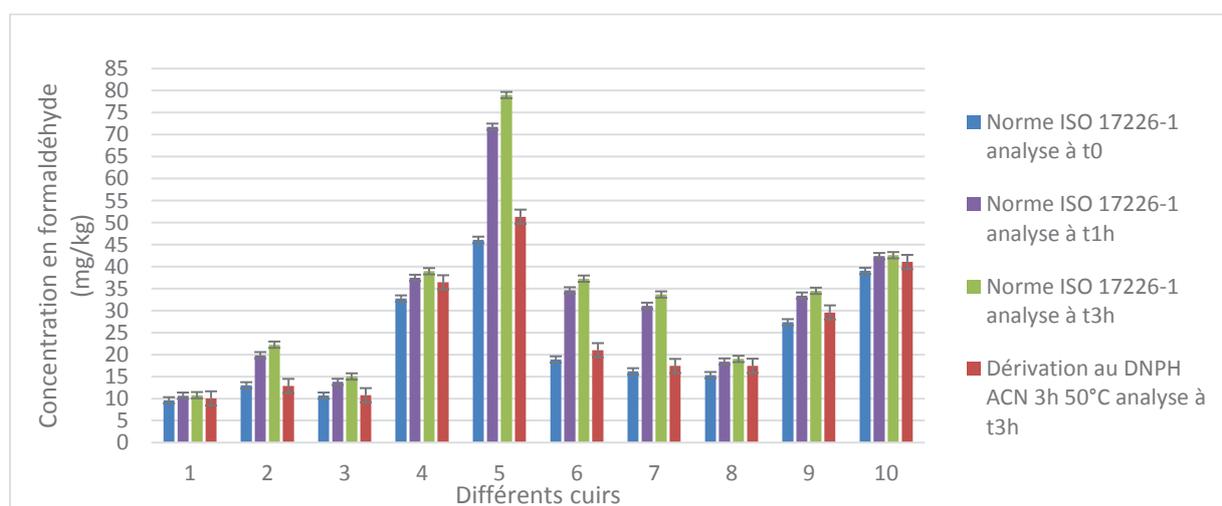


Figure 20 : comparaison des teneurs en formaldéhyde obtenues avec la norme ISO-17226-1 après le début de la dérivation, pendant l'intervalle de temps défini dans la norme (entre 1h et 3h) et avec la nouvelle méthode (dérivation au DNPH acétonitrile en 3h à 50°C puis analyse). Les incertitudes correspondent à deux fois les écarts types mesurés avec trois mesures (trois dérivations indépendantes).

La nouvelle méthode donne des résultats du même ordre de grandeur que les teneurs en formaldéhyde mesurées avec la norme ISO-17226-1 directement après le début de la dérivation (sachant que la cinétique de cette réaction est presque immédiate).

Les teneurs en formaldéhyde obtenues dans les conditions de la norme, c'est-à-dire entre 1h et 3h de dérivation, sont surestimées pour les échantillons de cuirs numéro 2, 5, 6 et 7, ce qui montre à nouveau la nécessité de la nouvelle méthode. Celle-ci apporte une solution pour empêcher la surestimation de la concentration en formaldéhyde lors de la dérivation en condition acide.

3.5 Comparaison de la norme ISO 17226-1 2019 et de la nouvelle méthode avec plusieurs laboratoires et sur plusieurs échantillons de cuirs

La comparaison des méthodes est étendue à plusieurs laboratoires pour vérifier les premières conclusions obtenues.

Ainsi, des essais ont été réalisés avec plusieurs laboratoires pour comparer la méthode de la norme ISO 17226-1:2019 avec la nouvelle méthode de dérivation au DNPH dans l'acétonitrile pendant 3h à 50°C.

Chaque laboratoire avait pour consigne de prendre aléatoirement 10 à 13 cuirs, en privilégiant ceux dont la teneur en formaldéhyde est comprise entre 10 et 100 mg/kg et avec une limite de quantification à 5 mg/kg. De plus, ces cuirs sont sélectionnés parmi les cuirs analysés dans leur laboratoire afin qu'ils soient de nature variée et représentative des procédés de fabrication actuellement utilisés.

Au total, 5 laboratoires, dont le CTC, ont participé à cette étude ce qui représente 50 échantillons de cuirs différents.

Chaque laboratoire a analysé ses cuirs avec la méthode de la norme ISO 17226-1:2019 avec le DNPH dans l'acide orthophosphorique directement en fin de dérivation, sachant que la dérivation est presque immédiate, et après 3h de dérivation. Les échantillons sont également analysés avec la nouvelle méthode au DNPH dans l'acétonitrile à 50°C en fin de dérivation donc après 3h et 10h après le début de la dérivation.

3.5.1 Comparaison des teneurs en formaldéhyde obtenues avec la norme ISO 17226-1:2019 après 0 et après 3h de dérivation

Pour commencer, cette étude permet de comparer les teneurs en formaldéhyde obtenues avec la méthode de la norme 17226-1:2019, utilisant le DNPH dans l'acide ortho phosphorique, directement en fin de dérivation et après 3h de dérivation (Figure 21).

La valeur obtenue avec la norme 17226-1 en fin de dérivation a été normalisée à 1 (barre bleue sur la Figure 21).

Afin, de comparer les teneurs obtenues aux deux temps de réaction de dérivation (au début et à 3h), des bornes sont fixées à 20% autour de la teneur en formaldéhyde normalisée à 1. Ces bornes sont représentées par des barres rouges. Ces 20% correspondent aux incertitudes associées aux résultats rendus par CTC pour l'analyse du formaldéhyde dans les cuirs. Ils proviennent des tableurs de validation et des résultats expérimentaux sur des échantillons clients.

La Figure 21 représente par des ronds, les teneurs en formaldéhyde obtenues en respectant les conditions de dérivation de la norme et en analysant après 3h de dérivation, ce qui correspond au temps maximal fixé par la norme entre la fin de la dérivation et l'analyse. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la teneur en formaldéhyde en début de dérivation, seule la couleur des ronds donne une idée de la fourchette des teneurs en formaldéhyde après 3h de dérivation, sachant que la limite de quantification est de 5 ppm (soit 5 mg/kg).

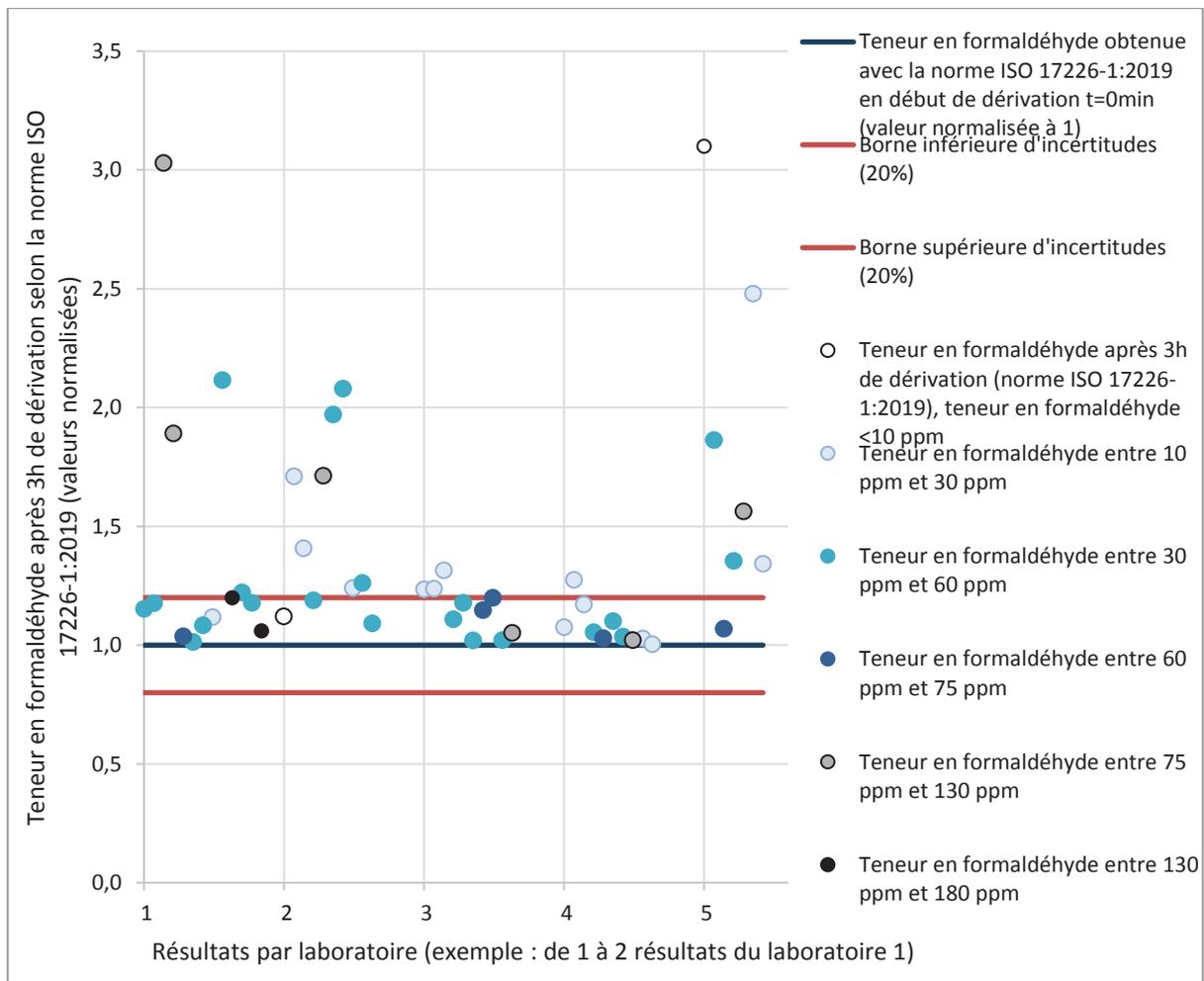


Figure 21 : comparaison des teneurs en formaldéhyde pour différents cuirs analysés avec la norme ISO 17226-1 : 2019 en fin de dérivation (valeur normalisée à 1) et après 3h de dérivation. Les teneurs après 3h de dérivation sont normalisées par rapport à la teneur en début de dérivation et sont représentées par des ronds dont la couleur indique leur teneur en formaldéhyde.

Ainsi, les teneurs en formaldéhyde, après 3h de dérivation, situées en dehors de l'intervalle défini par les bornes d'incertitudes de 20% sont significativement différentes des teneurs en formaldéhyde

obtenues au temps initial. Par exemple, pour le premier échantillon du laboratoire n°5, la couleur blanche du point indique que la teneur en formaldéhyde après 3h de dérivation dans les conditions de la norme ISO 17226-1 est inférieure à 10 mg/kg. Cette teneur est en dehors de l'intervalle des bornes d'incertitudes de 20% et a été normalisée à environ trois ce qui signifie que cette teneur en formaldéhyde est 3 fois plus haute que celle obtenue directement après le début de la dérivation. Il y a 21 échantillons sur 50 échantillons qui présentent une teneur en formaldéhyde mesurée après 3h de dérivation qui est au-dessus de la borne supérieure d'incertitudes de 20% associée à la teneur en formaldéhyde en début de dérivation. Pour 4 échantillons cette surestimation peut conduire à un changement de conclusion sur leur conformité, étant donné que leur teneur en formaldéhyde devient supérieure à la teneur limite de certains cahiers des charges (75 mg/kg) après 3h de dérivation.

En conclusion, la norme actuelle mène à une surestimation de la teneur en formaldéhyde pour 42% des échantillons étudiés. Ces résultats sur des échantillons de cuirs clients actuels confirment bien la nécessité de modifier la norme pour qu'elle puisse convenir à ces différents cuirs.

3.5.2 Corrélation entre les teneurs en formaldéhyde obtenues avec la norme ISO 17226-1:2019 vs celles obtenues avec la nouvelle méthode

Les teneurs en formaldéhyde obtenues directement après le début de la réaction de dérivation dans les conditions de la norme ISO 17226-1:2019 sont ensuite comparées aux teneurs en formaldéhyde obtenues avec la nouvelle méthode de dérivation à 50°C pendant 3h avec le DNPH dans l'acétonitrile. La Figure 22 montre que 8 échantillons, soit 16% des échantillons, sont en dehors de l'intervalle défini par les bornes d'incertitudes de 20%, donc, ces échantillons ont des teneurs différentes entre ces deux méthodes. Aucune donnée sur la nature de ces cuirs et leur procédé de fabrication n'est disponible comme les échantillons ont été choisis au hasard par les laboratoires. Il serait intéressant de faire une nouvelle étude avec des cuirs dont les procédés de tannage sont connus pour pouvoir expliquer les différences entre les méthodes pour certains cuirs. Cependant les échantillons concernés ont des teneurs en formaldéhyde inférieures à 30 mg/kg, sauf pour deux échantillons dont les teneurs en formaldéhyde surestimées par la nouvelle méthode sont entre 30 et 75 mg/kg. Ces teneurs sont donc en dessous de la teneur limite à 75 mg/kg qui correspond à la teneur en formaldéhyde actuellement suivie par certains cahiers des charges. Donc les faibles différences entre ces méthodes ne changeraient pas la conclusion sur la conformité des échantillons étudiés.

D'autre part, pour 84% des échantillons, les teneurs en formaldéhyde mesurées sont du même ordre de grandeur pour les deux méthodes utilisées. Ainsi, la nouvelle méthode réduit donc la surestimation provoquée par les conditions de la norme ISO 17226-1:2019 pour la majorité des échantillons concernés.

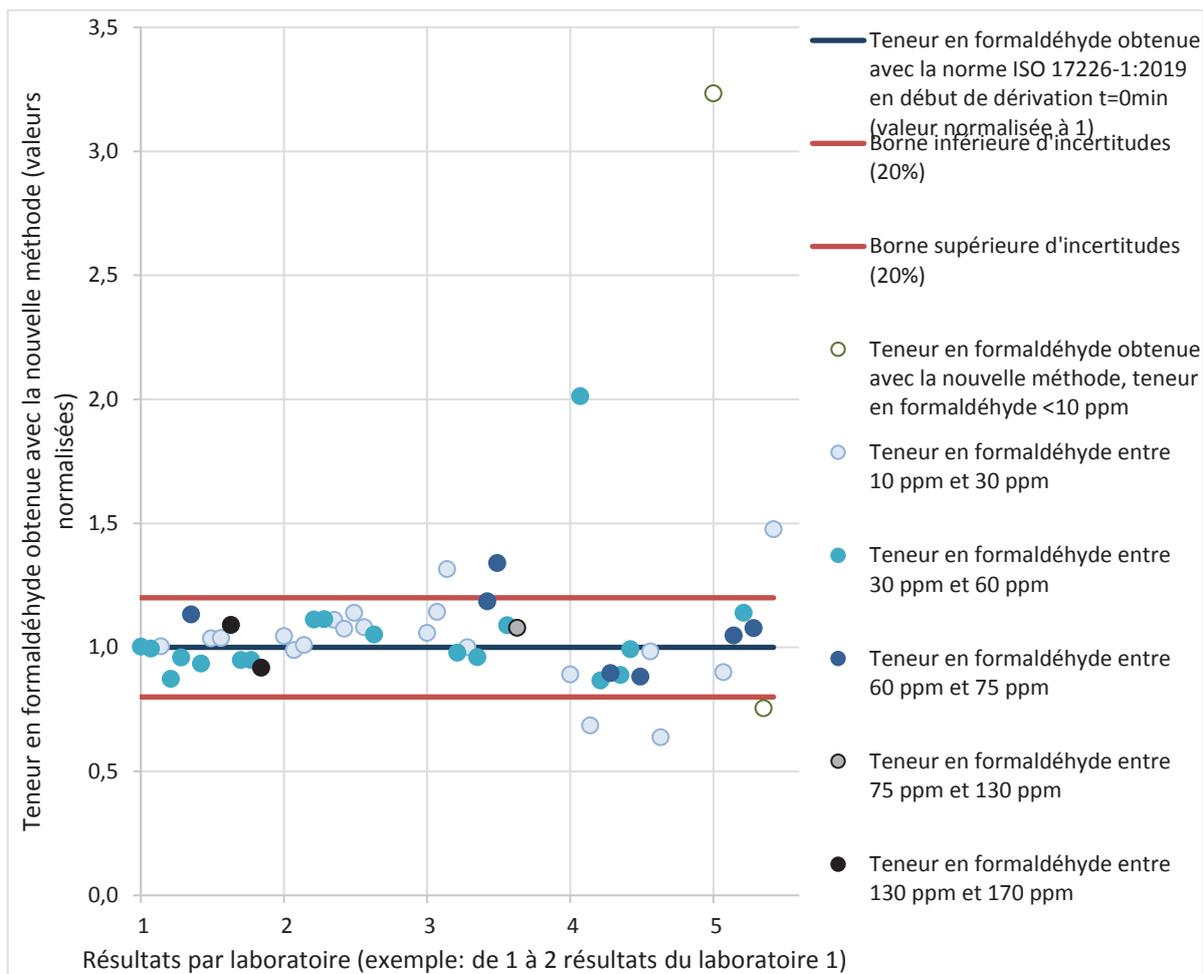


Figure 22 : comparaison de la teneur en formaldéhyde obtenue avec la norme ISO 17226-1:2019 après le début de la dérivation (valeur normalisée à 1) et avec la nouvelle méthode (DNPH dans l'acétonitrile dérivation pendant 3h à 50°C). Les teneurs obtenues avec la nouvelle méthode sont normalisées par rapport à la teneur de la norme en début de dérivation et sont représentées par des ronds dont la couleur indique leur teneur en formaldéhyde.

3.5.3 Teneurs en formaldéhyde obtenues avec la nouvelle méthode et influence de l'attente sur le passeur

Enfin, il serait intéressant qu'avec cette nouvelle méthode de dérivation, les échantillons puissent rester plusieurs heures sur le passeur sans que leur teneur en formaldéhyde mesurée soit modifiée. Ainsi, les teneurs en formaldéhyde en fin de réaction de dérivation après 3h à 50°C (valeur normalisée à 1) sont comparées aux teneurs en formaldéhyde après 3h à 50°C et plusieurs heures d'attente (environ 7 heures) sur le passeur. La Figure 23 montre que tous les échantillons sont compris dans les bornes d'incertitudes de 20% : donc pour tous les échantillons étudiés, l'attente sur le passeur n'a pas d'influence sur la teneur en formaldéhyde mesurée. Cette nouvelle méthode permet donc d'empêcher l'hydrolyse des résines ce qui mène à une teneur en formaldéhyde dérivée stable au cours du temps.

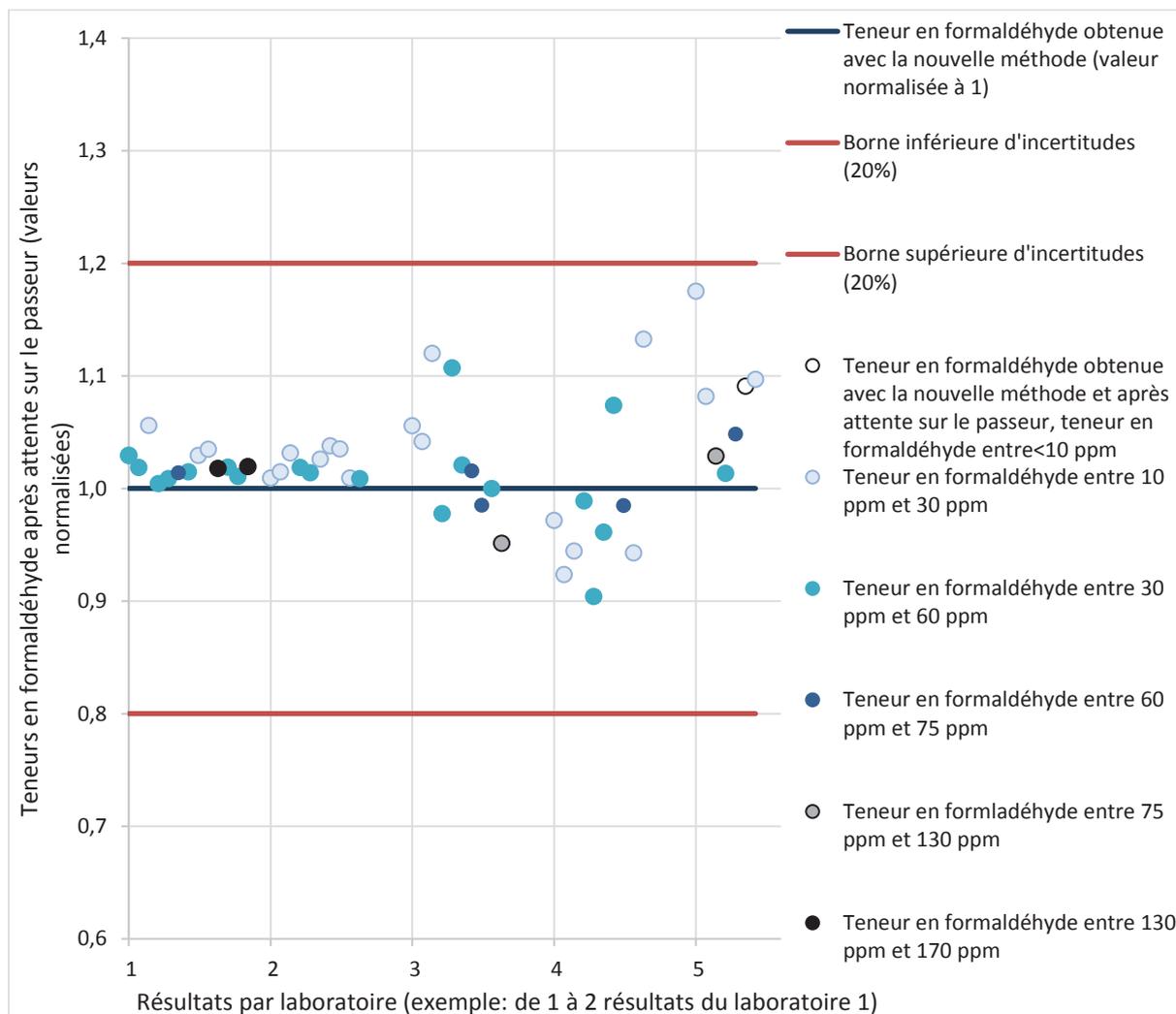


Figure 23 : comparaison de la teneur en formaldéhyde en fin de dérivation dans les conditions de la nouvelle méthode (3h à 50°C avec le DNPH dans l'acétonitrile) et après attente sur le passeur (environ 7h d'attente). La teneur en formaldéhyde après 3h de dérivation est normalisée à 1 (ligne bleue) et encadrée de bornes d'incertitudes à 20%. Les teneurs en formaldéhyde après 7h d'attente sont normalisées par rapport à la valeur à 3h et sont représentées par des ronds dont la couleur indique leur teneur en formaldéhyde.

3.6 Essais inter laboratoires

Comme les études précédentes portaient sur des échantillons différents, elles ne permettent pas de rendre compte de la performance de la nouvelle méthode ni de sa reproductibilité. L'étude de la reproductibilité permet de caractériser la variabilité totale incluant la variabilité liée aux laboratoires utilisant la méthode⁶⁴. La norme NF T 90-210 définit les conditions pour évaluer la reproductibilité comme étant un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires.

Pour répondre à ces objectifs un essai inter laboratoires a été organisé.

Ainsi, 8 laboratoires ont analysé 7 cuirs différents en utilisant la nouvelle méthode avec le DNPH en solution dans l'acétonitrile et une dérivation de 3h au bain marie à 50°C puis analyse après retour à température ambiante. Aucune information n'a été fournie concernant le procédé de fabrication des

cuirs. Ils ont été envoyés aux laboratoires sous forme de cuirs découpés et non en solution d'extraction pour avoir les résultats les plus représentatifs de l'ensemble du processus analytique.

Le Figure 24 présente pour chaque cuir, la teneur en formaldéhyde moyenne obtenue par les laboratoires. L'incertitude est considérée comme 2 fois l'écart type obtenu pour chaque cuir (2σ). Le facteur 2 correspond à un intervalle de confiance de 95% en considérant que la concentration suit une loi de distribution normale⁶⁵.

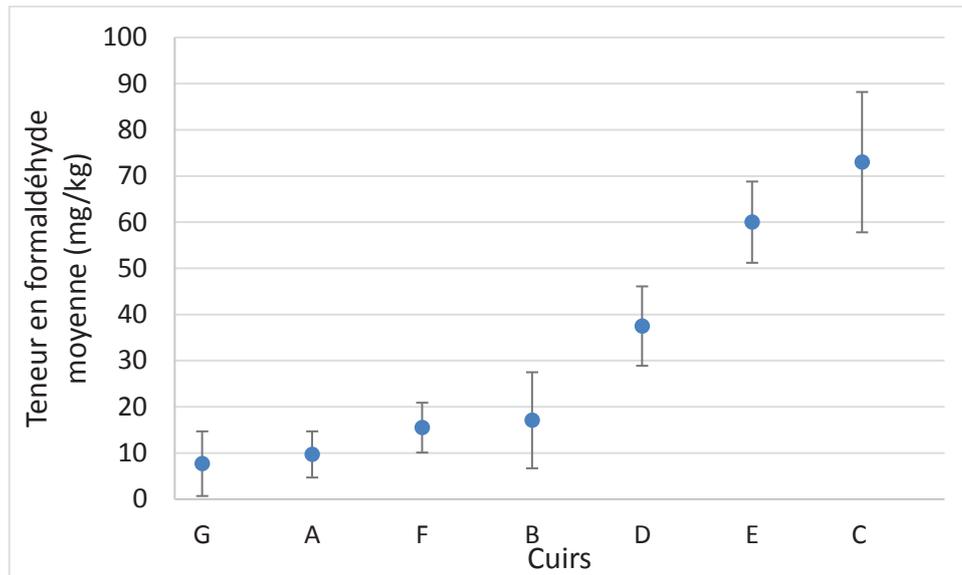


Figure 24 : Moyennes des teneurs en formaldéhyde obtenues par les laboratoires pour chaque cuir. L'incertitude correspond à 2 fois l'écart type de l'ensemble des teneurs mesurées pour un échantillon de cuir.

Les cuirs étudiés ont des teneurs en formaldéhyde qui s'étendent entre $7,7 \pm 7,0$ mg/kg (cuir G) et 73 ± 15 mg/kg (cuir C). L'incertitude relative est très élevée pour le cuir G ce qui peut s'expliquer par le fait que cette teneur est proche de la limite de quantification à 2,5 ou 5 mg/kg selon les laboratoires. Concernant la performance des laboratoires, elle est évaluée à travers leur valeur de z scores.

Les z scores sont calculés en respectant la norme NF EN ISO/CEI 17043 qui concerne l'évaluation de la conformité et les exigences générales concernant les essais d'aptitude :

$$z = \frac{(x \text{ laboratoire} - x \text{ moyen})}{\sigma}$$

avec z : z score d'un laboratoire pour un cuir

x laboratoire : teneur en formaldéhyde moyenne obtenue par ce laboratoire pour ce cuir

x moyen : moyenne de la teneur en formaldéhyde de tous les laboratoires pour ce cuir

σ : écart-type obtenu, dans ce cas, en prenant l'écart-type des résultats obtenus par tous les laboratoires pour ce cuir (écart-type de reproductibilité)

La norme NF EN ISO/CEI 17043 donne une interprétation de la valeur absolue des z scores obtenus. Ainsi, si le z score, en valeur absolue, est inférieur ou égal à 2,0, les performances sont dites satisfaisantes. Pour un z score, en valeur absolue, strictement compris entre 2,0 et 3,0, les

performances sont discutables. Enfin pour un z score, en valeur absolue, supérieur ou égal à 3,0, les performances sont insatisfaisantes.

Le Figure 25 présente les z scores obtenus pour chaque cuir et pour chaque laboratoire.

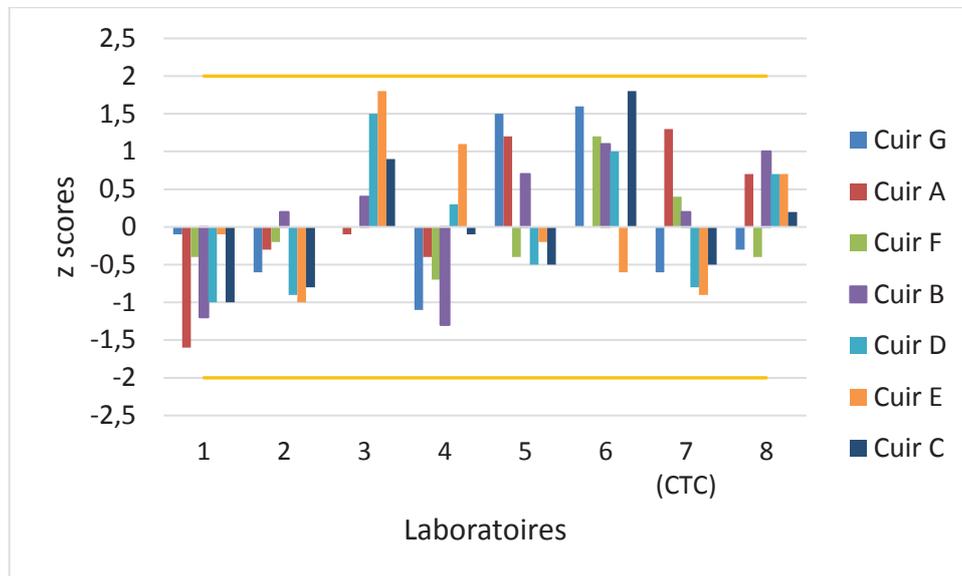


Figure 25 : z scores pour les 8 laboratoires et pour les 7 cuirs analysés avec la nouvelle méthode

Cette figure montre que pour tous les laboratoires et pour l'ensemble des cuirs étudiés, les z scores sont tous inférieurs en valeur absolue à 2. Donc, ces 8 laboratoires ont des résultats acceptables pour les 7 cuirs analysés en utilisant l'écart-type de reproductibilité dans le calcul des z scores.

Cependant, des laboratoires obtenant des résultats très différents les uns des autres conduisent à un écart-type de reproductibilité important qui peut mener à des z scores inférieurs en valeur absolue à 2, alors que la reproductibilité n'est pas satisfaisante. Dans le calcul des z scores, il serait plus pertinent de fixer un écart-type correspondant à la répétition d'une analyse au sein d'un même laboratoire car cet écart-type rendrait compte d'un écart acceptable entre des mesures.

3.7 Conclusion : norme ISO 17226-1 :2021

En conclusion, l'hypothèse de départ de l'influence du temps d'attente sur le passeur est validée. Diverses études ont permis d'aboutir à de nouvelles conditions de dérivation qui remplacent la catalyse acide par une catalyse thermique à 50°C pour empêcher l'hydrolyse des résines co-extraites.

Ces nouvelles conditions de dérivation permettent une quantification non biaisée du formaldéhyde quel que soit le temps d'analyse. Elles ont conduit à des résultats de tests inter laboratoires, à l'échelle internationale, relativement satisfaisants. Elles ont donc fait l'objet d'une modification de la norme ISO 17226-1 (version 2021).

Chapitre 3 : Les composés poly et perfluorés

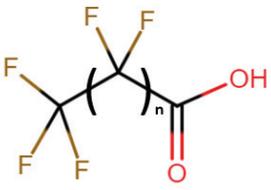
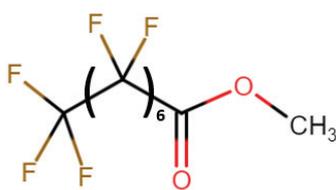
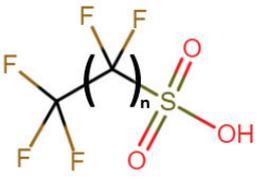
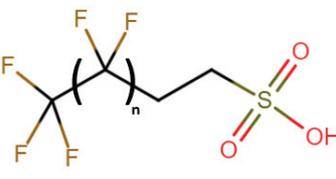
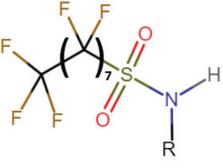
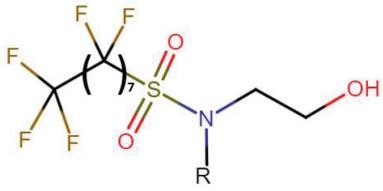
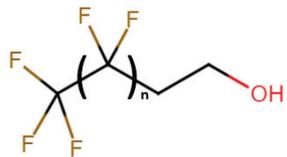
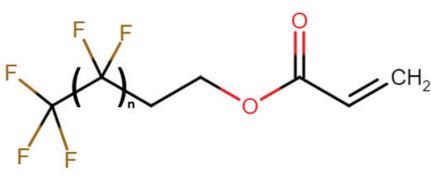
1 Introduction : les PFCs et leurs caractéristiques physico-chimiques

Comme vu précédemment, les composés poly et perfluorés interviennent essentiellement à l'étape de finition du procédé de tannage en apportant des propriétés répulsives envers l'eau et le gras.

La norme en cours (ISO 23702-1 de 2018, présentée en Annexe 3) concerne actuellement l'analyse de trois familles de PFCs avec 3 acides perfluorés sulfoniques, 11 acides perfluorés carboxyliques et le perfluorooctane sulfonamide. Elle est cependant en cours de modification pour que la liste des PFCs analysés soit augmentée. Le comité de normalisation ISO TC216 WG2 - CEN TC309 a défini une nouvelle liste de PFCs à analyser dans la chaussure, le textile et le cuir pour répondre aux exigences réglementaires et aux différents cahiers des charges. Elle regroupe les substances qui sont candidates à autorisation dans REACH, qui appartiennent à l'annexe XVII de REACH, qui sont des polluants organiques persistants (POP) ou qui sont mentionnées par des labels, comme le label OEKO-TEX Standard 100. Cette liste prend également en compte leurs applications et mentionne donc les substances susceptibles d'être présentes dans le procédé de fabrication du cuir comme imperméabilisant ou comme contaminant provenant de l'eau utilisée ou encore comme produits de dégradation.

Ces PFCs appartiennent à différentes familles : les acides perfluorés carboxyliques (PFCAs), les esters du PFOA comme le méthyl perfluorooctanoate (Me-PFOA), les acides perfluorés sulfoniques (PFASs), les télomères fluorés (chaines fluorées se terminant par deux groupements méthylènes) sulfonates (FTSs), les perfluoro-octanesulfonamides (FOSAs), les perfluoro-octanesulfonamido éthanol (FOSEs), les télomères fluorés alcools (FTOHs) et les télomères fluorés acrylates (FTAs). Ces différentes familles sont représentées par les formules chimiques du Tableau 3.

Tableau 3 : les familles de PFCs étudiées⁶⁶

Nom	Structure chimique
Acides perfluorés carboxyliques (PFCAs)	Méthyl perfluorooctanoate (Me-PFOA)
	
Acides perfluorés sulfoniques (PFASs)	Télomères fluorés sulfonates (FTSs)
	
Perfluoro-octanesulfonamides (FOSAs)	Perfluoro-octanesulfonamido ethanol (FOSEs)
	
Télomères fluorés alcools (FTOHs)	Télomères fluorés acrylates (FTAs)
	

Les PFCs appartenant à différentes familles ont les propriétés physico-chimiques présentées dans le Tableau 4. Les propriétés estimées par calculs considèrent généralement la forme neutre des PFCs, or pour certains PFCs comme les PFASs leur forme anionique est prédominante à pH neutre⁶⁷.

Le Log P aussi appelé Log K_{ow} est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans l'eau et l'octanol⁶⁸. Il est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance entre ces deux solvants et donne une indication sur le caractère hydrophile ou hydrophobe d'un composé. Ainsi, plus il est grand, plus le composé est hydrophobe. Les valeurs des log P des PFCs s'étendent entre 1,98⁶⁹ et 9,95⁷⁰ ce qui met en évidence le caractère hydrophobe des PFCs qui pourra être utilisé pour les étapes d'extraction et de séparation analytique.

En ce qui concerne les températures d'ébullition, elles peuvent donner une indication sur la possibilité de séparer les composés en chromatographie en phase gazeuse (GC). Par exemple, les FTAs possèdent des températures d'ébullition entre 178°C^{69} et 231°C^{69} ce qui permettra leur analyse en GC.

Le pKa est la valeur négative du logarithme de la constante d'acidité Ka. Cette valeur permet de savoir si un composé est sous forme chargée ou neutre à un pH donné, la charge d'un composé étant un facteur qui permet de guider le choix d'un mode chromatographique ou d'un mode de préconcentration. Le pKa des PFCAs s'étend entre $-0,21^{71}$ et $3,8^{72}$, celui des PFASs entre -6^{72} et $0,14^{71}$ et celui des FTSs est d'environ $1,3^{72}$. Ainsi, les PFCAs, les PFASs et les FTSs peuvent être sous forme anionique dans des conditions de pH données, alors que les FTOHs et les FOSEs sont neutres quel que soit le pH⁷³. Le fait qu'une partie des PFCs soit anionique et l'autre partie soit neutre constitue une difficulté pour le choix d'une purification adaptée à l'ensemble des analytes.

Les PFCs ont une solubilité dans l'eau qui s'étend de $4,20 \times 10^{-8} \text{ mol/L}^{67}$ à $4,23 \times 10^{-1} \text{ mol/L}^{72}$. Ils sont faiblement solubles dans l'eau.

Tableau 4 : propriétés physico-chimiques de PFCs appartenant à des familles différentes (est : estimation, exp : résultats expérimentaux, np : non précisé)

Famille	CAS	PFCs	Log P	pKa	Température d'ébullition	Solubilité dans l'eau
PFCAs	375-22-4	PFBA	2,71 (est) ⁶⁹	-0,2 à 0,7 (np) ⁶⁷	118°C (est) ⁶⁹	7,34 x 10 ⁻³ mol/L (est) ⁶⁹
	2706-90-3	PFPeA	3,36 (est) ⁷⁰	-0,06 (np) ⁶⁷	124,4°C (np) ⁷²	4,26 x 10 ⁻¹ mol/L (np) ⁷²
	1546-95-8	7HPFHpA	4,44 (est) ⁷⁰		188°C (exp) ⁷⁰	
	307-24-4	PFHxA	3,94 (est) ⁶⁹	-0,13 (np) ⁶⁷	156°C (est) ⁶⁹	3,54 x 10 ⁻⁴ mol/L (est) ⁶⁹
	375-85-9	PFHpA	4,49 (est) ⁶⁹	-0,15 (np) ⁶⁷	179°C (est) ⁶⁹	6,34 x 10 ⁻⁴ mol/L (est) ⁶⁹
	335-67-1	PFOA	5,51 (est) ⁶⁹	entre -0,16 et 3,8 (np) ⁷²	188 – 192°C (np) ⁶⁷	1,01 x 10 ⁻² mol/L (est) ⁶⁹
	375-95-1	PFNA	6,18 (est) ⁶⁹	-0,17 (np) ⁶⁷	203°C (est) ⁶⁹	1,00 x 10 ⁻³ mol/L (est) ⁶⁹
	335-76-2	PFDA	6,89 (est) ⁶⁹	-0,17 (np) ⁶⁷	218°C (est) ⁶⁹	2,94 x 10 ⁻³ mol/L (est) ⁶⁹
	34598-33-9	4HPFUnA	6,59 (est) ⁷⁰		228°C (est) ⁷⁰	
	2058-94-8	PFUnA	7,90 (est) ⁷⁰	-0,17 (np) ⁶⁷	160 – 230°C (np) ⁶⁷	7,09 x 10 ⁻⁶ mol/L (est) ⁶⁷
	307-55-1	PFDoA	8,76 (est) ⁷⁰	-0,17 à 0,8 (np) ⁶⁷	245°C (np) ⁶⁷	1,14 x 10 ⁻⁶ mol/L (est) ⁶⁷
	72629-94-8	PFTrA	8,76 (est) ⁷⁰		224-261 (est) ⁷¹	3,01 x 10 ⁻⁷ mol/L (est) ⁶⁷
	376-06-7	PFTeA	9,95 (est) ⁷⁰	-0,21 (est) ⁷¹	276°C (np) ⁶⁷	4,20 x 10 ⁻⁸ mol/L (est) ⁶⁷
	172155-07-6	PF-3,7-DMOA	7,30 (est) ⁷⁰		201°C (est) ⁷⁰	
Esters PFOA	376-27-2	Me-PFOA	5,78 (est) ⁷⁰		158°C (exp) ⁷⁰	1,25 x 10 ⁻⁶ mol/L (est) ⁷⁰
	3108-24-5	Et-PFOA	6,23 (est) ⁷⁰		159°C (est) ⁷⁰	9,59 x 10 ⁻⁷ mol/L (est) ⁷⁰
PFASs	375-73-5	PFBS	1,98 (est) ⁶⁹	-6,0 à -5,0 (np) ⁶⁷	210°C (est) ⁶⁹	2,41 x 10 ⁻² mol/L (est) ⁶⁹
	355-46-4	PFHxS	3,44 (est) ⁶⁹	-6,0 à -5,0 (np) ⁶⁷	228°C (est) ⁶⁹	3,36 x 10 ⁻⁴ mol/L (est) ⁶⁹
	375-92-8	PFHpS	4,06 (est) ⁶⁹		226°C (est) ⁶⁹	3,63 x 10 ⁻⁴ mol/L (est) ⁶⁹
	1763-23-1	PFOS	4,05 (est) ⁶⁹	-6 à -2,6 (np) ⁷²	238°C (est) ⁶⁹	2,79 x 10 ⁻⁴ mol/L (est) ⁶⁹
	335-77-3	PFDS	5,81 (est) ⁶⁹	0,14 (est) ⁷¹	250°C (est) ⁶⁹	8,44 x 10 ⁻⁵ mol/L (est) ⁶⁹
FTSs	757124-72-4	4:2 FTS	3,21 (est) ⁶⁷		216°C (est) ⁷¹	8,50 x 10 ⁻² mol/L (est) ⁶⁷
	27619-97-2	6:2 FTS	4,44 (est) ⁶⁷	1,3 (np) ⁷²	219-272°C (est) ⁷¹	3,04 x 10 ⁻³ mol/L (est) ⁶⁷
	39108-34-4	8:2 FTS	5,66 (est) ⁶⁷	1,32 (np) ⁶⁷	224-293°C (est) ⁷¹	1,14 x 10 ⁻⁴ mol/L (est) ⁶⁷
	120226-60-0	10:2 FTS	6,91 (est) ⁶⁷		220°C (est) ⁷⁰	3,18 x 10 ⁻⁶ mol/L (est) ⁶⁷
FOSAs	754-91-6	PFOSA	5,95 (est) ⁶⁹	pKa > 7,0 (est) ⁷⁴	221°C (est) ⁶⁹	7,72 x 10 ⁻⁶ mol/L (est) ⁶⁹
	31506-32-8	Me FOSA	6,07 (est) ⁶⁹	6,5 (est) ⁷⁴	224°C (est) ⁶⁹	7,70 x 10 ⁻⁶ mol/L (est) ⁶⁹
	4151-50-2	Et FOSA	6,25 (est) ⁶⁹	6,8 (est) ⁷⁴	230°C (est) ⁶⁹	3,36 x 10 ⁻⁵ mol/L (est) ⁶⁹
FOSEs	24448-09-7	N-MeFOSE	5,94 (est) ⁶⁹	14,9 (est) ⁷⁴	261°C (est) ⁶⁹	6,05 x 10 ⁻⁴ mol/L (est) ⁶⁹
	1691-99-2	N-EtFOSE	6,31 (est) ⁶⁹	14,9 (est) ⁷⁴	270°C (est) ⁶⁹	2,64 x 10 ⁻⁷ mol/L (exp) ⁶⁹
FTOHs	2043-47-2	4:2 FTOH	2,95 (est) ⁶⁹		115°C (est) ⁶⁹	1,14 x 10 ⁻² mol/L (est) ⁶⁹
	647-42-7	6:2 FTOH	4,56 (est) ⁶⁹	14,7 (est) ⁷⁴	154°C (est) ⁶⁹	8,55 x 10 ⁻⁴ mol/L (est) ⁶⁹
	678-39-7	8:2 FTOH	6,06 (est) ⁶⁹	14,7 (est) ⁷⁴	183°C (est) ⁶⁹	5,56 x 10 ⁻⁵ mol/L (est) ⁶⁹
	865-86-1	10:2 FTOH	7,49 (est) ⁶⁹	14,7 (est) ⁷⁴	213°C (est) ⁶⁹	7,63 x 10 ⁻⁶ mol/L (est) ⁶⁹
FTAs	17527-29-6	6:2 FTA	5,66 (est) ⁶⁹	-5,3 (est) ⁷⁴	178°C (est) ⁶⁹	6,93 x 10 ⁻⁴ mol/L (est) ⁶⁹
	27905-45-9	8:2 FTA	7,15 (est) ⁷⁰	-5,3 (est) ⁷⁴	201°C (est) ⁷⁰	
	17741-60-5	10:2 FTA	7,99 (est) ⁶⁹		231°C (est) ⁶⁹	2,61 x 10 ⁻⁵ mol/L (est) ⁶⁹
	2144-53-8	6:2 FTMA	5,99 (est) ⁶⁹		188°C (est) ⁶⁹	7,54 x 10 ⁻⁵ mol/L (est) ⁶⁹
	1996-88-9	8:2 FTMA	7,57 (est) ⁷⁰		215°C (est) ⁷⁰	

2 Bibliographies techniques sur la quantification des PFCs

La quantification des PFCs nécessite plusieurs étapes allant de l'extraction à la détection (Figure 26).

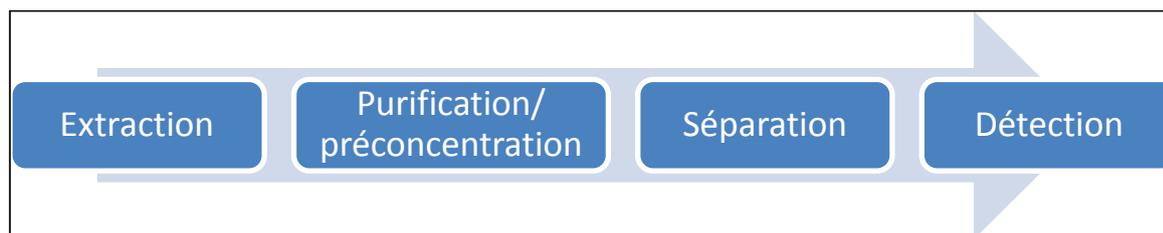


Figure 26 : les différentes étapes menant à la quantification des PFCs

L'extraction des PFCs d'une matrice donnée doit être adaptée à cette matrice et peut éventuellement se poursuivre par une étape de purification et/ou concentration de l'échantillon. Ensuite, les différents PFCs doivent être séparés avant d'être détectés et quantifiés de façon spécifique et avec suffisamment de sensibilité pour répondre aux exigences réglementaires présentées précédemment.

2.1 Extraction

La première étape est l'extraction des PFCs, elle est spécifique à la matrice étudiée. L'échantillon est pesé et sa surface mesurée pour pouvoir rendre des résultats en mg/kg mais aussi en $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de cuir.

La quantification des PFCs dans les cuirs commence par une étape de préparation de l'échantillon : le découpage. La norme ISO 23702-1, sur la quantification des PFCs par LC-MS/MS, précise que l'échantillon de cuir doit être découpé en suivant la norme ISO 4044. Cette dernière définit la taille des morceaux de cuir de 3 à 5 mm de côté. Le découpage a l'avantage de nécessiter une plus faible quantité d'échantillon que le broyage. Cependant, le broyage peut conduire à une meilleure extraction des composés. En effet, l'état de division de l'échantillon est susceptible de jouer sur l'extraction des composés et donc sur les résultats obtenus. Par conséquent, il est important de préciser la méthode de préparation utilisée.

Ensuite, les PFCs des cuirs sont extraits avec un solvant adapté. Il est pertinent d'extraire le plus de PFCs possible du cuir comme certains sont des composés organiques persistants qui peuvent contaminer la chaîne alimentaire. Les PFCs étant des composés hydrophobes, des solvants organiques sont choisis pour les extraire. Ainsi, les solvants organiques comme l'acétone, le méthanol et l'acétate d'éthyle peuvent être utilisés, ou encore, le Méthyl Tert-Butyl Ether (MTBE) en présence d'hydrogénéosulfate de TétrabutylAmmonium (TBA) qui permet la formation de paires d'ions avec les PFCs anioniques.

Le Tableau 5 présente les conditions d'extraction de différents PFCs dans les cuirs incluant la préparation de l'échantillon, le choix du solvant et les conditions de température et de temps de l'extraction au bain à ultra-sons.

Tableau 5 : différentes conditions d'extraction des PFCs dans les cuirs

Référence	Analytes	Préparation	Solvant	Conditions
75	9 PFCAs, PFOS et PFOSA	1 g de cuir coupé (morceaux de 3-5 mm de côté)	10 mL de MTBE et 3 mL de TBA (169,8 g/L)	1h aux ultrasons à 30°C 2 ^{ème} extraction dans les mêmes conditions avec 3 mL de MTBE
76	11 PFCAs et 5 PFASs et le PFOSA	cuir découpé avec un poinçon de 25 mm de diamètre	10 mL d'acétone	30 min aux ultrasons, puis 30 min sous agitation
77	10 PFCAs, 4 PFASs, 2 FTSS, le PFOSA	1 g de cuir de surface connue	Méthanol	3 x 10 min aux ultrasons avec agitation entre chaque période de 10 min
	4 FTOHs	1 g de cuir de surface connue	Acétate d'éthyle	3 x 10 min aux ultrasons avec agitation entre chaque période de 10 min
73	11 PFCAs, 4 PFASs	carré de 10 x 10 cm ² de cuir coupé en petits morceaux	Méthanol	2 x 15 min aux ultrasons avec agitation entre les deux
	4 FTOHs, 2 FOSEs et 2 FOSAs		Acétate d'éthyle	2 x 15 min aux ultrasons avec agitation entre les deux

Il n'y a pas d'harmonisation concernant le choix du solvant d'extraction. Ce dernier est choisi pour sa volatilité (facilitant son évaporation) ou pour sa compatibilité avec la méthode analytique utilisée. Ainsi, l'acétone permet une étape d'évaporation rapide pour concentrer l'échantillon ou bien le reprendre dans un solvant adapté à son analyse⁷⁶. Pour le méthanol et l'acétate d'éthyle, ils présentent l'avantage d'être compatibles avec la LC et la GC respectivement, évitant une étape de changement de solvant^{73,77}.

L'efficacité de 4 solvants (le méthanol, l'acétonitrile, une solution à 2% d'acide formique et le MTBE en présence de TBA) est comparée pour une extraction pendant 1h à 30°C aux ultrasons d'un cuir dopé à 5 ng/mL en PFCs⁷⁵. Les taux de recouvrement obtenus ne sont pas présentés mais il est mentionné qu'ils sont plus élevés pour le MTBE en présence de TBA⁷⁵. L'inconvénient de ce solvant est sa non miscibilité avec l'eau, donc une étape de changement de solvant est parfois nécessaire, par exemple, avant une purification par extraction sur phase solide (SPE) en mode échange d'ions. Or, cette étape est longue et difficile à mettre en œuvre pour les échantillons de cuir en routine.

Cette étape peut également extraire d'autres composés du cuir tels que les colorants, les matières grasses et d'autres produits intervenant dans la fabrication du cuir. Ces composés co-extraits peuvent potentiellement interférer sur la quantification des PFCs. Une étape de purification peut alors être nécessaire.

2.2 Purification et/ou préconcentration

Comme vu précédemment, il y a un nombre limité d'études sur l'analyse des PFCs dans les cuirs. Les parties suivantes sont donc élargies aux autres matrices (la matrice la plus étudiée étant aussi la plus simple : l'eau). La purification doit être adaptée à la matrice mais aussi aux analytes. Ainsi, les purifications pour les autres matrices permettent d'affiner le choix d'une étape de purification adaptée aux analytes et de donner une première idée sur les mécanismes de rétention mis en jeu.

Les extractions sur phase solide (SPE) qui précèdent l'analyse des PFCs reposent sur un mécanisme de rétention en phase inverse, associé dans certains cas à des interactions hydrophiles ou bien à des interactions électrostatiques (échange d'ions). Une purification par mécanisme d'exclusion stérique a également été envisagée.

Les différents adsorbants présentés dans le Tableau 6 ont été mis en œuvre dans le cas de la purification d'échantillons aqueux contenant des PFCs. L'extraction sur phase solide (SPE) peut être mise en œuvre sous forme de cartouche⁷⁸, ou bien sous forme dispersive⁷⁹, en mode « off-line » ou directement « in-line »⁸⁰ avec la séparation chromatographique. Pour certaines matrices complexes comme les aliments^{81,82} ou les sédiments⁸³, un enchaînement de deux étapes successives de SPE s'est avéré nécessaire. Ainsi, la SPE par échange anionique faible (WAX) permet une première concentration et purification des extraits⁸³ et est suivie par de la SPE sur support Envi Carb (support de carbone graphitique) qui a pour but d'éliminer les substances colorées (composés aromatiques) afin de purifier l'extrait⁸² pour améliorer la forme de pics et la stabilité de leur temps de rétention dans le cadre de l'analyse d'échantillons environnementaux⁸³. Le Tableau 7 regroupe les différentes études avec pour chacune, la matrice concernée, les familles analysées, le choix de la cartouche SPE, les conditions SPE (conditionnement, dépôt, lavage et élution) ainsi que les rendements obtenus.

Tableau 6 : structures et mécanismes de rétention des différents adsorbants SPE pour la purification et/ou concentration précédant l'analyse des PFCS

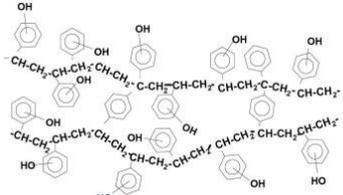
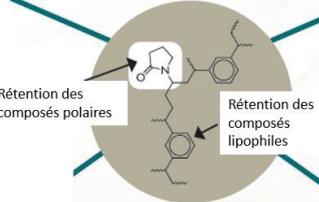
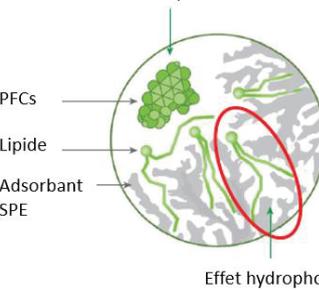
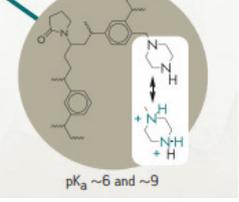
Nom de l'adsorbant SPE	Structure chimique	Mécanisme de rétention
SPE Isolute ENV +	 <p>figure issue de⁸⁴</p>	phase inverse
SPE HLB (Hydrophilic-lipophilic balanced)	 <p>figure adaptée de⁸⁵</p>	phase inverse et interaction hydrophile
SPE Captiva EMR (Enhanced Matrix Removal)-lipid	 <p>figure adaptée de⁸⁶</p>	phase inverse et exclusion stérique
SPE Envi Carb	<p>carbone en surface sous forme de cycles hexagonaux interconnectés et sous forme de feuillet graphite⁸⁷</p>  <p>figure issue de⁸⁸</p>	phase inverse et phénomènes de dipôles induits entre le soluté et la surface polarisable
SPE WAX (Weak Anion-eXchange)	 <p>figure issue de⁸⁵</p>	Echangeuse d'anions et phase inverse

Tableau 7 : différentes SPE utilisées pour la purification et/ou la concentration des PFCs. Abréviations : AA : Acide Acétique Ac : Acétate, AcAm : Acétate d'ammonium, ACN : Acétonitrile, AF : Acide formique, H₂O : eau, MeOH : Méthanol, MTBE : Méthyl Tert-Butyl Ether et NH₄OH : ammoniac

	Matrice	Famille des analytes	Cartouche SPE	SPE Conditionnement	SPE Dépôt	SPE Lavage	SPE Elution	Rendements
79	Particules en suspension	13 PFASs, 5 PFASs, 3 FOSAs et 2 FOSES	C18 (150 mg) carbone noir graphité (50 mg)	SPE dispersive	Surnageant	Non	Surnageant	Elimination des pigments haut taux de recouvrement 81,3%–104%
	Eau		WAX (60 mg)	NH ₄ OH dans MeOH, MeOH, H ₂ O	100 mL d'échantillon aqueux	Tampon Ac à pH=4,5, H ₂ O, MeOH	6 mL de 0,1% de NH ₄ OH dans le MeOH	
83	Sédiments, eaux usées et autres	PFOA PFOS	WAX (150 mg)	1% de NH ₄ OH MTBE/MeOH (90:10), MeOH, H ₂ O	Dilution par 5 H ₂ O Echantillons solides + ajout AF	Solution à 2% AF, MeOH	7 mL de 1% de NH ₄ OH dans MTBE/MeOH (90/10)	Pas de perte pendant le lavage
			Carbone graphité (100 mg)	1% NH ₄ OH MTBE/MeOH (90/10)	Extrait de la SPE WAX précédente		7 mL de 1% de NH ₄ OH dans MTBE/MeOH (90/10)	
78	Eau et sédiments	6 PFASs, 3 PFASs	WAX (60 mg)	0,1% de NH ₄ OH dans le MeOH MeOH, H ₂ O	200 mL d'échantillon	Tampon Ac à pH=4, MeOH	4 mL de 0,1% de NH ₄ OH dans le MeOH	69–110% pour l'eau et 62–103% pour les sédiments dopés
89	Coquille de bivalve	9 PFASs et PFOS	WAX (150 mg)	0,1% de NH ₄ OH dans le MeOH, H ₂ O	Dilution avec H ₂ O (100 ml) et ajustement pH 6	Tampon Ac à 25 mM (pH=4)	4 mL de 0,1% de NH ₄ OH dans le MeOH	92–104% échantillon dopé
90	Poisson	3 PFASs, 7 PFASs	WAX (60 mg)	0,03% de NH ₄ OH dans le MeOH, MeOH, H ₂ O	Dilution par 10 avec H ₂ O	Tampon Ac à pH=4, MeOH	4 mL de 0,03% de NH ₄ OH dans le MeOH	Non renseigné
75	Cuir	9 PFASs, PFOS et le PFOSA	WAX (150 mg)	0,1 % de NH ₄ OH dans le MeOH, H ₂ O	Non mentionné	Solution à 2 % Ac (pH=4)	8 mL de 0,1 % de NH ₄ OH dans le MeOH	65-96 % sur points de contrôle
91	Sang	5 PFASs, 10 PFASs, 2 FOSAs	WAX (150mg)	0,1% de NH ₄ OH dans le MeOH, MeOH, H ₂ O	Dilution de l'extrait	Tampon Ac à 25 mM (pH=4)	4 mL MeOH 4 mL de 0,1% de NH ₄ OH dans le MeOH	70%-120% sur matrice dopée
92	Produits de la mer	10 PFASs et 3 PFASs	WAX (150 mg)	MeOH, H ₂ O	Surnageant de l'extrait	H ₂ O 2% d'AF, H ₂ O/MeOH 50/50 2% d'AF, MeOH	3 mL de 9% NH ₄ OH dans le MeOH	Non renseigné

81	Aliments	13 PFCA et 3 PFAS	WAX (150 mg)	MeOH, H ₂ O	Dilution de l'extrait (ajout de 15 mL H ₂ O)	Tampon Ac à pH=4, 40%MeOH dans H ₂ O, MeOH	2 mL de 2% NH ₄ OH dans le MeOH	Non renseigné
			ENVI-carb (50 mg) 100 µL AA	SPE dispersive		Filtration à 0,2 µm	Non renseigné	
82	Légumes, fruits, viandes et poissons	11 PFCA et 2 PFAS	WAX (150 mg)	Non précisé	Dilution de 6 mL d'échantillon avec 9 mL d'H ₂ O	Tampon Ac à pH=4 THF/ACN 50/50	6 mL de 0,1% NH ₄ OH dans le MeOH	88%-110% pour matrice dopée
			Supelclean ENVI-carb (250 mg) (en ligne avec SPE précédente)					
73	Textiles, tapis et matériaux en contact avec les aliments	11 PFCA et 4 PFAS	ENVI-Carb (50 mg)	SPE dispersive ajout d'AA	1 mL d'extrait		Surneigeant + dilution par deux avec 2 mM en AcAm	46-108% pour EI
			ENVI-Carb (50 mg)	SPE dispersive	1 mL d'extrait		Prélèvement surneigeant	62-143% pour EI
93	Eau	8 PFCA et 3 PFAS	HLB (500 mg)	MeOH, H ₂ O	500 mL de surneigeant	Non	4 mL MeOH	97,3-113,0% pour échantillons dopés
			Sep Pak Vac tC18 (1 g)	MeOH, H ₂ O	40 mL d'échantillon	Non	5 ou 2,5 mL de 100% MeOH	Non renseigné
80	Eaux souterraines	4 PFCA et 2 PFAS	Colonne C18 (12 µm, 2,1 x 20 mm)	SPE en ligne 100% A : 1 g/l solution AcAm	Volume d'injection 1 mL		Gradient LC (jusqu'à A:B 5:95) avec B : 50/50 MeOH/ACN	Non renseigné
			C18 (108 mg)	SPE dispersive	5 mL d'ACN	Non	Récupération de la phase organique	94%-113% pour des échantillons dopés
96	Sérum maternel	3 PFAS, 7 PFCA, 3 FOSA	Colonne C18 (10 mm x 2 mm)	MeOH, Solution d'AF à 0,1M	Ajout d'AF	80% 0,1M AF/20% MeOH	En ligne avec LC	Non renseigné
			C18 et carbone graphité (150 mg + 10 mg)	SPE dispersive	Reprise dans 1 mL de MeOH	Non	0,22 µm membrane	60%-129% pour des échantillons dopés
98	Air intérieur	4 FTOH, 2 FOSA et 2 FOSA	Isolute ENV+ (5 g)	30 mL d'acétate d'éthyle		Non	34 mL d'acétate d'éthyle	17%(4:2 FTOH)-390%(10:2 FTOH)
			Envi Carb (100 mg)	SPE dispersive ajout d'AA pour PFCA (sauf pour les FTOH)	1 mL d'extrait	Non	Prélever le surneigeant	64%-126% EI dans les échantillons
77	Biens de consommation dont les cuirs	10 PFCA, 4 PFAS, 2 FTS, PFOSA et 4 FTOH	Envi Carb (100 mg)	SPE dispersive ajout d'AA pour PFCA (sauf pour les FTOH)	1 mL d'extrait	Non	Prélever le surneigeant	64%-126% EI dans les échantillons

La SPE est utilisée dans l'analyse de l'eau pour purifier et surtout concentrer l'échantillon afin de détecter des PFCs à l'état de traces. Dans les cuirs, la SPE est essentiellement mise en œuvre pour purifier l'extrait de cuir, une matrice complexe.

La cartouche SPE Isolute Env+ permet, outre l'extraction de composés apolaires selon un mécanisme de phase inverse, la rétention de composés plus polaires non retenus par une cartouche C18 par sa structure copolymère divinylbenzène-polystyrène hydroxylé⁹⁸. Comme les composés interférents posant problème pour l'analyse des PFCs ne sont pas précisément connus, il n'est pas possible de savoir quel pH favoriserait leur ionisation. De plus, il y a uniquement l'application pour l'analyse des PFCs dans l'air qui utilise cette cartouche et seulement pour les PFCs neutres et volatiles (2 FOSEs, 2 FOSAs, 4 FTOHs)⁹⁸.

La SPE EMR lipid n'a pas été mise en œuvre dans les études précédentes mais elle pourrait être envisagée pour la matrice cuir. Elle utilise un mécanisme d'exclusion stérique associé à un mécanisme de phase inverse pour éliminer les composés « gras » de la matrice. Dans le procédé de fabrication du cuir, il y a l'étape de renourriture, étape où le cuir est traité avec des huiles, des graisses, des cires ou des matériaux similaires¹¹. Si ces composés « gras » sont co-extraits dans les conditions d'extraction utilisées pour les PFCs, ils peuvent être responsables d'effets matrices, il serait donc intéressant de les éliminer. Le problème de la cartouche EMR lipid est que les PFCs ont également des chaînes linéaires apolaires comme les lipides. Ainsi, les PFCs les plus apolaires comme les FOSEs et les FOSAs pourraient être retenus sur la cartouche par effet hydrophobe.

La SPE Envi Carb est mise en œuvre sur échantillons aqueux et sur des extraits organiques miscibles avec l'eau⁸⁷. Elle permet essentiellement d'éliminer les composés aromatiques colorés et les pigments. Comme l'extrait est dans un solvant organique, les PFCs ne s'adsorbent pas sur la cartouche^{79,83,99} seuls les pigments et les interférences aromatiques^{100,101} sont retenus (rétention des molécules planes favorisée par rapport aux structures tridimensionnelles). Il n'y a alors pas de pré-concentration des molécules cibles de l'échantillon¹⁰¹. Cette SPE est également mise en œuvre en mode dispersive, ce qui signifie que l'adsorbant est ajouté sous forme dispersée à la matrice. Après mélange et contact de l'adsorbant et de l'échantillon, le surnageant correspondant à l'échantillon purifié^{77,79} est prélevé ou une centrifugation / filtration, permet de séparer le solide du liquide¹⁰². Le mode dispersif permet un meilleur contact entre l'adsorbant et la matrice et est plus rapide à mettre en œuvre qu'une SPE sur cartouche.

La SPE WAX met en œuvre des interactions électrostatiques entre les groupements amines ionisés de son support et les fonctions acides carboxyliques et sulfonates des PFCs⁷⁵. Elle semble convenir à plusieurs familles de PFCs telles que les PFCAs, les PFASs, les FOSAs et les FOSEs⁷⁹. En général, la cartouche est conditionnée avec de l'ammoniaque dans le méthanol, du méthanol puis de l'eau^{78,79,90,91}. Les interactions ioniques reposent sur deux amines dont les pKa sont de 6 et 9⁸⁵ sur le

support. Ainsi, même une fois que la cartouche a été équilibrée avec de l'eau, une des deux amines est totalement sous forme chargée⁸⁵. Pour le dépôt sur cette cartouche, il est préférable d'acidifier l'échantillon aqueux⁷⁹ ou de le diluer avec de l'eau⁹⁰ pour favoriser les interactions ioniques^{83,89}. Le premier lavage se fait avec une solution tampon à un pH acide^{75,78,79,90,91} puis un second lavage peut être réalisé avec du méthanol^{78,83,90}. Ce second lavage présente le risque d'éluer les composés neutres retenus exclusivement par un mécanisme de phase inverse. Enfin, l'élution est effectuée avec du méthanol contenant de l'ammoniaque pour supprimer l'ionisation des fonctions amines de surface à l'origine des interactions électrostatiques^{75,78,79,82,89,90}. Les rendements sur matrice dopée après purification SPE sont de 62% pour les sédiments⁷⁸ et de 120% pour le sang⁹¹. Ainsi des potentielles pertes peuvent avoir lieu pendant la SPE WAX. De plus, la SPE WAX n'élimine peut-être pas tous les composés co-extraits interférents pouvant provoquer une modification du signal (suppression ou exaltation).

La SPE WAX a été comparée à la SPE HLB pour la purification d'un échantillon d'eau dopé⁷⁹. Ainsi, les rendements obtenus avec ces deux cartouches pour chaque PFC analysé (13 PFCAs, 5 PFASs, 3 FOSAs et 2 FOSEs) sont présentés en Figure 27.

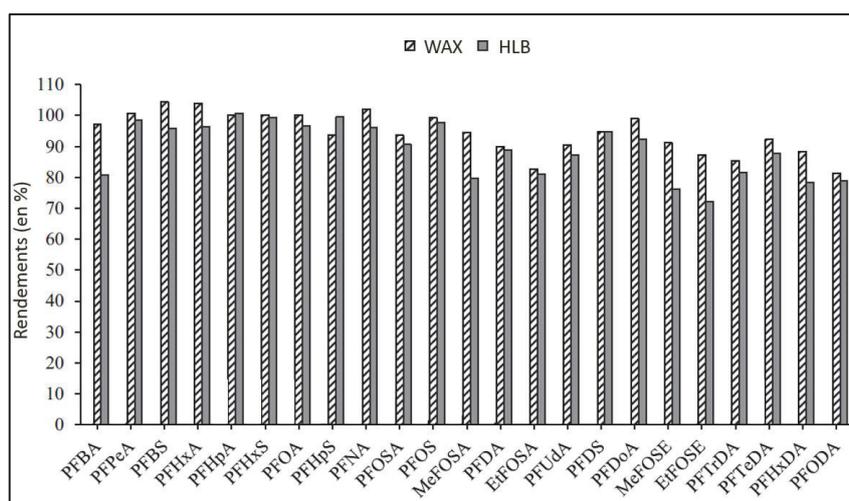


Figure 27 : comparaison des rendements obtenus pour la purification par SPE WAX (60 mg) ou HLB (60 mg) de 100 mL d'eau dopé. Pour la SPE WAX, le conditionnement est réalisé avec du méthanol avec 0,1% d'ammoniaque, du méthanol et de l'eau. Le lavage utilise une solution tampon à pH 4,5, de l'eau et du méthanol, l'élution est mise en œuvre avec du méthanol contenant 0,1% d'ammoniaque. Pour la SPE HLB, il est uniquement précisé que le lavage ne contient pas plus de 10% de méthanol pour empêcher la perte des PFCs à chaîne courte. Adaptée de ⁷⁹

Cette figure montre que les rendements sont compris entre 81% et 104% et entre 72% et 101% pour les SPE WAX et HLB respectivement⁷⁹. Ces rendements sont élevés pour les deux cartouches⁷⁹. Cependant, pour la SPE HLB les PFCs à chaîne courte risquent d'être perdus au moment du lavage quand ce dernier contient plus de 10% de méthanol⁷⁹. Or, un lavage avec très peu de méthanol ne permet pas d'éliminer suffisamment d'impuretés apolaires⁷⁹. D'autres études ont souligné que la SPE HLB mène à de faibles rendements pour les PFCs les plus polaires (les PFCAs avec une courte chaîne

de 4 à 6 carbones et le PFHxS)^{99,103}. Il est donc préférable d'utiliser la SPE WAX lorsque les PFCs analysés incluent des PFCs à chaîne courte.

L'enchaînement de deux étapes de SPE, la SPE WAX puis la SPE Envi Carb, s'est montré nécessaire en raison de pertes de 50-60% pour les acides perfluorés carboxyliques avec 13 et 14 carbones, lorsqu'ils sont analysés directement après SPE WAX⁸². L'échantillon n'est pas suffisamment purifié et nécessite une SPE supplémentaire. L'utilisation de ces deux étapes de SPE permet d'atteindre des rendements en étalons internes entre 70 et 107% pour un saumon dopé (Tableau 8)⁸².

Tableau 8 : taux de recouvrement pour un saumon dopé purifié par SPE WAX puis SPE Envi Carb. Adapté de ⁸²

Etalons internes	Taux de recouvrement pour le saumon (en %)
¹³ C ₄ -PFBA	104 ± 3
¹³ C ₂ -PFHxA	105 ± 3
¹³ C ₄ -PFOA	102 ± 3
¹³ C ₂ -PFNA	75 ± 3
¹³ C ₂ -PFDA	70 ± 5
¹³ C ₂ -PFUnA	83 ± 3
¹³ C ₄ -PFHxS	105 ± 6
¹³ C ₄ -PFOS	107 ± 1

Dans le cadre de l'analyse des PFCs dans les sédiments, l'ajout de la SPE Envi Carb après la SPE WAX a permis l'élimination des substances colorées, une amélioration de la forme des pics et de la stabilité des temps de rétention⁸³. En revanche, aucune diminution des effets matrices n'est observée⁸³.

Une autre méthode est présentée pour la détermination de PFCAs et PFSASs dans les légumes verts¹⁰⁴. Il s'agit d'une extraction et purification QuEChERS suivant les étapes de la Figure 28. QuEChERS signifie rapide (Quick), facile (Easy), peu cher (Cheap), efficace (Effective), robuste (Rugged) et sûr (Safe)¹⁰⁴. L'extraction des aliments broyés est réalisée dans l'acétonitrile avec 1% d'acide formique¹⁰⁴. Ensuite, des sels sont ajoutés pour favoriser le transfert des PFCs de la phase aqueuse vers la phase organique et permettre la démixion. Enfin, la purification QuEChERS est mise en œuvre par descente de la colonne entraînant la mise en contact de la phase organique et de l'adsorbant (Figure 29)¹⁰⁴. Le surnageant correspond à l'extrait purifié qui est ensuite préparé à être analysé.

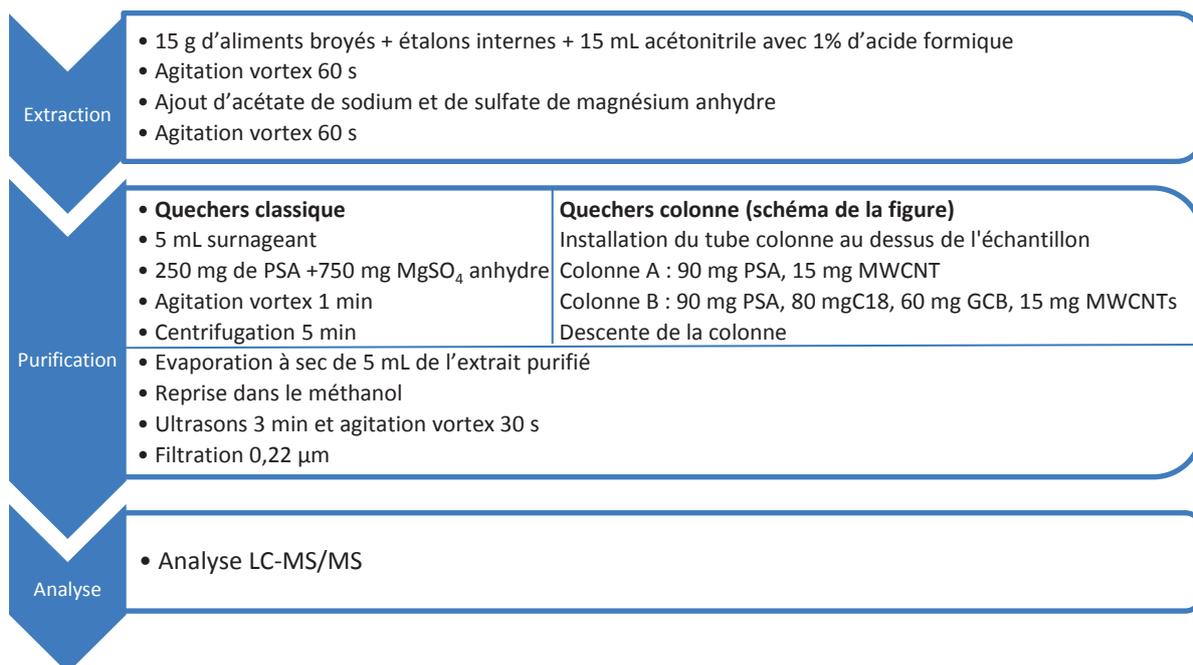


Figure 28 : mode opératoire d'une extraction et purification QuEChERS pour l'analyse de PFCAs et PFASs dans les légumes verts. Abréviations : GCB : carbone noir graphité, MgSO₄ : sulfate de magnésium, MWCNT : nanotubes de carbone à parois multiples, PSA : amines primaires et secondaires. Adaptée de ¹⁰⁴

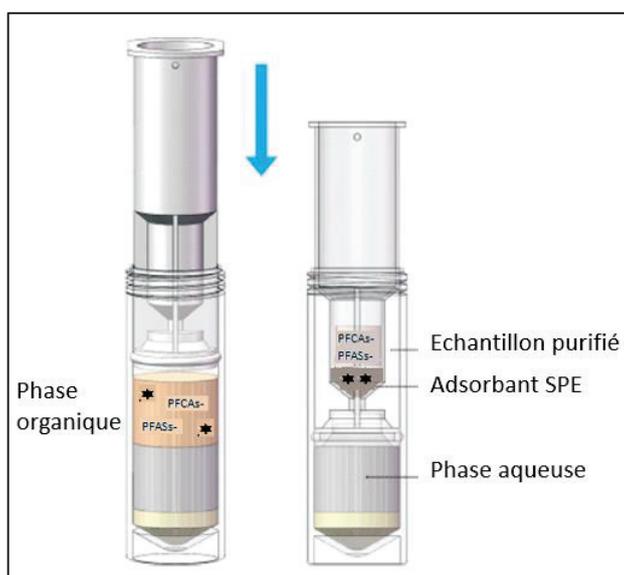


Figure 29 : mise en œuvre d'un QuEChERS colonne (adsorbant SPE) pour l'analyse de PFCAs et PFASs dans les légumes verts¹⁰⁴

L'adsorbant est choisi pour purifier le plus possible la matrice. Ainsi, les fonctions amines primaires et secondaires (PSA) du support permettent de retirer les acides gras et les composés organiques acides¹⁰⁴. Le C18 adsorbe les composés organiques co-extraits¹⁰⁴. Le carbone noir graphité (GCB) et les nanotubes de carbone à parois multiples (MWCNTs) permettent d'adsorber les pigments. Le contenu de la colonne est adapté en fonction de la complexité de la matrice. Ainsi, pour le concombre et le poireau considérés comme des matrices complexes, la colonne B contenant du C18 et du carbone noir graphité, en plus du PSA et du MWCNTs également contenus dans la colonne A, est utilisée¹⁰⁴. Les

QuEChERS colonnes (A et B) sont comparés à une SPE WAX et au QuEChERS habituel utilisant une SPE dispersive avec du PSA et du sulfate de magnésium anhydre. Les rendements obtenus avec ces différentes méthodes de purification sont comparés pour le poireau en Figure 30¹⁰⁴.

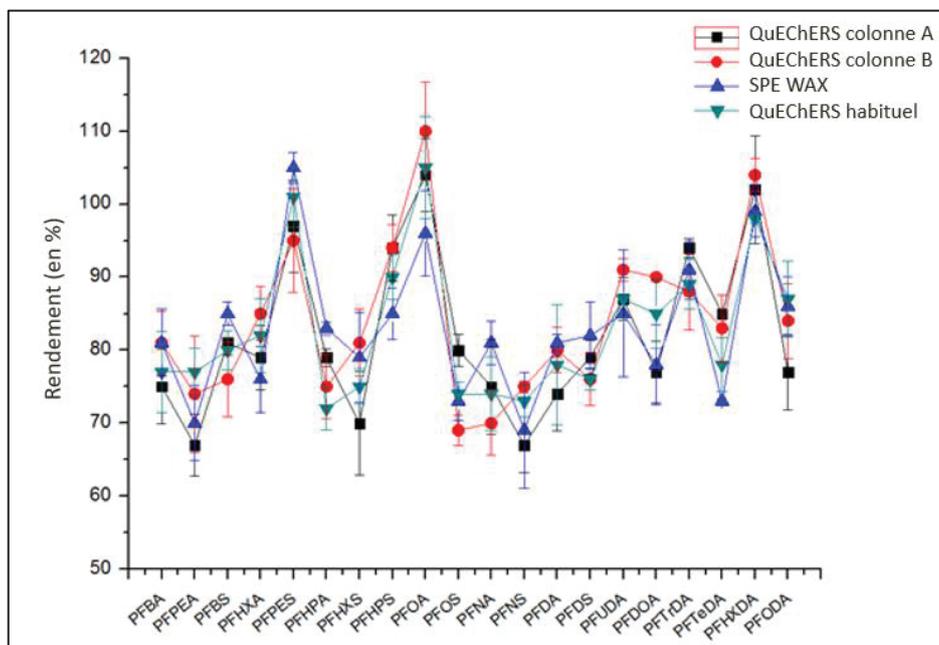


Figure 30 : comparaison des rendements (en %) pour un échantillon de poireaux dopé et purifié avec différentes méthodes incluant le QuEChERS colonne A (90 mg de amines primaires et secondaires, 15 mg de nanotubes de carbone à parois multiples), le QuEChERS colonne B (même composition que la colonne A, 80 mg de C18 et 60 mg de carbone noir graphité) la SPE WAX et un QuEChERS suivant un mode opératoire habituel¹⁰⁴

Il n'y a pas de différence significative pour les rendements obtenus avec les différentes méthodes pour les PFCs analysés. Les QuEChERS colonnes donnent des rendements similaires aux autres méthodes de purification mais présentent l'avantage d'être plus rapides et plus pratiques à mettre en œuvre que les autres méthodes¹⁰⁴.

2.3 Séparation

Le nombre de PFCs analysés étant important, il est souvent nécessaire de les séparer avant de pouvoir les détecter. La problématique de séparation des PFCs est la même quelle que soit la matrice étudiée et repose, avant tout, sur la structure chimique des analytes. Ces derniers sont séparés soit par chromatographie en phase liquide (LC) soit par chromatographie en phase gazeuse (GC).

Certains PFCs comme les PFCAs, les PFASs et les FTSS ont une structure ionique et sont peu volatiles²³. Ils ne peuvent donc pas être analysés en GC sans dérivation préalable²³. C'est pourquoi ils sont dosés par LC^{73,77,78}.

A la différence du PFOA, dans les composés comme le Me-PFOA, la fonction carboxylique est remplacée par un ester ce qui les rend non ionisables en électrospray. Ils peuvent être séparés par GC¹⁰⁵.

Certains télomères fluorés sont volatils, ils sont alors analysés en GC²³. Ainsi les FTOHs sont séparés par GC^{73,77,106} tout comme les FTAs^{106,107}. Les FOSEs et FOSAs sont également volatils¹⁰⁸ donc ils peuvent être séparés en GC^{73,107,109}.

Les FTOHs, les FOSEs et les FOSAs peuvent aussi être analysés en LC^{79,96,110}.

En conclusion, il est choisi de quantifier un maximum de PFCs simultanément (les PFCAs, les PFASs, les FTSs, les FOSAs, FOSEs et les FTOHs) par LC-MS/MS. Tandis que les FTAs et les esters de PFOA, qui ne peuvent pas être ionisés en électrospray, seront analysés par GC-MS.

2.3.1 Chromatographie en phase gazeuse

Plusieurs phases stationnaires GC permettent la séparation des PFCs. Par exemple, Crystal Yeong choisit une colonne GC SH-Rtx™-200 (0,32 mm x 30 m 0,5 µm) pour séparer les FOSEs, FOSAs et FTAs¹²². Cette colonne contient des trifluoropropylmethyl polysiloxanes. En couplage avec la spectrométrie de masse, la limite de quantification est de 5,0 ng/mL¹²². Le chromatogramme MRM de l'ordre d'éluion des PFCs analysés est représenté en Figure 31¹²².

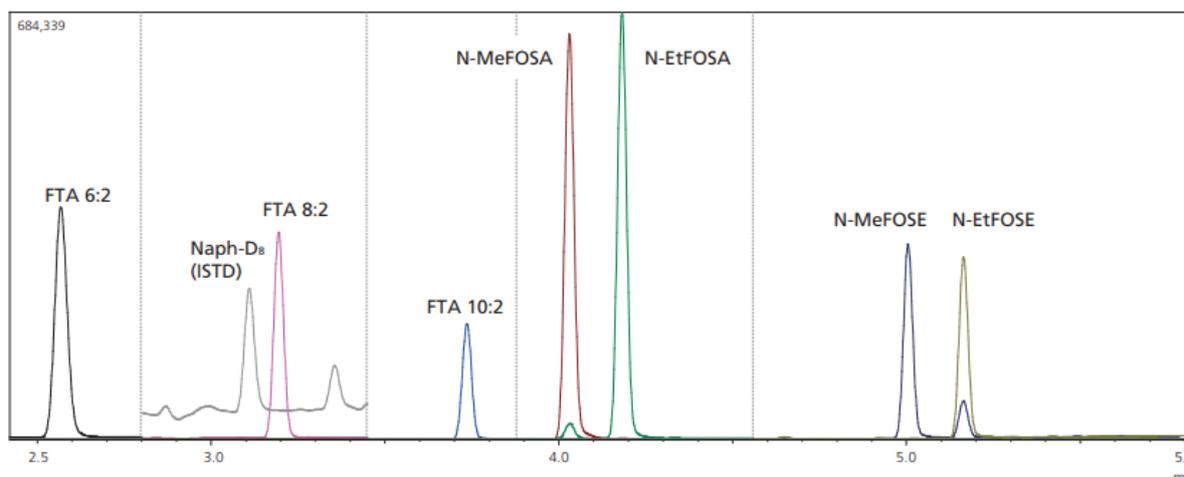


Figure 31 : chromatogramme MRM de l'ordre d'éluion des FOSAs, FTAs et des FOSEs. L'étalon interne est le naphthalène-D₈ (Naph-D₈). La colonne GC est la SH-Rtx™-200 (0,32 mm x 30 m 0,5 µm). L'injection de 2 µL est en mode splitless. Le gradient de température commence à 80°C puis augmente de 30°C par minute pour atteindre 260°C qui est maintenu pendant une minute. Le gaz vecteur est l'hélium à une vitesse constante de 48,7 cm/s et avec une pression initiale de 150 kPa pendant 1 minute. Le détecteur est un triple quadripôle avec une source à ionisation par impact électronique¹⁰⁷

D'autres colonnes peuvent convenir comme la SH-Stabilwax qui contient du polyéthylèneglycol. Cynthia Melanie Lahey utilise cette colonne (0,25 mm x 30 m 0,25 µm) pour réaliser la séparation des FTOHs et des FTAs¹⁰⁶. Les chromatogrammes MRM de la Figure 32 sont obtenus¹⁰⁶.

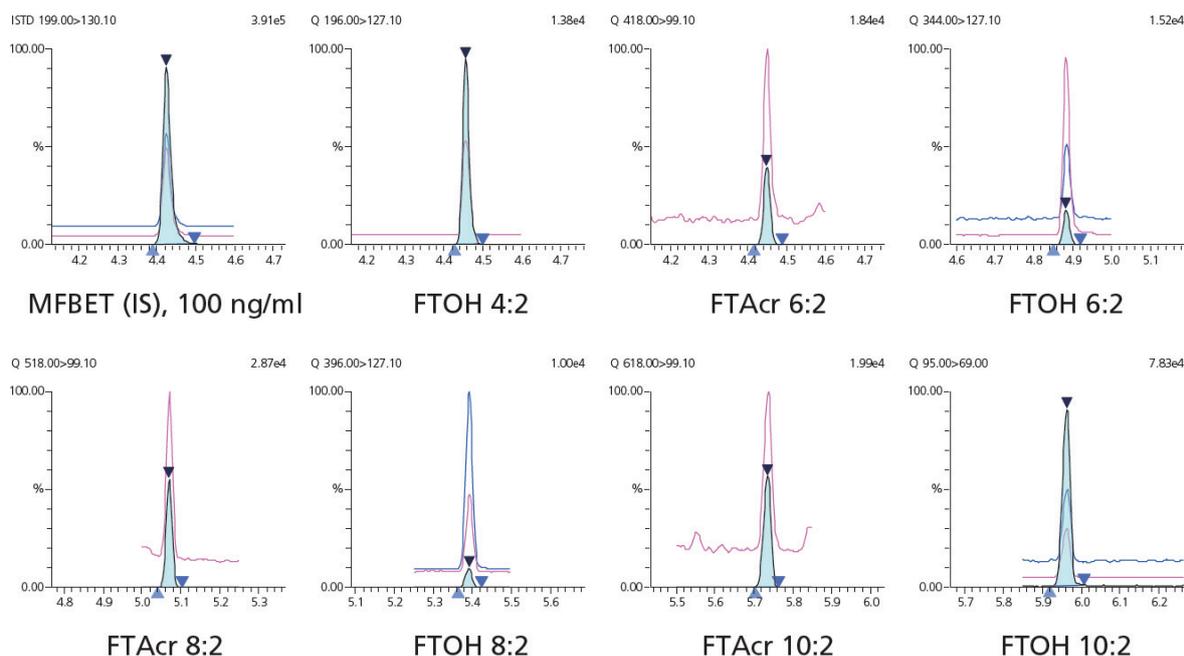


Figure 32 : chromatogrammes d'un point de gamme à 5 ng/mL obtenu avec une colonne GC SH-Stabilwax (0,25 mm x 30 m 0,25 μ m). La détection est un triple quadripôle avec une source à ionisation par impact électronique en acquisition MRM. L'étalon interne est le MFBET (2-Perfluorobutyl-[1,1,2,2- H_2]-éthanol). L'injection de 1 μ L est réalisée en mode splitless. Le gradient commence avec 40°C pendant 1 min puis une augmentation de 20°C par minute jusqu'à 150°C suivi d'une augmentations de 30°C par minute jusqu'à 240°C maintenu pendant 2 minutes. La vitesse du gaz vecteur est de 43,4 cm/s et une pression initiale de 315 kPa est appliquée pendant 1,5 min. Les pics en bleu clair correspondent aux transitions MRM de quantification, les pics en rose ou en bleu foncé aux transitions de qualification¹⁰⁶

2.3.2 Chromatographie en phase liquide

De par leur chaîne carbone-fluor, les PFCs possèdent un caractère hydrophobe²³, mis en évidence précédemment avec les log P, ils sont donc retenus en chromatographie à polarité de phase inversée. Une étude mentionne la colonne C8⁹⁶. La grande majorité utilise une colonne de silice greffée par des chaînes aliphatiques octadécyle (C18)^{75,78-81,83,89-95,97}.

Par exemple, X.F. Wang utilise une colonne Kinetex C18 column (100 mm x 2,1 mm i.d; 2,6 μ m) pour séparer 13 PFCAs, 5 PFAs, 3 FOSAs et 2 FOSEs⁷⁹. La phase mobile contient une solution d'acétate d'ammonium à 5 mM et de l'acétonitrile⁷⁹. Le chromatogramme MRM obtenu est représenté en Figure 33.

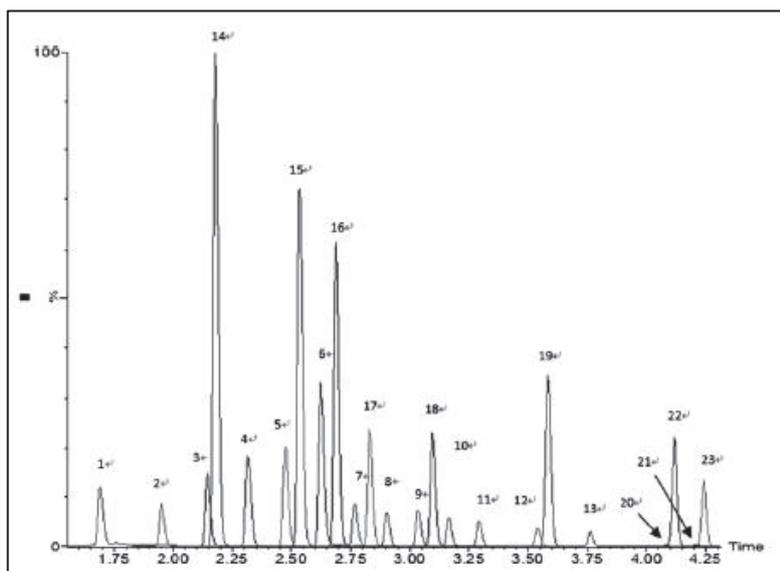


Figure 33 : chromatogramme MRM de 23 PFCs pour un échantillon d'eau dopé à 0,5 µg/L. Colonne LC Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm 2.6 µm), phase mobile avec une solution d'acétate d'ammonium à 5 mM et de l'acétonitrile. Le gradient commence par 10% d'acétonitrile, monte jusqu'à 90% d'acétonitrile en 3 min et maintient 90% pendant 1,2 min. Le débit est de 0,3 mL/min. La détection est réalisée avec un triple quadripôle avec une source électrospray en mode négatif. Légende 1 : PFBA, 2 : PFPeA, 3 : PFHxA, 4 : PFHpA, 5 : PFOA, 6 : PFNA, 7 : PFDA, 8 : PFUnA, 9 : PFDoA, 10 : PFTrA, 11 : PFTeA, 12 : Perfluorohexadecanoic acid PFHxDA, 13 : Perfluorooctadecanoic acid PFODA, 14 : PFBS, 15 : PFHxS, 16 : PFHpS, 17 : PFOS, 18 : PFDS, 19 : PFOSA, 20 : N-MeFOSA, 21 : N-EtFOSA, 22 : N-MeFOSE, 23 : N-EtFOSE⁷⁹

Dan Li choisit une colonne Raptor C18 1,8 µm 50 mm x 2,1 mm pour effectuer la séparation de plusieurs familles de PFCs dont les PFCAs, les PFASs, les FTSs, les FOSAs et les FOSEs en un temps d'analyse de 6,5 minutes. La Figure 34 représente le chromatogramme obtenu en UPLC-MS/MS avec le mode MRM¹¹⁸. Certains composés coéluent comme par exemple, le PFDS, le PFOSA et le PFUnA mais leurs transitions MRM sont différentes¹¹⁸. La phase mobile contient une solution d'acétate d'ammonium à 5 mM et du méthanol¹¹⁸.

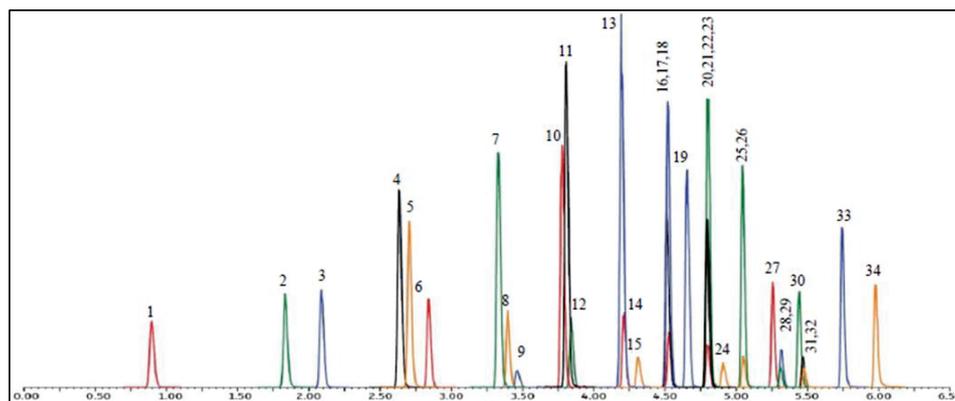


Figure 34 : chromatogramme MRM obtenu avec une colonne LC Raptor C18 (2,1 x 50 mm 1,8 µm), avec comme phase mobile une solution d'acétate d'ammonium à 5 mM et du méthanol. Le gradient commence avec 20% en méthanol et atteint 95% après 6 min, puis est maintenu à 95% pendant 0,50 min. Le débit est de 0,4 mL/min. La détection MS/MS est en mode MRM avec une source électrospray en mode négatif. Légende : 1 PFBA, 2 PFPeA, 3 PFBS, 4 4:2FTS, 5 PFHxA, 6 Perfluoropentanesulfonic acid (PFPeS), 7 PFHpA, 8 PFHxS, 9 2-Perfluorohexyl ethanoic acid (FHEA), 10 6:2 FTS, 11 PFOA, 12 PFHpS, 13 PFNA, 14 PFOS, 15 2-Perfluorooctyl ethanoic acid (FOEA), 16 8:2 FTS, 17 PFDA, 18 Perfluorononanesulfonic acid (PFNS), 19 N-methyl perfluorooctanesulfonamidoacetic acid (N-MeFOSAA), 20 PFDS, 21 N-ethyl perfluorooctanesulfonamidoacetic acid (N-EtFOSAA), 22 PFOSA, 23 PFUnA, 24 2-Perfluorodecyl ethanoic acid (FDEA), 25 PFDoA, 26 10:2 FTS, 27 PFTrA, 28 N-MeFOSA, 29 N-MeFOSE, 30 PFTeA, 31 N-EtFOSA, 32 N-EtFOSE, 33 Perfluorohexadecanoic acid (PFHxDA), 34 Perfluorooctadecanoic acid (PFODA)¹¹¹

Un faible nombre d'études, choisit la colonne Fluorosep RP Octyl précédée d'une colonne de garde C18^{82,112}. Cette phase stationnaire a des groupements perfluorooctyls qui la rendent moins hydrophobe que les colonnes précédentes (C8 et C18). Cette colonne (150 x 2,1 mm 5µm) a permis la séparation de deux familles de PFCs (les PFCAs et les PFASs)⁸² sans coélution avec un temps d'analyse de 55 minutes. La phase mobile comprend une solution de formate d'ammonium à 6,3 mM à un pH de 4 et du méthanol⁸². Le chromatogramme MRM d'un point de gamme à 1 ng/mL est représenté en Figure 35.

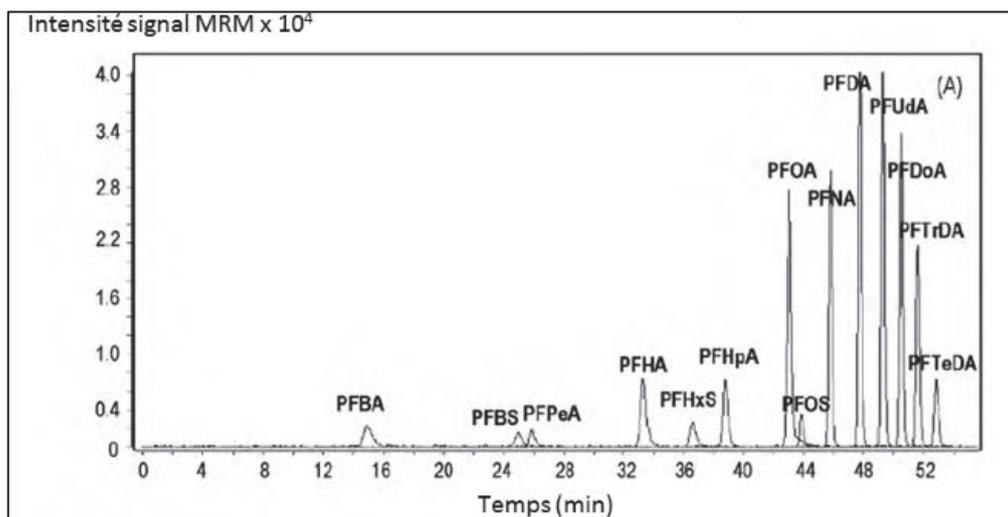


Figure 35 : chromatogramme d'un point de gamme de PFCs à 1 ng/mL pour une colonne LC Fluorosep RP Octyl (2,1 mm 15 cm 5 µm) et comme colonne de garde Waters Symmetry C18 (3,9 x 20 mm 5 µm). La phase mobile est une solution de formate d'ammonium à 6,3 mM à un pH de 4 et du méthanol. Le débit est de 0,3 mL/min Le gradient commence par 35% de méthanol pendant 2 min puis augmente linéairement jusqu'à 95% en 53 min pour atteindre ensuite 100% en 10 min. La détection est réalisée avec en mode MRM avec un triple quadripôle avec une source électrospray en mode négatif⁸²

En conclusion, une colonne C18 est plus souvent utilisée pour la séparation de PFCs appartenant à des familles différentes mais des coélutions semblent difficiles à éviter. Il est nécessaire que les PFCs coélus présentent des transitions distinctes lors de leur détection en spectrométrie de masse pour permettre leur quantification respective.

2.4 Détection

Après la séparation chromatographique, les PFCs sont ionisés avec une source électrospray (ESI) ou par ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), détectés et quantifiés sous forme déprotonée ou d'adduit acétate en spectrométrie de masse (MS).

Le Tableau 9 précise la source MS, le mode d'acquisition, les limites de détection (LOD) ou de quantification (LOQ), les étalons internes pour la quantification des PFCs étudiés dans diverses matrices.

Tableau 9 : détections utilisées pour la quantification des PFCs après leurs séparations par chromatographie liquide

	Matrice	Analytes	Source / analyseur MS / Mode	LOD ou LOQ	Étalons internes	Purification ou concentration
79	Eau, particules en suspension	13 PFCAs, 5 PFASs, 3 FOSAs et 2 FOSEs	ESI - / MRM	LOQ 0,002–0,020 µg/L (échantillon dopé)	¹³ C ₄ -PFOA, ¹³ C ₄ -PFOS et ¹³ C ₈ -PFOSA	Oui
83	Sédiments, eaux usées et autres	PFOA et PFOS	ESI-Orbitrap-MS /parallèle réaction monitoring (PRM)	LOQ instrumentale : 0,35 pg (PFOA), 0,05 pg (PFOS) sur colonne soit 0,07 µg/L et 0,01 µg/L	¹³ C ₈ -PFOA et ¹³ C ₈ -PFOS	Oui
78	Eaux et sédiments	6 PFCAs, 3 PFASs	ESI -/triple quadripôle /MRM	LOQ méthode de 0,00005 et 0,005 µg/L eau et 0,002-0,2 µg/kg sédiments	¹³ C ₂ -PFHxA, ¹³ C ₄ -PFOA, ¹³ C ₄ -PFOS et ¹³ C ₂ -PFDA	Oui
89	Coquille de bivalve	9 PFCAs et PFOS	ESI- / MRM	LOQ 0,17–1,43 µg/kg sur échantillon	¹³ C ₈ -PFOA et ¹³ C ₄ -PFOS	Oui
90	Poisson	3 PFASs, 7 PFCAs	ESI - / triple quadripôle /MRM	LOQ échantillon entre 0,01 et 5,21 µg/kg	¹⁸ O ₂ -PFOS, ¹³ C ₂ -PFOA, ¹⁸ O ₂ -PFHxS, ¹³ C ₂ -PFUnA	Oui
75	Cuir	9 PFCAs, le PFOS et le PFOSA	ESI- / triple quadripôle /MRM	LOD instrumentale entre 0,00009-0,00096 µg/L	Non renseigné	Oui
91	Sang	5 PFASs, 10 PFCAs, 2 FOSAs et d'autres PFCs	ESI - / triple quadripôle /MRM	LOQ méthode entre 0,00004 et 0,00050 µg/L	¹³ C ₄ -PFOS ¹³ C ₂ -PFDA ¹³ C ₅ -PFNA ¹³ C ₄ -PFOA ¹³ C ₄ -PFBA	Oui
92	Produits de la mer	10 PFCAs et 3 PFASs	ESI- MS/MS / MRM	LOD instrumentale 0,0008 à 0,030 µg/kg (PFOS 0,0014 µg/kg)	¹³ C ₂ -PFHxA, ¹³ C ₄ -PFOA, ¹³ C ₅ -PFNA, ¹³ C ₂ -PFDA, ¹³ C ₂ -PFUnA, ¹³ C ₂ -PFDoA, ¹⁸ O ₂ -PFHxS et ¹³ C ₄ -PFOS	Oui
81	Aliments	13 PFCAs et 3 PFASs	ESI- / triple quadripôle /MRM	LOQ aliments et lait entre 0,0001 et 0,650 µg/kg et entre 0,000030 et 0,000660 µg/L pour l'eau et le thé	¹³ C-PFHxA, ¹³ C-PFOA, ¹³ C-PFNA, ¹³ C-PFDA, ¹³ C-PFUnA, ¹³ C-PFDoA, ¹³ C-PFHxS, ¹³ C-PFOS	Oui
82	Légumes, fruits, viandes et poissons	11 PFCAs et 2 PFASs	ESI- / triple quadripôle /MRM	LOQ instrumentale 0,025 µg/L et 0,7 µg/L	¹³ C ₄ PFBA, ¹³ C ₂ PFHxA, ¹⁸ O ₂ PFHxS, ¹³ C ₄ PFOA, ¹³ C ₅ PFNA, ¹³ C ₂ PFDA, ¹³ C ₄ PFOS and ¹³ C ₂ PFUnA	Oui

73	Textiles, tapis et matériaux en contact avec les aliments	11 PFCAs et 4 PFASs	ESI-triple quadripôle / MRM	LOD instrumentale : 0,005 à 0,010 µg/m ²	¹³ C ₄ -PFCAs, ¹⁸ O ₂ -PFASs	Oui
93	Eau	8 PFCAs et 3 PFASs	ESI-/triple quadripôle / MRM	LOD instrumentale 0,00003 à 0,0019 µg/L	¹⁸ O ₂ -PFHxS, ¹³ C ₄ -PFOS, ¹³ C ₄ -PFBA, ¹³ C ₂ -PFHxA, ¹³ C ₄ -PFOA, ¹³ C ₅ -PFNA, ¹³ C ₂ -PFDA, ¹³ C ₂ -PFUnA	Oui
94	Eau	9 PFCAs, 3 PFASs et PFOSA	ESI- triple quadripôle / MRM	Calibration de 0,025 µg/L à 25 µg/L	¹³ C ₄ -PFBA, ¹³ C ₂ -PFHxA, ¹³ C ₈ -PFOA, ¹³ C ₅ -PFNA, ¹³ C ₂ -PFDA, ¹³ C ₂ -PFUnA, ¹³ C ₂ -PFDoA, ¹⁸ O ₂ -PFOSA, ¹⁸ O ₂ -PFBS, ¹⁸ O ₂ -PFHxS et ¹³ C ₈ -PFOS	Oui
80	Eaux souterraines	4 PFCAs et 2 PFASs	ESI- / triple quadripôle/MRM	LOD méthode 0,002 et 0,008 µg/l	Non	Oui
112	Textiles	11 PFCAs 4 PFASs et PFOSA	ESI- / triple quadripôle / MRM	LOQ échantillon 0,01–0,4 µg/m ²	¹³ C ₄ -PFBA, ¹³ C ₅ -PFPeA, ¹³ C ₂ -PFHxA, ¹³ C ₄ -PFHpA, ¹³ C ₄ -PFOA, ¹³ C ₅ -PFNA, ¹³ C ₂ -PFDA, ¹³ C ₂ -PFUnDA, ¹³ C ₂ -PFDoDA, ¹⁸ O ₂ -PFHxS, ¹³ C ₄ -PFOS, ¹³ C ₈ -FOSA	Oui
95	Tissu du placenta	5 PFCAs et PFOS	ESI- / triple quadripôle / MRM	LOQ méthode de 0,08 à 6 µg/kg	¹³ C ₄ -PFOA	Oui
96	Sérum maternel	3 PFASs, 7 PFCAs, 3 FOSAs	API / Triple quadripôle / MRM	LOD méthode 0,1 µg/L (0,2 µg/L pour le PFOS)	¹⁸ O ₂ -PFOSA, ¹⁸ O ₂ -PFHxS, ¹³ C ₅ -PFNA, ¹³ C ₂ -PFDeA, ¹³ C ₂ -PFUA, ¹³ C ₂ -PFDoA, D3-Me-PFOSA-AcOH, D5-Et-PFOSA-AcOH, ¹³ C ₄ -PFOA, ¹³ C ₄ -PFOS	SPE en ligne
97	Huile comestible	6 PFASs, 11 PFCAs et PFOSA	ESI- / triple quadripôle/MRM	LOD de la méthode entre 0,004 et 0,4 µg/kg	¹³ C ₄ -PFOS, ¹³ C ₄ -PFBA, ¹³ C ₂ -PFHxA, ¹⁸ O ₂ -PFHxS, ¹³ C ₄ -PFOA	Oui
76	Biens de consommation dont les cuirs	11 PFCAs, 5 PFASs, PFOSA	ESI- / triple quadripôle / MRM	LOQ instrumentale 0,5 µg/kg ou 0,5 µg/m ²	¹³ C ₄ -PFBA, ¹³ C ₂ -PFHxA, ¹³ C ₄ -PFOA, ¹³ C ₅ -PFNA, ¹³ C ₂ -PFDA, ¹³ C ₂ -PFUnA, ¹³ C ₂ -PFDoA, ¹⁸ O ₂ -PFHxS, ¹³ C ₄ -PFOS	Oui (pas de SPE)
77	Biens de consommation dont les cuirs	10 PFCAs, 4 PFASs, 2 FTSS, FOSA	ESI- /quadripôle temps de vol / balayage	Non renseigné	¹³ C ₄ -PFOS et ¹³ C ₄ -PFOA	Oui
110	Textiles	4 FTOHs et 2 FOSES	ESI- /triple quadripôle / MRM	LOQ instrumentale entre 0,5 et 3,7 µg/L pour les FTOHs LQO entre 0,002 et 0,005 µg/L pour les FOSES	Non	Oui

Les limites de détection et de quantification instrumentales, méthodes ou sur échantillons sont estimées différemment. Les limites de détection ou de quantification instrumentales reposent sur un rapport signal sur bruit pour l'injection d'étalons. Ainsi, la limite de détection instrumentale est définie comme la concentration en PFCs injectés menant à un rapport signal sur bruit d'au moins 3⁹². Ce rapport est fixé à au moins 10 pour la limite de quantification⁸². Les limites méthode prennent en compte l'écart type de la répétition de l'analyse d'un échantillon dopé à basse concentration⁹⁶. Enfin, les limites de détection ou de quantification sur échantillons sont estimées avec le rapport signal sur bruit pour l'injection d'échantillons dopés ayant subi l'ensemble du protocole⁷⁹.

La plupart des études choisissent un spectromètre triple quadripôle avec une source électrospray en mode négatif et le mode MRM pour quantifier les PFCs. Au minimum, les deux étalons internes utilisés sont le PFOS et le PFOA marqués au carbone 13^{77 83 89}. Mais un grand nombre d'études ajoutent plusieurs autres étalons internes^{76 78 81 90 91 92 82 93 112} jusqu'à avoir pratiquement un étalon interne par PFC analysé^{94 96}. Les étalons internes sont très souvent des PFCs marqués au carbone 13^{76 78 91 112} mais peuvent aussi être marqués à l'oxygène 18 comme le ¹⁸O₂-PFHxS^{76 90 97 112 94}, le ¹⁸O₂-PFOSA, ¹⁸O₂-PFBS⁹⁴ et le ¹⁸O₂-PFOS⁹⁰. Enfin, certains étalons internes et notamment ceux pour les FOSAs et FOSEs sont sous forme deutérée⁹⁶. Toutes les détections présentées sont précédées par une étape de concentration et/ou purification qui permet d'atteindre des limites de quantification très basses et en dessous des limites réglementaires de 0,025 mg/kg pour le PFOA, de 1 mg/kg pour les substances apparentées au PFOA et de 1 µg/m² pour le PFOS dans les cuirs enduits ou de 0,1% en masse soit 1 000 mg/kg pour les cuirs non enduits. Par exemple, la LOQ est entre 0,01 et 5,21 µg/kg pour la quantification de 3 PFASs, 7 PFCAs dans le poisson⁹⁰. Pour certaines matrices, comme les textiles, les LOQ sont parfois exprimées en surface d'échantillon. Ainsi, la LOQ est de 0,01 à 0,4 µg/m² pour la détermination de 11 PFCAs 4 PFASs et PFOSA dans les textiles¹¹². Les FTOHs présentent une limite de quantification plus élevée que les autres PFCs avec une LOQ instrumentale entre 0,5 et 3,7 µg/L¹¹⁰.

2.5 Les interférences

La détermination des PFCs présente de nombreux risques d'interférences à partir de la préparation de l'échantillon jusqu'à l'analyse.

Les interférences peuvent venir du matériel tel que les joints des bouchons de vials qui contiennent du polytétrafluoroéthylène (PTFE), un PFC sous forme de polymère¹¹³. Des septum en polyéthylène peuvent être utilisés en remplacement⁴⁶. Les PFCs peuvent s'adsorber sur le verre, il est donc préférable d'utiliser du matériel en polypropylène¹¹³.

Les interférences peuvent également venir des composés co-extraits de l'échantillon¹¹³. Les cartouches SPE¹¹³ et les filtres⁹⁹ doivent également être vérifiés. Par exemple, les filtres en cellulose contiennent un composé qui interfère fortement avec la transition m/z 399 > 79.9 du PFHxS⁹⁹. Il est

recommandé de vérifier les éventuelles interférences dans chaque nouveau lot de filtre. Les filtres peuvent être lavés avec du méthanol et chaque lavage est ensuite analysé pour quantifier les PFCs interférents⁹⁹.

La LC peut également générer des interférences. Par exemple, le PFOA peut être présent dans la phase mobile, dans la ligne pour dégazer ou dans la ligne de débit¹¹⁵. Les équipements en PTFE peuvent être responsables d'une surestimation en PFOA ou en PFOS lors de leur quantification dans les échantillons¹¹⁴. Ainsi, les tuyaux en PTFE peuvent être remplacés par des tuyaux en acier inoxydable ou en PEEK (polyétheréthercétone)¹¹⁴. Il est recommandé de mettre une colonne C18 entre le mélangeur et la boucle d'injection (Figure 36).

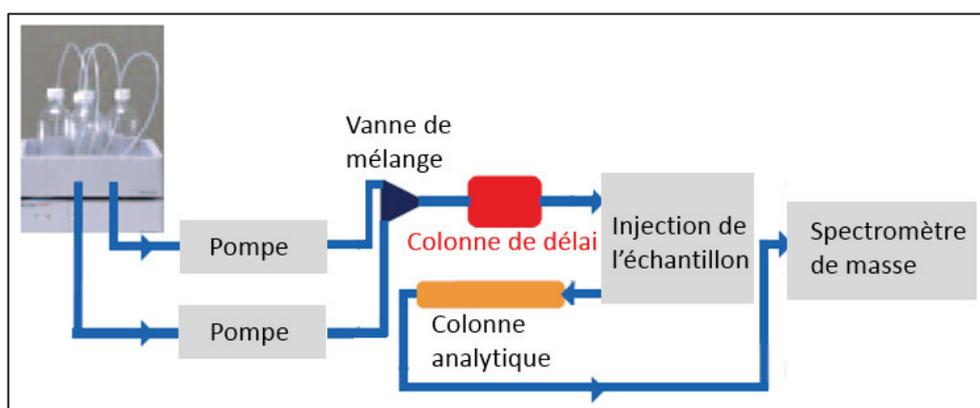


Figure 36 : installation d'une colonne de délai. Adaptée de ¹¹⁵

Les interférences « appareillage » seront alors retenues sur cette colonne de délai et auront donc un temps de rétention plus long que les PFCs provenant de l'échantillon⁹⁹. Ainsi, le PFOA présent dans l'appareillage est élué après le point de gamme de PFOA comme illustré en Figure 37¹¹⁵.

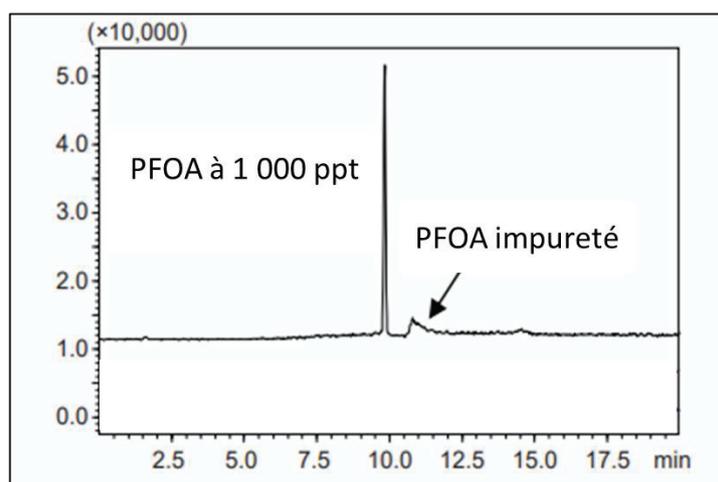


Figure 37 : séparation du PFOA à 1 000 ppt et d'une impureté du PFOA à des temps de rétention différents grâce à l'ajout d'une colonne de délai Develosil Packed Column C30-UG-5 (4,0 mm x 35 mm) entre le mélangeur et la boucle d'injection. Séparation LC avec une colonne Shim-pack FC-ODS (2,0 mm x 150 mm 3 µm), avec une solution du formate d'ammonium à 5 mM et de l'acétonitrile comme phase mobile, avec un gradient commençant à 25% d'acétonitrile et atteignant 85% en 20 min et avec un débit de 0,2 mL/min. La détection en mode MRM est réalisée avec un triple quadripôle avec une source électrospray en mode négatif¹¹⁵

2.6 Conclusion

Les études présentées ne concernent que certains PFCs, et seront donc à étendre pour l'ensemble des familles de PFCs à analyser. Tout d'abord, les PFCs sont extraits des cuirs avec un solvant organique au bain à ultrasons. Puis, les extraits peuvent être purifiés par SPE. La SPE WAX semble la plus adaptée à l'ensemble des familles de PFCs. Il serait intéressant de tester si cette SPE permet bien la purification des extraits de cuir, le cuir étant une matrice complexe. De nombreuses études s'appuient sur une étape d'évaporation pour concentrer l'échantillon et atteindre des LQ plus basses et/ou pour effectuer un changement de solvant. Cependant, cette étape est longue et difficile pour les extraits de cuir et ne pourra pas être mise en œuvre pour une analyse en routine. Après purification, les PFCAs, les PFASs, les FTSS, les FOSAs, les FOSEs et les FTOHs sont séparés par chromatographie liquide en phase inverse suivie d'une détection par spectrométrie de masse avec une source électrospray en mode négatif avec une acquisition MRM. La LC-MS/MS est choisie car elle permet d'analyser le plus grand nombre de familles de PFCs simultanément tout en incluant les deux familles présentant le plus d'urgence en termes de réglementation (les PFCAs et les PFASs). Les limites de quantification devront donc répondre aux exigences réglementaires. Des impuretés et des contaminations peuvent venir du matériel et de l'appareil utilisés, elles seront estimées par l'analyse de blancs de méthanol.

3 Analyse des PFCs dans le cuir

3.1 Méthode actuellement utilisée au CTC

Le mode opératoire en vigueur à CTC quantifie le PFOS et le PFOA et utilise les analogues marqués au carbone 13 de ces composés comme étalons internes. Il commence par le découpage de 100 cm² d'échantillon (cuir ou textile) de masse connue, suivi d'une extraction de l'échantillon dans 50 mL de méthanol au bain à ultrasons à 60°C pendant 90 minutes.

Les extraits de cuirs sont filtrés. Puis les étalons internes sont ajoutés aux extraits. Les extraits de textiles sont concentrés par évaporation au rotavap puis au turbovap pour atteindre un volume final de 1 mL d'extrait dans le méthanol. Enfin, l'analyse est effectuée par LC-MS/MS. Les PFCs sont séparés par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance, en phase inverse sur la colonne Zorbax SB_C18 (2,1 x 150 mm x 1,8 µm), une colonne avec des particules totalement poreuses. Le débit est de 0,35 mL/min, la phase mobile est du méthanol et une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM (pour former des adduits acétates). Le gradient commence par 5% de méthanol puis atteint 75% de méthanol en 3 min puis 90% à 7 min, composition maintenue pendant 7 minutes supplémentaires. Les PFCs sont ionisés par une source électrospray en mode négatif et sont détectés sous forme déprotonée par le spectromètre de masse Agilent 6460 TQ LC/MS.

Ce mode opératoire permet d'atteindre une LQ de 10 µg/L avec le spectromètre de masse Agilent 6460 TQ LC/MS qui correspond à 50 µg/m² pour le PFOS et à 500 µg/kg pour le PFOA dans les cuirs. Des limites de quantification 50 fois plus basses sont atteintes pour les textiles comme il y a moins d'interférences dans les extraits de textiles que dans ceux de cuirs.

Lors de l'analyse des cuirs par LC-MS/MS, des effets matrice ont été observés. Un effet matrice négatif suppresseur de signal a lieu dans la source électrospray, par exemple pour l'acide perfluorononanoïque (PFNA) qui était initialement utilisé comme étalon interne. Au contraire, un effet matrice positif augmente le signal du PFOS et du PFOA dans les échantillons de cuir par rapport à celui obtenu pour des étalons¹¹⁶. Cette effet matrice positif mène à une surestimation de leur concentration qui peut être compensée, dans cette méthode, par l'utilisation des étalons internes analogues des composés.

La LQ de 50 µg/m² dans les cuirs, atteinte avec ce spectromètre de masse ne permet pas de répondre à l'exigence réglementaire fixée à 1 µg/m² pour le PFOS. Une étape de purification et de préconcentration telle que l'extraction sur phase solide (SPE) semble nécessaire pour le cuir afin de diminuer la LQ. De plus, de nombreux autres PFCs sont réglementés et devraient donc être ajoutés à cette méthode.

3.2 But

L'enjeu est de développer une méthode complète d'analyse adaptée à la matrice cuir et aux différents analytes. Ainsi, différents PFCs dont la quantification est requise dans les cuirs sont à ajouter à la méthode. Enfin, les limites de quantifications doivent être diminuées pour répondre aux seuils demandés dans les réglementations et aux cahiers des charges des clients.

Tout d'abord la séparation par chromatographie liquide et les paramètres du spectromètre de masse sont optimisés. Ensuite, une recherche d'éventuelles interférences dues à la verrerie et à l'appareillage est effectuée.

3.3 Optimisation de la séparation et de la détection des PFCs

3.3.1 Optimisation de la séparation chromatographique

La séparation par chromatographie liquide des PFCs est réalisée sur la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 (150 x 2,1 mm avec des particules de diamètre 2,7 µm). Par rapport à la précédente méthode, une colonne remplie de particules de 2,7 µm a été choisie pour respecter les limites de pression du système instrumental à notre disposition. Des particules superficiellement poreuses ont été utilisées pour conserver des performances proches de celles obtenues avec les particules totalement poreuses présentant un diamètre de 1,8 µm.

La phase mobile est une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM et du méthanol. Le gradient commence par 30% de méthanol et atteint 90% en 14 minutes, un palier à 90% pendant 3,5 min est ensuite ajouté. Avec cette méthode analytique et en utilisant le mode Multi Reaction Monitoring (MRM), le chromatogramme de la Figure 38 a été obtenu pour un point de gamme à 10 µg/L.

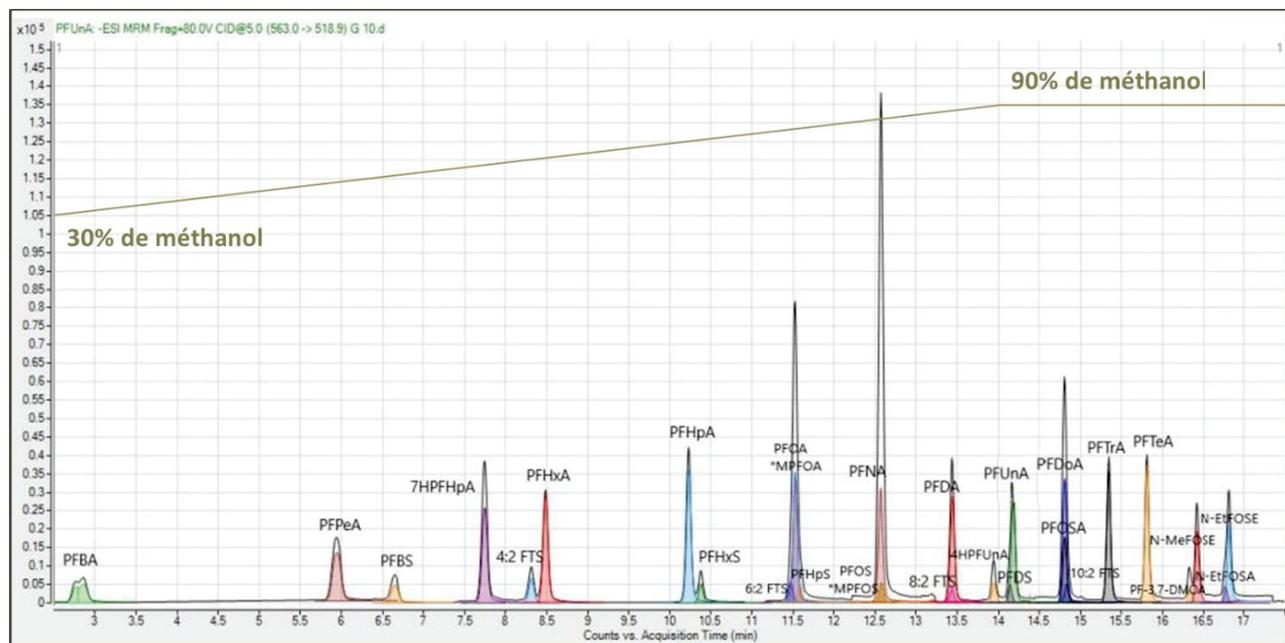


Figure 38 : chromatogramme d'un point de gamme à 10 µg/L avec en noir TIC MRM et en couleurs les transitions MRM de quantification des PFCs. La colonne Agilent est InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 150 x 2,1 x 2,7 µm, la phase mobile est constituée d'une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM et de méthanol et le débit est de 0,3 mL/min. La détection est réalisée avec le triple quadripôle Agilent 6470 LC/TQ avec une source électrospray en mode négatif

Les composés sont séparés en 17 minutes, avec un temps d'analyse global de 25 min, incluant le rééquilibrage de la colonne.

3.3.2 Optimisation du gradient

Comme le nombre d'analytes est important et que certains coéluent, il peut être intéressant d'optimiser le gradient avec le logiciel Osiris. En effet, même si les composés qui coéluent n'ont pas les mêmes transitions MRM, ils peuvent tout de même générer des effets matrices qui fausseraient la quantification.

Pour pouvoir utiliser le logiciel d'optimisation Osiris, plusieurs informations sont nécessaires, notamment, la colonne utilisée, le volume mort, le volume de délai, les temps de rétention pour un gradient rapide, les temps de rétention pour un gradient lent et le débit utilisé.

Pour déterminer expérimentalement le volume mort de la colonne, le glyphosate (composé très polaire) est injecté. Ainsi, le temps de rétention du glyphosate, 1,06 min correspond au temps mort (tm) de la colonne. Et comme le débit employé est de 0,3 mL/min, ce temps correspond à un volume mort de 0,32 mL.

Pour le temps de délai, la colonne est retirée et une impureté du méthanol est suivie en « Single Ion Monitoring » (SIM) pour visualiser le gradient qu'elle subit réellement par rapport à celui programmé. Le chromatogramme SIM à 198, illustré en annexe 5, correspond à une impureté présente dans le méthanol. Le temps de délai de 2,5 min mesuré à un débit de 0,3 mL/min, correspond à un volume de délai de 0,75 mL.

Ensuite, des injections d'étalons à 10 µg/L permettent de déterminer les temps de rétention des PFCs pour un gradient de faible pente (pente x t_m = 3,0 %) puis pour un gradient de pente plus élevée (pente x t_m = 9,4%) présentés dans la partie Matériels et Méthodes (Partie 1).

L'ensemble de ces données permet au logiciel Osiris (à partir du calcul des modèles de rétention de chacun des composés) de proposer un gradient optimal qui tient compte de plusieurs critères à choisir comme une plage de facteurs de rétention et une résolution minimale souhaitée. Le facteur de rétention minimal doit être suffisamment élevé pour permettre au premier composé de ne pas être élué au temps mort de la colonne. Un facteur de rétention maximal élevé entraîne une augmentation du temps d'analyse. La gamme de facteur de rétention est fixée entre 0,5 et 15 ce qui correspond à une plage de temps de rétention entre 1,59 et 16,96 min. La résolution demandée est de 1,5 pour permettre, si possible, un retour à la ligne de base entre chaque composé sur toutes les paires de pics. Ces critères ne permettent pas Osiris de proposer des conditions permettant la résolution demandée. Le logiciel Osiris propose néanmoins une simulation du chromatogramme avec le gradient optimal permettant de séparer un maximum de composés (Figure 39). Ce gradient commence par 54% de méthanol et atteint 91,33% de méthanol en 6,91 min.

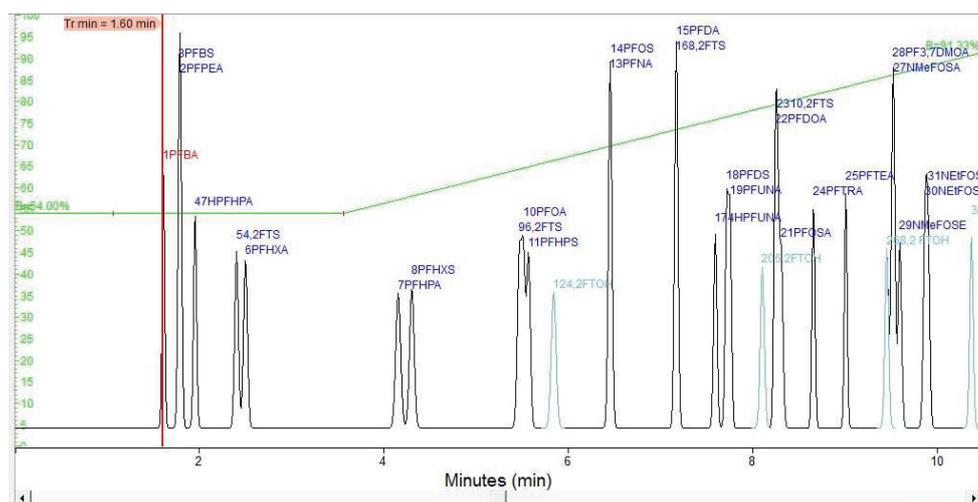


Figure 39 : simulation du chromatogramme optimal pour les PFCs proposée par le logiciel Osiris. Le facteur de rétention a été fixé entre 0,5 et 15 min et la résolution demandée est de 1,5.

Cette simulation de chromatogramme montre que les coélutions n'ont pas pu être évitées. En effet, le logiciel précise que 14 composés ont une résolution inférieure à 1,5. Cependant, le gradient optimal permet d'avoir un temps d'analyse de 11 min auquel s'ajoutent 8 minutes de rééquilibrage. Alors que

le gradient précédemment utilisé nécessite un temps total d'analyse de 25 min. Ainsi le gradient optimal permettra un gain de temps de 6 min sans ajouter d'autres coélutions que celles obtenues avec l'ancien gradient.

Même en réduisant les exigences sur la résolution à 1,3, les gradients proposés et le temps d'analyse restent très similaires.

Ce gradient a été testé sur un point de gamme à 10 µg/L en PFCs préparé dans 25% d'eau et 75% de méthanol afin de se rapprocher de la composition initiale de la phase mobile, tout en conservant la solubilité des PFCs. Le TIC MRM ainsi obtenu est représenté en Figure 40. Ce TIC MRM est très proche de la simulation du logiciel Osiris et permettrait une élution de tous les composés en 11 min.

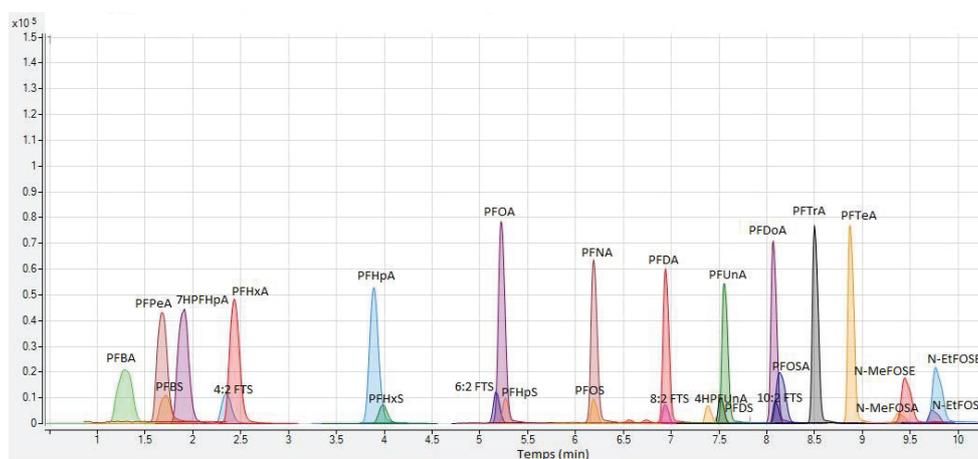


Figure 40 : TIC MRM correspondant au point de gamme à 10 µg/L (préparé dans 25% d'eau et 75% de méthanol) avec la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 150 x 2,1 mm 2,7µm en utilisant le gradient optimal proposé par le logiciel Osiris qui commence par 54% de méthanol (46% d'une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM) et atteint 91,33% de méthanol en 6,91min. La détection est réalisée avec le triple quadripôle Agilent 6470 LC/TQ avec une source électrospray en mode négatif

Ce gradient optimal pourra être utilisé pour l'analyse en routine des PFCs.

3.3.3 Optimisation de paramètres du spectromètre de masse

Pour l'optimisation du spectromètre de masse triple quadripôle Agilent 6470 LC/TQ, les paramètres de la source électrospray en mode négatif et les ions précurseurs ont été choisis à partir de la méthode utilisée au CTC et à partir de données bibliographiques^{66,111}. Ils sont résumés dans la partie Matériels et Méthodes (Partie 2).

Plusieurs paramètres comme les fragmentors, les transitions MRM (Multiple Reaction Monitoring) avec leur énergie de collision et leur tension d'accélération ont été optimisés pour permettre la quantification et la qualification d'une trentaine de PFCs, détectés sous forme déprotonée ou sous forme d'adduit acétate.

Le fragmentor est la tension à appliquer à l'extrémité de sortie du capillaire. Ils sont optimisés entre 50 et 200 V afin de sélectionner la valeur permettant l'intensité de signal la plus élevée pour chaque composé.

Ensuite, l'énergie de collision correspondant à la tension à appliquer aux ions dans la cellule de collision, est réglée entre 5 et 50 V. Pour chaque ion précurseur, deux ions produits (si possible différents de l'ion précurseur) et les énergies de collision associées permettant d'avoir les plus fortes intensités sont choisis. Ainsi, pour chaque composé, deux transitions sont sélectionnées. La transition de quantification choisie correspond à la transition permettant d'avoir l'intensité de signal la plus grande (en dehors de la transition ion précurseur ion précurseur) ou bien à la transition soumise à moins d'interférences. La seconde transition est appelée transition de qualification ou d'identification. En effet, l'aire du pic obtenu avec cette transition permet de calculer un ratio avec l'aire du pic de la transition de quantification. Ce ratio, tout comme le temps de rétention sont caractéristiques du PFC, ils permettent donc de confirmer ou non la présence du PFC.

La tension d'accélération de la cellule de collision est le gradient de tension entre les deux extrémités de l'assemblage hexapolaire dans la cellule de collision. Il est optimisé entre 2 et 7 V pour chaque transition, afin d'obtenir une aire de pic la plus grande possible.

L'ensemble des valeurs optimales de chaque transition est saisi dans une méthode MRM présentée dans le Tableau 10.

Tableau 10 : temps de rétention et transitions MRM pour chaque PFC et étalon interne

CAS	Noms	Abréviations	tr (min)	Fragmentor (V)	Transition de quantification			Transition de qualification			Détection sous forme
					Ion précurseur -> ion produit	Energie collision (V)	Tension d'accélération (V)	Ion précurseur -> ion produit	Energie collision (V)	Tension d'accélération (V)	
375-22-4	acide perfluorobutanoïque	PFBA	2,88	60	213->169	5	2	213->213	5	2	[M-H]
	acide perfluoro-n-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]butanoïque	MPFBA	2,88	70	217->172	5	2	217->217	5	2	[M-H]
2706-90-3	acide perfluoropentanoïque	PFPeA	5,98	60	263->219	5	3	263->263	5	2	[M-H]
375-73-5	acide perfluorobutane sulfonique	PFBS	6,69	120	299->80	40	2	299->99	30	2	[M-H]
1546-95-8	acide 7H-dodecafluoroheptanoïque	7HPFHpA	7,77	70	345->281	5	4	345->345	5	2	[M-H]
757124-72-4	4 :2 télomère fluoré sulfonate	4:2 FTS	8,34	120	327->307	20	2	327->81	35	2	[M-H]
307-24-4	acide perfluorohexanoïque	PFHxA	8,51	70	313->269	5	2	313->119	20	2	[M-H]
375-85-9	acide perfluoroheptanoïque	PFHpA	10,26	80	363->319	5	2	363->169	15	2	[M-H]
355-46-4	acide perfluorohexane sulfonique	PFHxS	10,4	140	399->80	40	2	399->99	40	2	[M-H]
27619-97-2	6 :2 télomère fluoré sulfonate	6:2 FTS	11,49	140	427->407	25	2	427->81	35	2	[M-H]
335-67-1	acide perfluorooctanoïque	PFOA	11,55	70	413->369	5	2	413->169	15	2	[M-H]
960315-48-4	acide perfluoro-n-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]octanoïque	MPFOA	11,55	80	417->372	5	2	417->169	15	3	[M-H]
375-92-8	acide perfluoroheptane sulfonique	PFHpS	11,61	180	449->80	55	2	449->99	40	2	[M-H]
2043-47-2	4:2 télomère fluoré alcool	4:2 FTOH	12,00	70	323->59	5	2	323->323	5	2	[M+CH ₃ COO]
375-95-1	acide perfluorononanoïque	PFNA	12,58	80	463->419	5	2	463->219	15	2	[M-H]
1763-23-1	acide perfluorooctane sulfonique	PFOS	12,59	180	499->99	45	2	499->80	50	2	[M-H]
960315-53-1	sodium perfluoro-1-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]octanesulfonate	MPFOS	12,59	160	503->80	55	2	503->99	50	2	[M-H]

335-76-2	acide perfluorodécanoïque	PFDA	13,45	80	513- >469	5	2	513- >219	15	2	[M-H] ⁻
39108-34-4	8 :2 télomère fluoré sulfonate	8:2 FTS	13,45	180	527- >507	25	2	527->81	35	2	[M-H] ⁻
	sodium 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro- [1,2- ¹³ C ₂]decansulfonate	M2-8:2 FTS	13,45	200	529- >509	30	2	529- >529	10	2	[M-H] ⁻
34598-33-9	acide 2H,2H,3H,3H- heptadecafluoroundécanoïque	4HPFUnA	13,94	100	491- >367	25	2	491- >387	10	2	[M-H] ⁻
335-77-3	acide perfluorodécane sulfonique	PFDS	14,14	220	599- >80	55	2	599->99	55	2	[M-H] ⁻
2058-94-8	acide perfluoroundécanoïque	PFUnA	14,18	80	563- >519	5	3	563- >219	15	2	[M-H] ⁻
647-42-7	6:2 télomère fluoré alcool	6:2 FTOH	14,53	70	423- >59	5	2	423- >423	5	2	[M+CH ₃ COO] ⁻
754-91-6	perfluorooctane sulfonamide	PFOSA	14,81	150	498- >78	35	2	498- >478	25	2	[M-H] ⁻
1365803- 60-6	perfluoro-1- [¹³ C ₆]octanesulfonamide	M8FOA	14,81	170	506- >78	35	2	506->64	60	3	[M-H] ⁻
307-55-1	acide perfluorodécanoïque	PFDoA	14,81	100	613- >569	10	2	613- >319	15	2	[M-H] ⁻
	acide perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]décanoïque	MPFDoA	14,81	110	615- >570	5	4	615- >615	5	2	[M-H] ⁻
120226-60- 0	10 :2 télomère fluoré sulfonate	10:2 FTS	14,83	200	627- >607	30	6	627->81	45	2	[M-H] ⁻
72629-94-8	acide perfluorotridecanoïque	PFTrA	15,34	100	663- >619	10	2	663- >169	25	3	[M-H] ⁻
376-06-7	acide perfluorotétradécanoïque	PFTeA	15,81	100	713- >669	10	4	713- >169	25	2	[M-H] ⁻
	acide perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]tétradécanoïque	M2PFTeA	15,81	110	715- >670	5	3	715- >169	30	2	[M-H] ⁻
678-39-7	8:2 télomère fluoré alcool	8:2 FTOH	16,25	80	523- >59	5	3	523- >523	5	2	[M+CH ₃ COO] ⁻
31506-32-8	N- methylperfluorooctansulfonamide	N- MeFOA	16,29	150	512- >169	25	2	512- >219	25	2	[M-H] ⁻
	N-methyl-d ₃ - perfluorooctansulfonamide	d-N- MeFOA	16,29	150	515- >169	20	2	515- >515	5	2	[M-H] ⁻
172155-07- 6	acide perfluoro-3,7- diméthyl-octanoïque	PF-3,7- DMOA	16,30	150	513- >219	25	2	513- >169	25	3	[M-H] ⁻
24448-09-7	2-(N-methylperfluoro-1- octanesulfonamido)-ethanol	N- MeFOE	16,39	100	616- >59	20	2	616- >616	5	2	[M+CH ₃ COO] ⁻
4151-50-2	N- ethylperfluorooctansulfonamide	N-EtFOA	16,74	150	526- >169	30	2	526- >219	25	2	[M-H] ⁻
1691-99-2	2-(N-ethylperfluoro-1- octanesulfonamido)-ethanol	N-EtFOE	16,78	100	630- >59	15	2	630- >630	5	2	[M+CH ₃ COO] ⁻
	2-(N-ethyl-d ₅ -perfluoro-1- octanesulfonamido)ethan-d ₄ -ol	d ₉ -N- EtFOE	16,78	100	639- >59	10	2				[M+CH ₃ COO] ⁻
865-86-1	10:2 télomère fluoré alcool	10:2 FTOH	17,46	90	623- >59	5	4	623- >623	5	2	[M+CH ₃ COO] ⁻

3.3.4 Recherche de contamination du système

Comme indiqué précédemment, le système est susceptible d'apporter des contaminations, notamment par les lignes de transfert et les bouchons de vials. Plusieurs blancs de système sont analysés à chaque série. Les TIC (Total Ion Chromatogram) MRM (Multi Reaction Monitoring) obtenus sont négligeables. Ainsi, les contaminations pour l'appareil utilisé sont négligeables et ne nécessitent pas l'installation d'une colonne entre le mélangeur et la boucle d'injection.

D'autre part, les vials utilisés sont choisis en polypropylène pour éviter tout risque d'adsorption des PFCs sur les parois.

3.4 Une étape de purification nécessaire ?

Les étapes de séparation et de détection ont été optimisées et les interférences appareillages sont négligeables. Ensuite, il est nécessaire d'étudier si une étape de purification/préconcentration est à ajouter en fonction des limites de quantification à atteindre et des potentielles interférences.

3.4.1 Limite de quantification à atteindre

Pour commencer, afin de pouvoir calculer la limite de quantification à atteindre pour répondre aux exigences réglementaires ($1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ pour le PFOS), il est nécessaire d'avoir un ordre de grandeur de la masse de la prise d'essai. La prise d'essai doit avoir une masse et une surface connues pour pouvoir exprimer les résultats en mg/kg et en $\mu\text{g}/\text{m}^2$ afin de pouvoir les comparer aux valeurs des seuils réglementaires. Ainsi, 100 cm^2 de 35 cuirs différents pris au hasard dans les reliquats CTC ont été pesés. L'ensemble des résultats est représenté dans la Figure 41. Les masses sont comprises entre 4,2 et 20,1 g. Donc la masse minimale de 100 cm^2 de cuirs est considérée de 4 g. De plus pour recouvrir 100 cm^2 , il a été constaté qu'au minimum 40 mL de méthanol (solvant d'extraction) sont nécessaires.

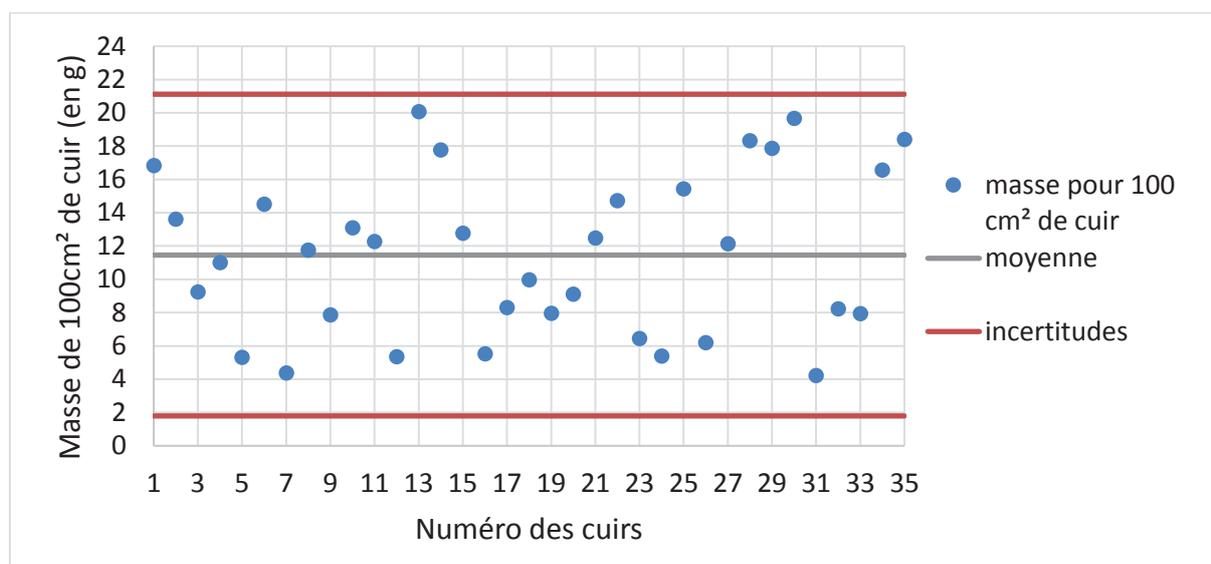


Figure 41 : masse de 100 cm^2 de cuirs pour 35 cuirs différents, valeur moyenne et incertitudes (correspondant à 2 fois l'écart type)

La limite réglementaire la plus basse est celle du PFOS à $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ d'après l'annexe 1 du règlement CE n°850/2004 concernant les Polluants Organiques Persistants. Cette limite correspond à $0,0025 \text{ mg}/\text{kg}$ pour un cuir de 4 g et nécessite une LQ à $0,25 \mu\text{g}/\text{L}$.

Le spectromètre de masse 6470 LC/TQ d'Agilent utilisé étant plus récent que le modèle 6460 TQ LC/MS qui avait servi aux tests effectués au CTC par N. Blanc, permet de descendre à cette limite de quantification. D'après les injections de points de gamme, l'appareil permet bien d'atteindre cette LQ pour la plupart des PFCs (Figure 42).

Les FTOHs ont des limites de quantification plus élevées que les autres composés, avec $50 \mu\text{g}/\text{L}$ pour le 8:2 FTOH (contenant 8 carbones dans sa chaîne fluorée suivis de 2 groupements méthylènes et d'une fonction alcool) et $500 \mu\text{g}/\text{L}$ pour le 4:2 FTOH. Ils sont donc mis de côté pour les autres essais d'optimisation.

Le PF-3,7-DMOA a une LQ à $1,25 \mu\text{g}/\text{L}$, c'est pourquoi lors des essais suivants, il est introduit en concentration cinq fois supérieure à celle des autres PFCs.

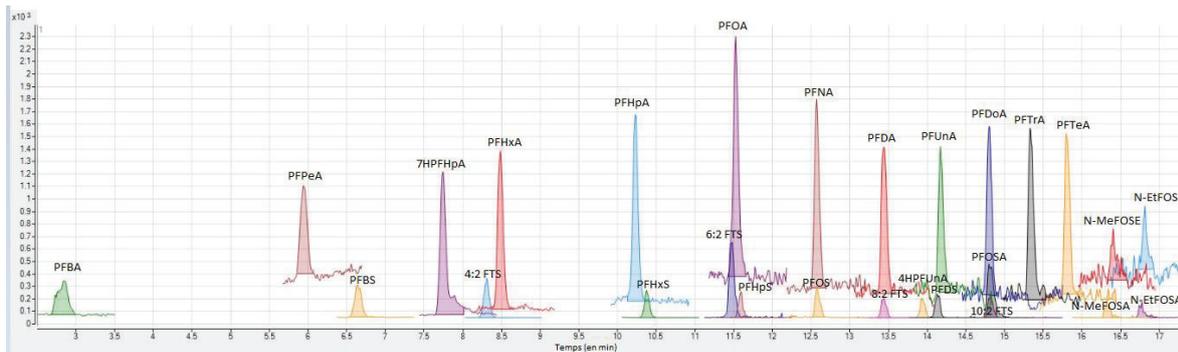


Figure 42 : TIC MRM correspondant au point de gamme PFCs à 0,25 µg/L obtenu avec la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 150 x 2,1 mm 2,7 µm, avec comme phase mobile une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM et du méthanol. Le gradient commence par 30% de méthanol et atteint 90% en 14 minutes, un palier à 90% pendant 3,5 min est ensuite ajouté. La détection est réalisée avec le triple quadripôle Agilent 6470 LC/TQ avec une source électrospray en mode négatif.

En conclusion, une limite de quantification de 0,25 µg/L est atteinte pour la plupart des PFCs. Cette limite de quantification, dans les conditions expérimentales utilisées, correspondrait à une limite de 1 µg/m² ce qui permettrait de répondre aux exigences réglementaires.

Des analyses doivent être réalisées sur des extraits de cuirs pour vérifier s'ils peuvent être analysés directement ou si une étape de purification et préconcentration est nécessaire pour atteindre les mêmes limites de quantification que les points de gamme.

3.4.2 Dopage d'extraits de cuirs

Afin d'évaluer l'influence de la matrice sur la quantification, des cuirs sont extraits puis dopés avant analyse. Les composés co-extraits peuvent influencer sur la quantification des PFCs en provoquant une surestimation ou sous-estimation de la concentration réelle (suppression ou exaltation d'ionisation). Le but est d'avoir une vue la plus exhaustive possible de l'ensemble des effets matrices en étudiant des cuirs différents. En effet, la complexité et la diversité de la matrice cuir nécessitent d'étudier de nombreux échantillons.

Des premiers tests sont effectués sur 21 cuirs différents présentés en partie Matériels et Méthodes (Partie 4). Les cuirs 1 à 13 sont issus des reliquats CTC et sont donc représentatifs des cuirs actuellement mis sur le marché. Les informations disponibles sur ces échantillons de cuir sont données en partie Matériels et Méthodes (Partie 4). Ces cuirs proviennent de différentes peaux d'animaux ayant subi un tannage au chrome ou un tannage végétal, éventuellement une étape de retannage et/ou teinture différente.

Les 8 cuirs CTC ont été préparés dans la tannerie de CTC (leur mode opératoire est présenté en annexe 4). Ce sont des agneaux tannés au chrome. Ils diffèrent seulement à l'étape de corroyage (post tannage). Les 4 premiers cuirs ont un colorant métallifère base chrome et cobalt et des retannages différents (végétal, synthétique, résine acrylique et résine dicyandiamide) et les 4 suivants n'ont pas

de retannage et des colorants différents (colorant acide et différents colorants métallifères à base de chrome).

Pour chaque cuir, 100 cm² sont découpés et extraits dans le méthanol aux ultrasons pendant 120 min. Les conditions d'extraction, présentées en partie Matériels et Méthodes (Partie 4), correspondent à celles mentionnées dans un projet de norme sur les PFCs dans les textiles et sont proches de celles de la norme NF EN ISO 23702-1 2018. Certains extraits contiennent des colorants comme celui du cuir 1 de couleur bleu foncé ou encore les extraits des cuirs 2, 11, 1 CTC, 2 CTC, 4 CTC et 5 CTC de couleur orangée. D'autres extraits ont une faible quantité de colorant extrait, comme l'extrait du cuir 3 de couleur beige et ceux des cuirs 4, 5, 9 et 8 CTC qui sont incolores.

Les extraits sont ensuite filtrés et analysés directement (extraits bruts), ou bien après dopage à 10 µg/L en PFCs et en EI, correspondant au point haut de la gamme. Les extraits bruts ou dopés sont quantifiés selon la norme ISO 23702-1:2018 avec deux étalons internes, le PFOS et le PFOA marqués au carbone 13, associés aux PFCs en fonction de leur structure proche (partie Matériels et Méthodes, Partie 3). Si ces dopages donnent des taux de recouvrement proches de 100%, des dopages à la LQ pourront être envisagés.

Les extraits bruts des cuirs CTC ne contiennent pas de PFCs sauf le PFHxS présent à de faibles concentrations, proches de 0,5 µg/L. Par exemple, le cuir CTC 1 a une concentration en PFHxS de 0,63 µg/L. Dans les reliquats des cuirs, quelques cuirs contiennent une concentration élevée en certains PFCs. Les aires des pics correspondants seront alors soustraites aux aires des pics des extraits dopés. Les PFCs contenus dans les extraits bruts des cuirs sont détaillés en partie Matériels et Méthodes (Partie 4).

Les ratios entre l'ion de quantification et l'ion de qualification ont été vérifiés et sont comparables à ceux mesurés pour les étalons. Comme les ratios sont respectés pour tous les composés et pour tous les cuirs, cela signifie que si des effets matrices sont observés, ils proviennent d'impuretés au temps de rétention des analytes et avec des transitions MRM différentes de celles des analytes.

Les concentrations mesurées pour les extraits dopés sont comparées à la concentration attendue de 10 µg/L. Ainsi, les taux de recouvrement de chaque PFC peuvent être calculés selon l'Équation 2.

Équation 2 : calcul du taux de recouvrement après dopage d'extraits de cuirs à 10 µg/L

$$\text{taux de recouvrement} = \frac{\text{concentration mesurée de l'extrait dopé à } 10 \text{ } \mu\text{g/L}}{\text{concentration attendue de } 10 \text{ } \mu\text{g/L}} \times 100$$

Tout écart du taux de recouvrement par rapport à 100% traduit une exaltation ou une suppression de signal liée à la matrice cuir.

Les taux de recouvrement sont représentés sur la Figure 43 à la Figure 48 pour chaque cuir et pour chaque famille de PFCs. Certains composés sont correctement quantifiés (avec des taux de

3.4.2.3 Les FTSs

La famille des FTSs a un comportement particulier puisque c'est la seule famille à présenter une importante exaltation de signal, comme le montre la Figure 46, les FTSs sont très fortement surestimés dans de nombreux cuirs (jusqu'à 312% pour le 6:2 FTS dans le cuir 13). Les FTSs sont élués à des zones différentes du chromatogramme, avec des temps de rétention de 8,5, 11,6, 13,6 et 15 minutes. Cette famille ressemble à celle des PFASs avec seulement deux groupements méthylènes supplémentaires dans sa chaîne. Compte tenu de leur ressemblance structurale, il est étrange que les PFASs soient tous quantifiés de façon satisfaisante alors que les FTSs subissent des effets matrices exaltant leur signal.

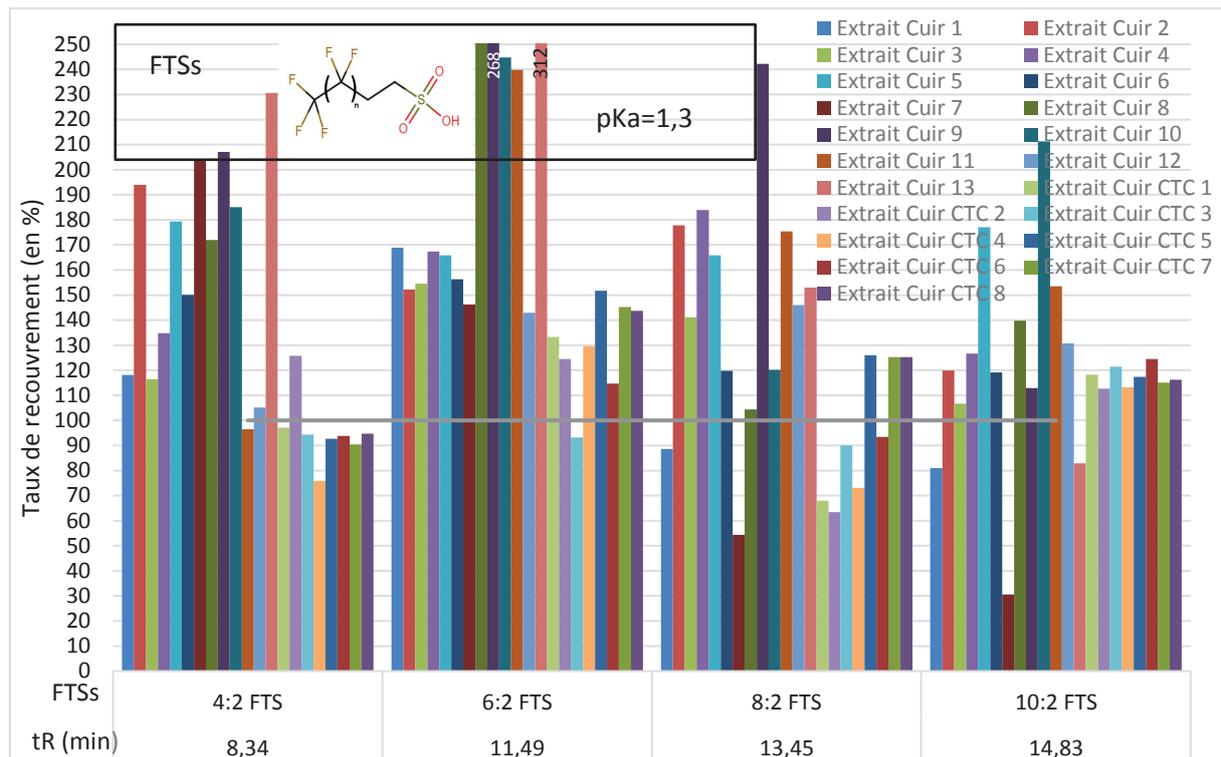


Figure 46 : taux de recouvrement des FTSs pour différents extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13)

3.4.2.4 Les FOSEs et les FOSAs

Globalement, les FOSEs et FOSAs, composés élués en fin de chromatogramme, subissent un effet matrice suppresseur de signal responsable de leur sous-estimation dans plusieurs cuirs testés (Figure 47 et Figure 48). Par exemple, pour les cuirs 10 à 13, le taux de recouvrement pour les FOSEs et FOSAs s'étend entre 3 et 66%.

Pour les FOSEs, les taux de recouvrement sont entre 5 et 80% pour les reliquats de cuirs mais sont satisfaisants pour les cuirs CTC (entre 80 et 110%). Les cuirs CTC correspondent à un agneau tanné au chrome mais ayant subi un corroyage (post tannage) incluant un retannage différent ou une teinture différente. Contrairement à beaucoup des cuirs étudiés, les cuirs CTC n'ont pas subi d'étape de finition. Il est possible que les produits de finition co-extraits soient responsables de certains effets de matrice observés pour les autres cuirs.

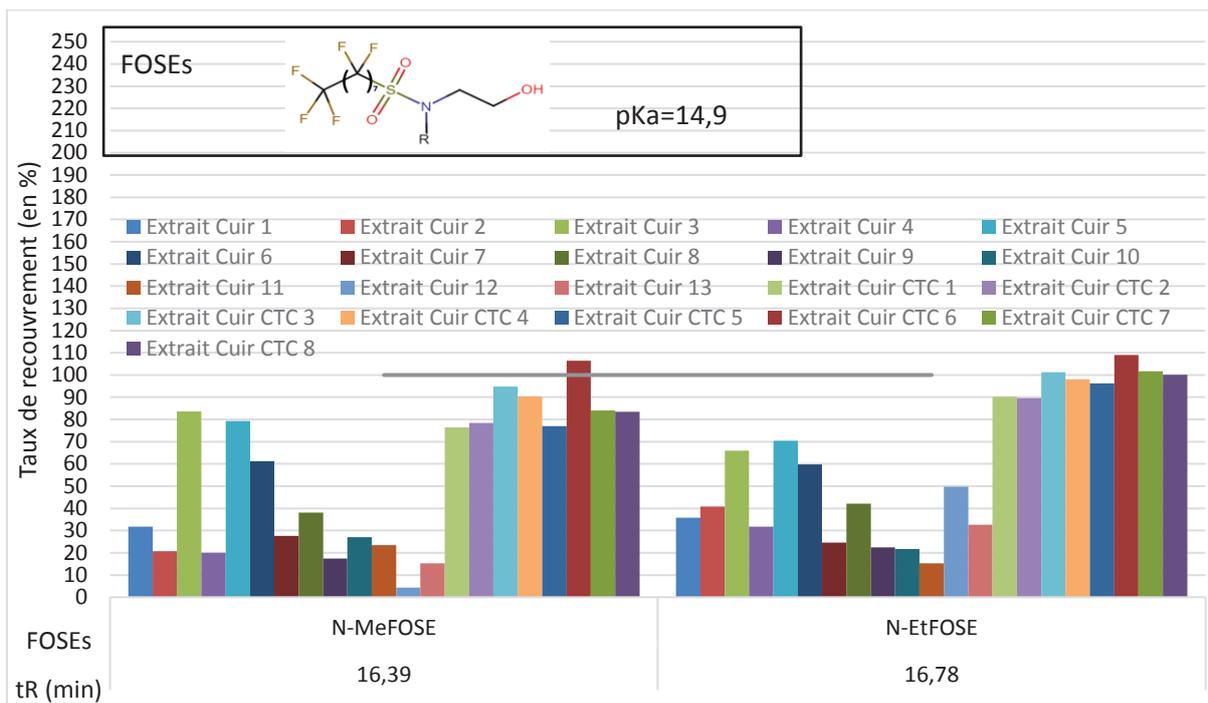


Figure 47 : taux de recouvrement des FOSEs pour différents extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13)

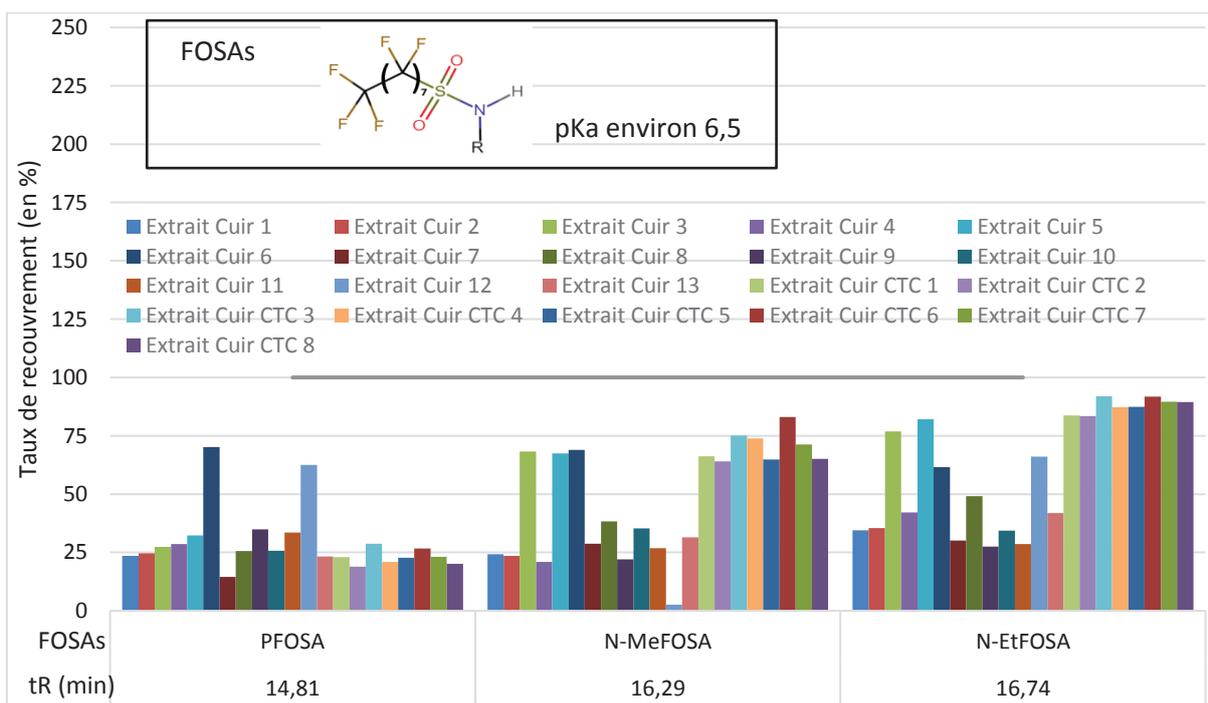


Figure 48 : taux de recouvrement des FOSAs pour différents extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13)

3.4.2.5 Confirmation des effets de matrice

Afin de confirmer que les effets de matrice sont responsables de la surestimation ou sous-estimation de certains composés, l'extrait du cuir 2 est analysé directement après dopage à 10 µg/L en PFCs et en étalons internes et après des dilutions par 2, 5 ou 10 dans le méthanol avant le dopage. Les taux de recouvrement sont représentés en Figure 49 pour chaque PFC dans l'ordre d'élution.

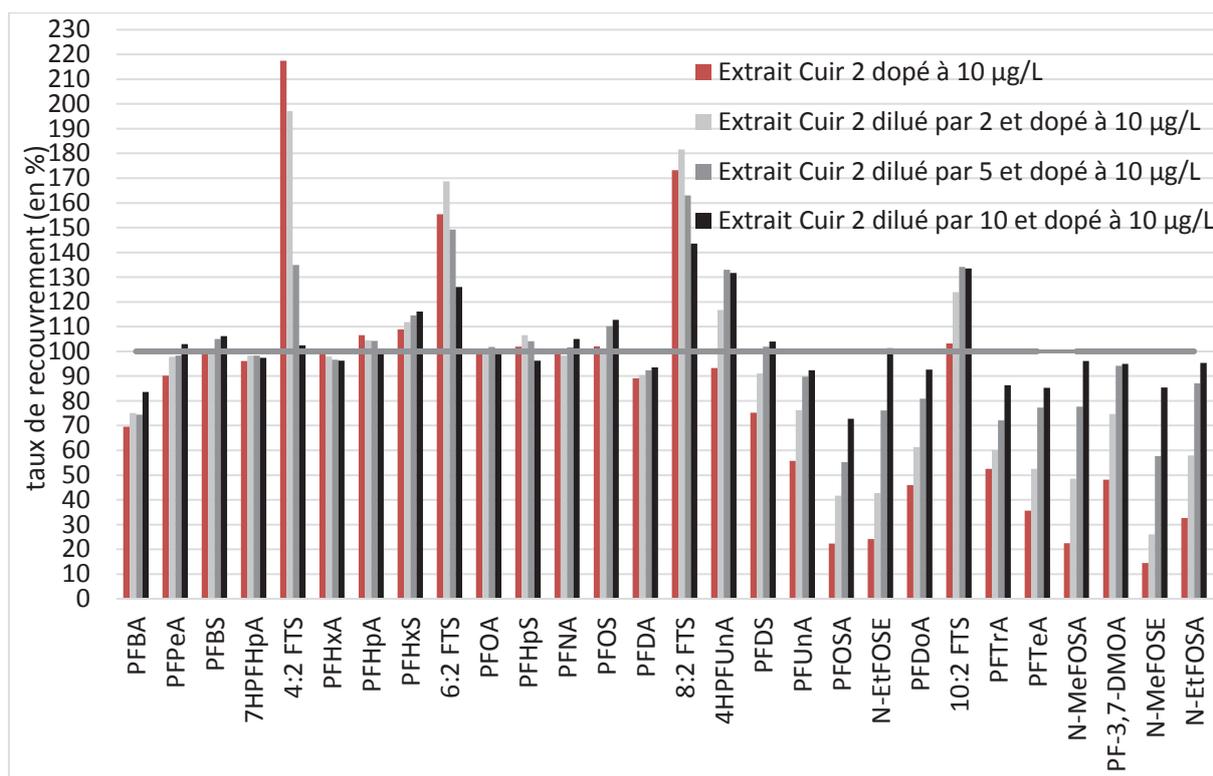


Figure 49 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 2 dilué ou non puis dopé à 10 µg/L

Quel que soit le composé considéré, la dilution de la matrice permet de réduire les phénomènes d'exaltation (pour les FTSs) ou de suppression du signal (pour les FOSAs, les FOSEs, le PFDS, le PFUnA, le PFDoA, le PTeA, le PFTrA et le PF-3,7-DMOA). Donc la matrice cuir est responsable de ces effets.

3.4.2.6 Conclusion

Pour conclure cette étude des effets de matrice, l'ensemble des taux de recouvrement, pour tous les cuirs et pour tous les composés, montre que dans la moitié des cas, il y a une suppression ou une exaltation de signal. Quelques hypothèses ont pu être émises, les produits du tannage végétal co-extraits peuvent peut-être induire une suppression de signal des deux premiers PFCs et le traitement de finition peut être à l'origine de certains effets de matrice. Les effets de matrice multiples sont influencés par la nature du cuir, or la méthode doit permettre de quantifier tous les cuirs sans connaître leur procédé de fabrication.

Compte tenu de ces importants effets matrices une étape de purification est envisagée.

3.5 Etape de purification SPE WAX

Une extraction sur phase solide (SPE) est choisie pour tenter de réduire les effets de matrice, pour diminuer l'encrassement du spectromètre de masse et pour faciliter la détection.

Pour les effets matrices supprimeurs de signal, ils apparaissent en fin de chromatogramme ce qui signifie que les composés interférents co-extraits responsables sont hydrophobes. Le procédé de

tannage des cuirs étudiés n'est pas connu pour tous les cuirs analysés. Par conséquent, il n'est pas possible d'identifier les composés interférents. De plus, comme vu précédemment, les composés utilisés lors du procédé de tannage sont différents d'un cuir à l'autre. La cartouche SPE est donc choisie essentiellement à partir des analytes qui sont des composés hydrophobes dont certains sont anioniques.

Au vu des recherches bibliographiques présentées précédemment, la SPE WAX apparaît comme le meilleur compromis pour retenir les PFCs anioniques grâce à ces interactions échangeuses d'anions et les PFCs neutres et hydrophobes par le mécanisme de rétention phase inverse.

3.5.1 Répétabilité de la SPE WAX manuelle

Comme la SPE n'est pas effectuée de façon automatisée, le protocole SPE WAX standard présenté par les fournisseurs a été utilisé pour estimer la répétabilité des résultats. Ce protocole utilise un dépôt d'une solution acidifiée, suivi d'un lavage dans le même milieu que le dépôt. Enfin, les PFCs sont élués avec un solvant organique basifié pour rompre les interactions ioniques. Ce protocole est détaillé en partie Matériels et Méthodes (Partie 5).

Ainsi, 4 répétitions sont effectuées avec une concentration déposée de 100 µg/L en PFCs et en étalons internes. Après élution, l'échantillon est dilué par 10 dans le méthanol puis analysé. Une concentration déposée de 100 µg/L permet de mettre en évidence de faibles variations dans la concentration retrouvée.

L'ensemble des PFCs possède un coefficient de variations inférieur à 9% sauf le PF-3,7 DMOA, ayant une aire de pic plus faible, dont le coefficient de variation est de 18,5%.

La SPE WAX manuelle est donc répétable et les résultats qu'elle permet d'obtenir sont fiables. Cependant cette SPE nécessite d'être optimisée.

3.5.2 Optimisation de la purification SPE WAX

Avant de pouvoir tester la SPE WAX sur des extraits de cuirs, son mode opératoire doit être optimisé avec des standards. Les conditions des étapes de la SPE WAX sont à optimiser, surtout l'étape de lavage (où les composés co-extraits responsables des effets matrices peuvent être éliminés) et l'étape d'élution pour assurer un recouvrement élevé des composés.

Les volumes de conditionnement, de lavage et d'élution doivent théoriquement correspondre à 2 à 3 fois le volume de l'adsorbant¹¹⁷. Visuellement pour une cartouche SPE WAX de 150 mg, il a été constaté qu'un volume de 1,5 mL est adapté pour respecter ce critère.

Le dépôt sur une cartouche SPE WAX doit être réalisé en solution aqueuse acidifiée afin de favoriser la rétention par effet hydrophobe et par interaction ionique en protonant le support. Un premier test est effectué avec un dépôt contenant entre 20% et 65% de méthanol, 2% d'acide formique pour maintenir le support chargé positivement et favoriser les interactions ioniques. La concentration en PFCs déposés

est de de 100 µg/L afin de pouvoir détecter des variations de l'ordre de quelques pourcents du taux de recouvrement.

Les premiers tests sur l'optimisation ont montré qu'aucun composé n'est élué de la cartouche avec un dépôt contenant entre 20% et 65% de méthanol. Les résultats illustrant aucune perte de PFCs ne sont pas représentés. Le dépôt est donc réalisé avec 65% de méthanol.

Pour le lavage, l'acidification du support est maintenue avec 2% d'acide formique pour ne pas rompre les interactions ioniques et l'influence du pourcentage de méthanol est testée entre 65% (composition du dépôt) et 98%. L'intérêt de laver avec le plus grand pourcentage de méthanol possible est d'éliminer le plus d'interférents hydrophobes possibles. Cependant, un trop fort pourcentage en méthanol risquerait d'élué, au moment des lavages, les PFCs retenus uniquement par effet hydrophobe.

Puis, l'élué est réalisée avec du méthanol contenant 2% d'ammoniaque afin de déprotomer le support pour rompre les interactions ioniques. Enfin, l'échantillon est dilué par 10 dans le méthanol, pour avoir une concentration finale en PFCs de 10 µg/L ce qui correspond au point haut de la gamme. L'ensemble des étapes de la SPE WAX et les fractions analysées sont représentés en Figure 50.

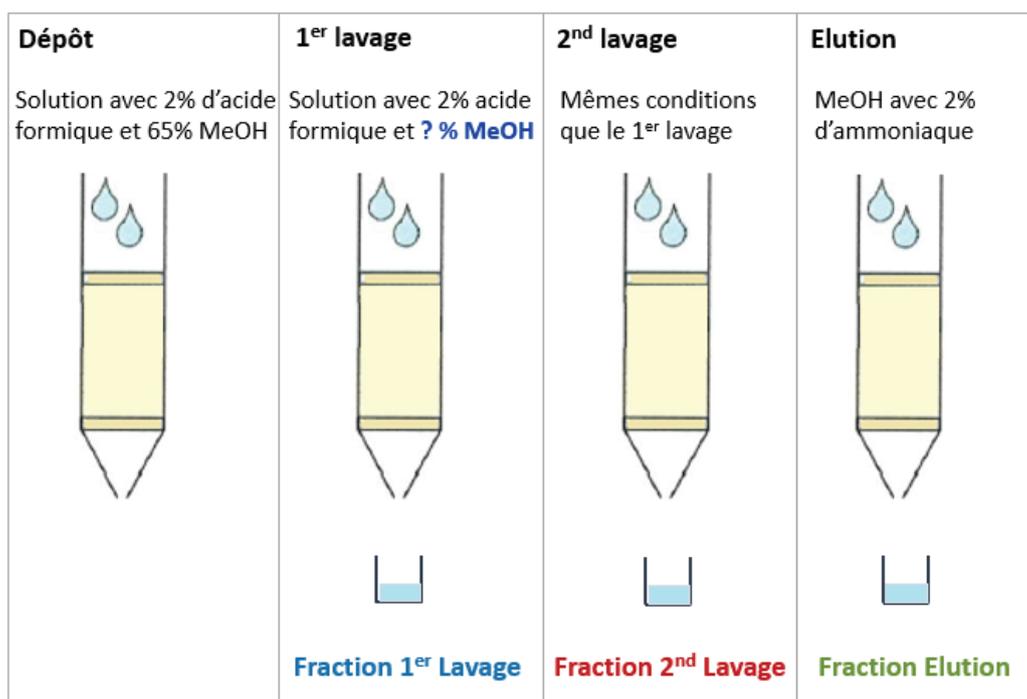


Figure 50 : fractions analysées pour l'optimisation de l'étape de lavage de la SPE WAX 150 mg

Les concentrations en PFCs de chaque fraction sont exprimées en taux de recouvrement (calculés avec l'Équation 2).

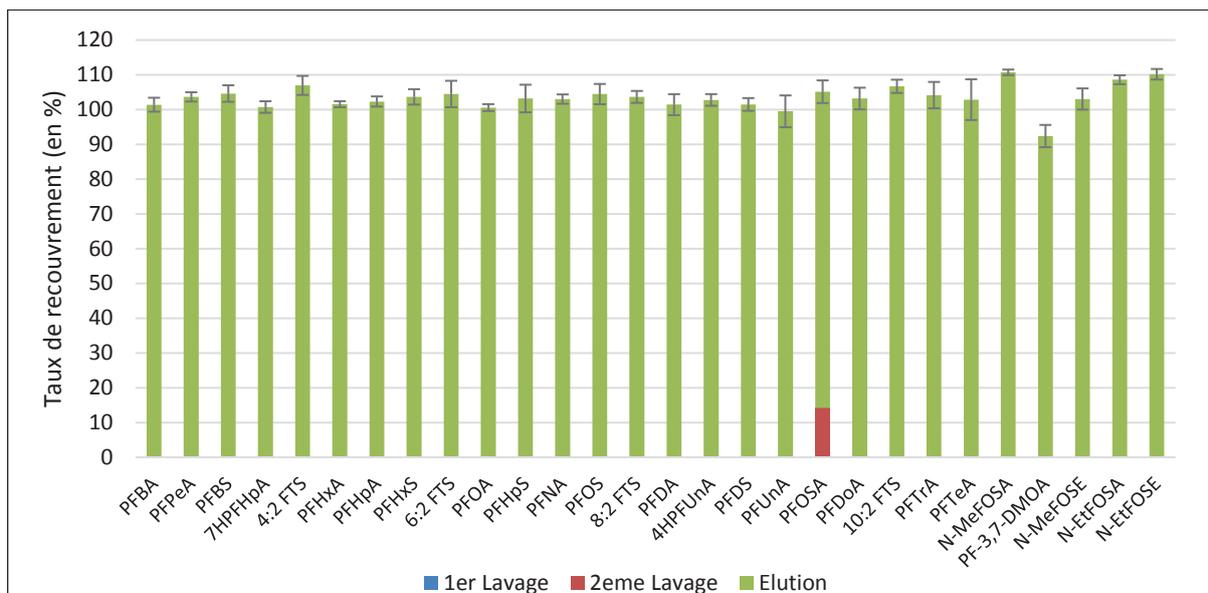


Figure 51 : taux de recouvrement pour la SPE WAX dans les lavages 1, 2 et la fraction d'élution avec une solution de lavage contenant 65% de méthanol et 2% d'acide formique. Elution avec 98% de méthanol et 2% d'ammoniaque

Pour des lavages à 65% de méthanol les résultats de la Figure 51 sont obtenus. Ils montrent que les composés sont récupérés après élution avec un rendement entre 91 et 111%. Aucun composé n'est perdu pendant la première phase de lavage. Dans la seconde, seul 10% de PFOSA est élué. La même expérience conduite avec 80% de méthanol dans la phase de lavage a mené aux résultats de la Figure 52.

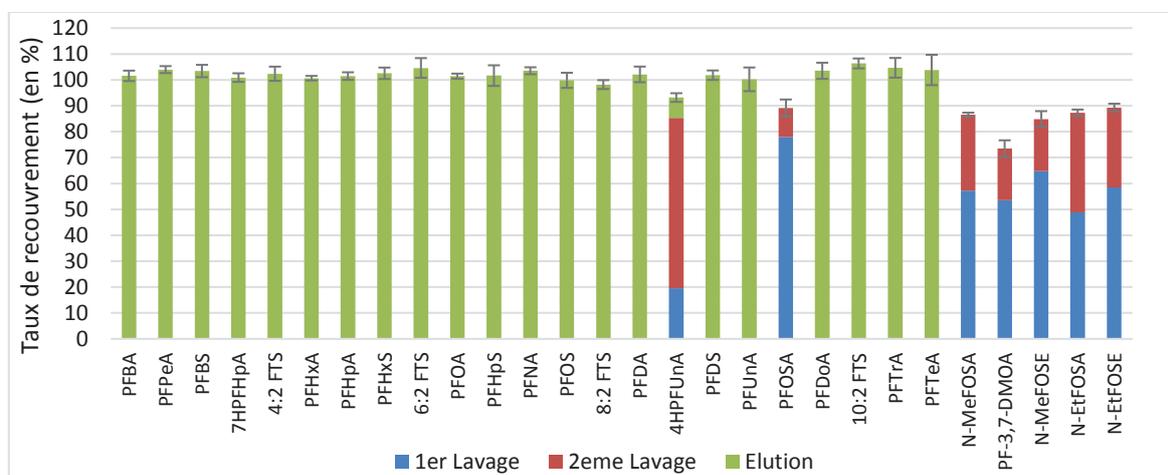


Figure 52 : taux de recouvrement pour la SPE WAX dans les lavages 1, 2 et la fraction d'élution avec une solution de lavage contenant 80% de méthanol et 2% d'acide formique. Elution avec 98% de méthanol et 2% d'ammoniaque

Les composés neutres retenus uniquement par effet hydrophobe comme les FOSAs et les FOSEs sont perdus à 50% dès le premier lavage contenant 80% de méthanol. L'effet hydrophobe ne suffit pas à retenir les composés neutres. Le 4HPFUnA est perdu à 80% après deux lavages. Ce composé appartient à la famille des PFCAs mais possède deux fonctions méthylènes entre la chaîne fluorée et la fonction carboxylique. Son pKa est donc plus élevé que celui des autres PFCAs. Ainsi, en conditions acides, le 4HPFUnA existe sous forme neutre et n'est donc pas retenu par interaction ionique. Le PF-3,7-DMOA

(PFCA ramifié et très hydrophobe) essentiellement retenu par effet hydrophobe est également perdu pendant les lavages.

En conclusion, le mode opératoire optimisé de la SPE WAX 150 mg commence par un dépôt de 1,5 mL avec 65% de méthanol et 2% d'acide formique, suivi par un ou deux lavages avec 1,5 mL de 65% de méthanol et 2% d'acide formique et enfin, l'élution est réalisée avec 1,5 mL de méthanol contenant 2% d'ammoniaque. Ce mode opératoire est ensuite à tester sur des extraits de cuirs.

3.5.3 Evaluation de la SPE WAX sur des extraits de cuirs

Le mode opératoire optimisé de la SPE WAX est testé sur des échantillons de cuirs. Les cuirs pour lesquels les effets de matrice étaient les plus marqués sont retenus pour cette étude (cuirs 1 à 4).

Dans un premier temps, les extraits non dopés, purifiés ou non par SPE ont été analysés par LC-MS/MS. Les fulls scan ainsi obtenus sont représentés en Figure 53 pour étudier l'influence de la SPE WAX sur le courant d'ions total.

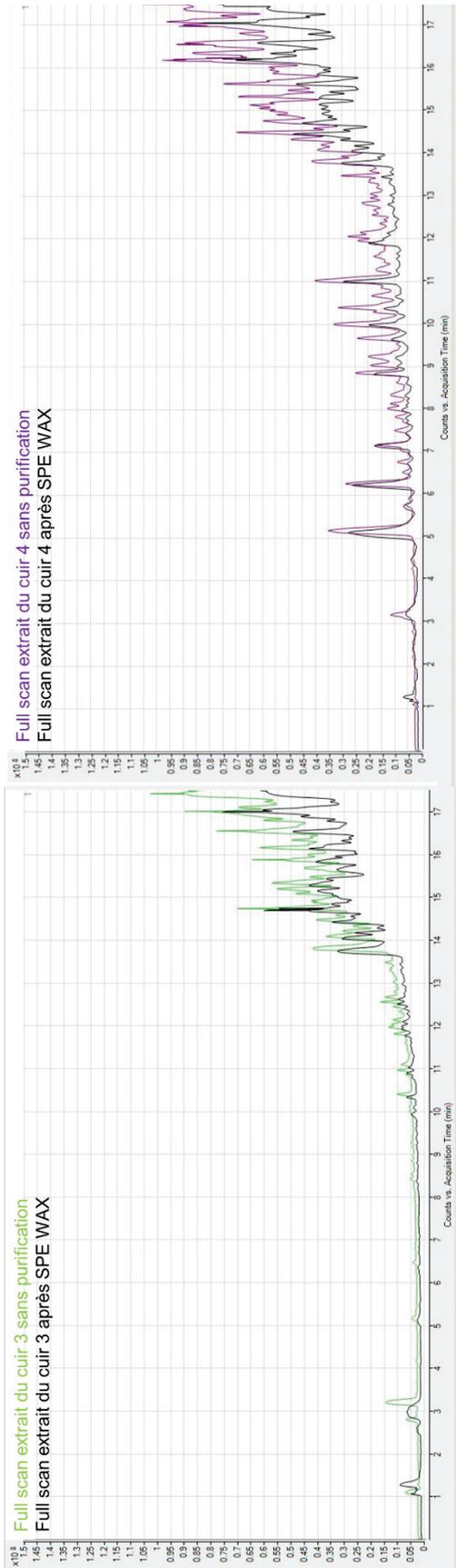
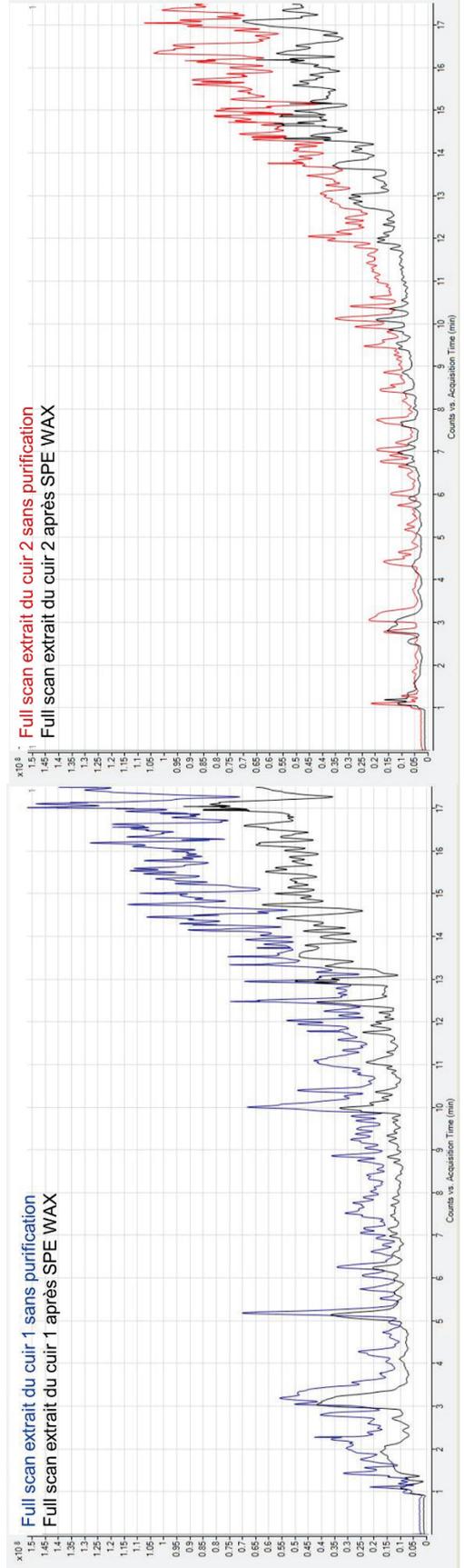


Figure 53 : fulls scans des extraits des cuirs 1 à 4 sans purification ou après SPE WAX

Pour les cuirs 1 et 2, la SPE WAX permet de réduire le courant d'ion total (TIC) alors que pour les cuirs 3 et 4 peu de différences significatives sont observées.

Les extraits de cuirs ont ensuite été dopés. Ainsi, les taux de recouvrement des extraits dopés et purifiés par SPE sont comparés aux taux de recouvrement des extraits dopés non purifiés. La Figure 54 à la Figure 57 mettent en évidence l'impact de la SPE WAX sur les taux de recouvrement (calculés avec l'Équation 2) pour les différents extraits de cuirs étudiés.

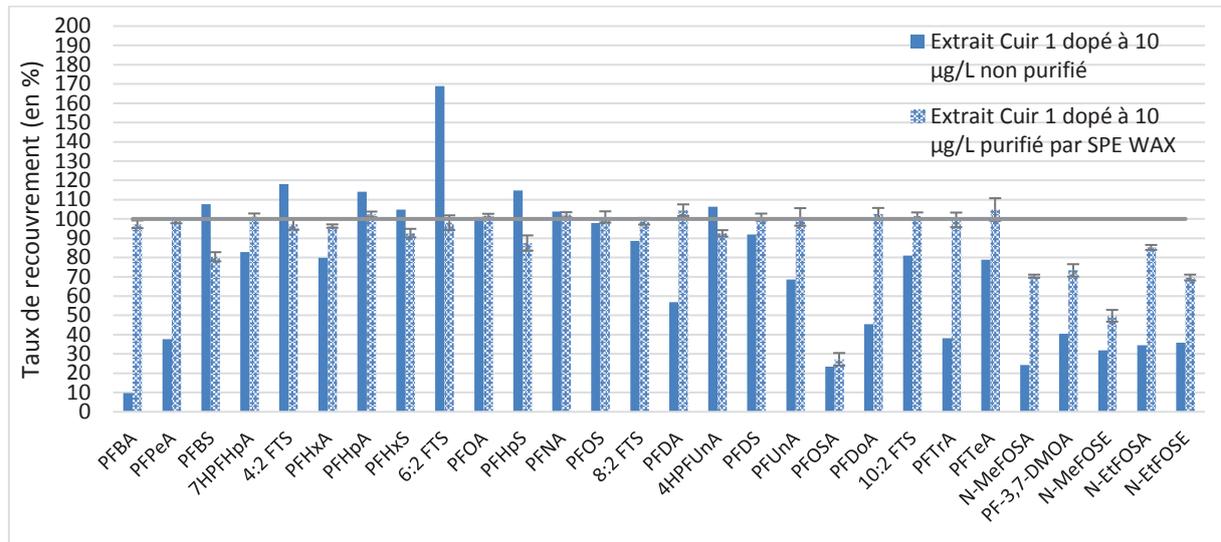


Figure 54 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 1 dopé à 10 µg/L et purifié ou non par SPE WAX

Pour l'extrait du cuir 1, la SPE permet une amélioration significative des taux de recouvrement de la plupart des composés (réduction des effets de suppression de signal en début et en fin de chromatogramme et diminution de l'exaltation de signal des FTSs). Par exemple, les taux de recouvrement du PFBA et le PFPeA qui étaient de 11% et 42% augmentent à 48 et 63% respectivement après purification SPE. L'effet matrice est également fortement réduit pour les derniers composés dont les taux de recouvrement entre 20 et 40% atteignent entre 50 et 85%.

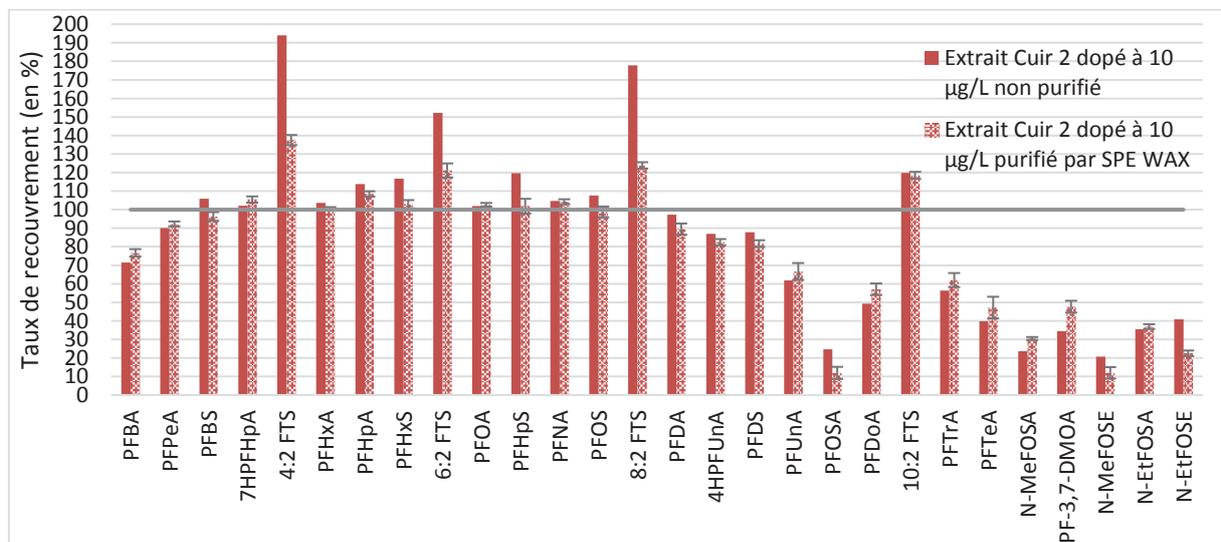


Figure 55 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 2 dopé à 10 µg/L et purifié ou non par SPE WAX

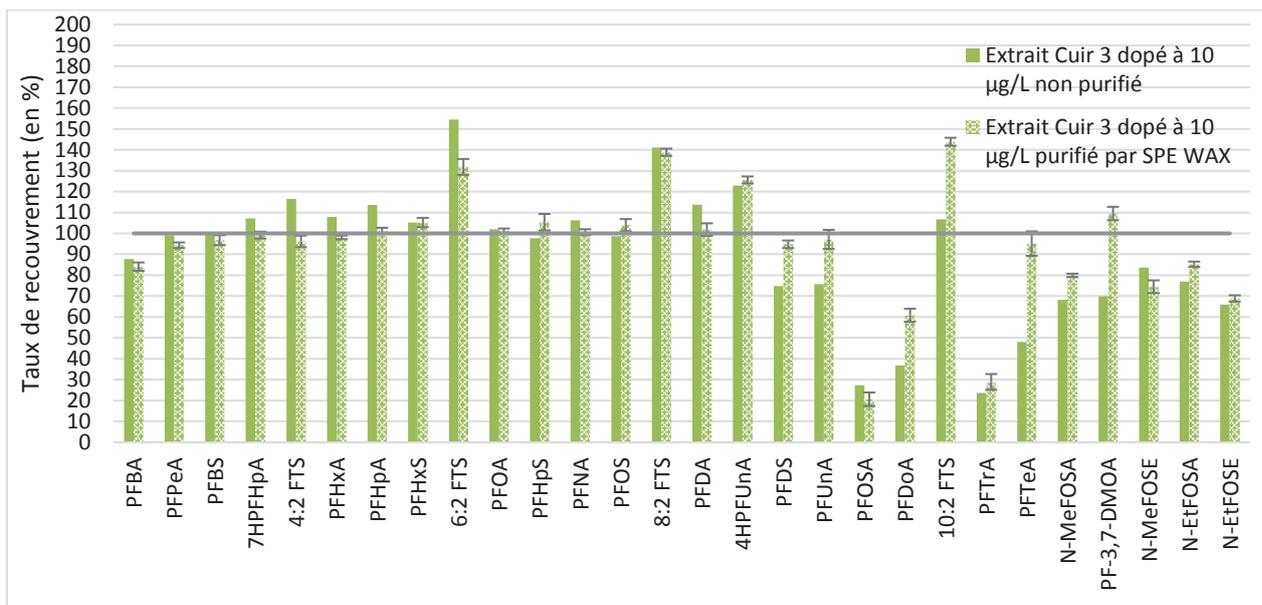


Figure 56 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 3 dopé à 10 µg/L et purifié ou non par SPE WAX

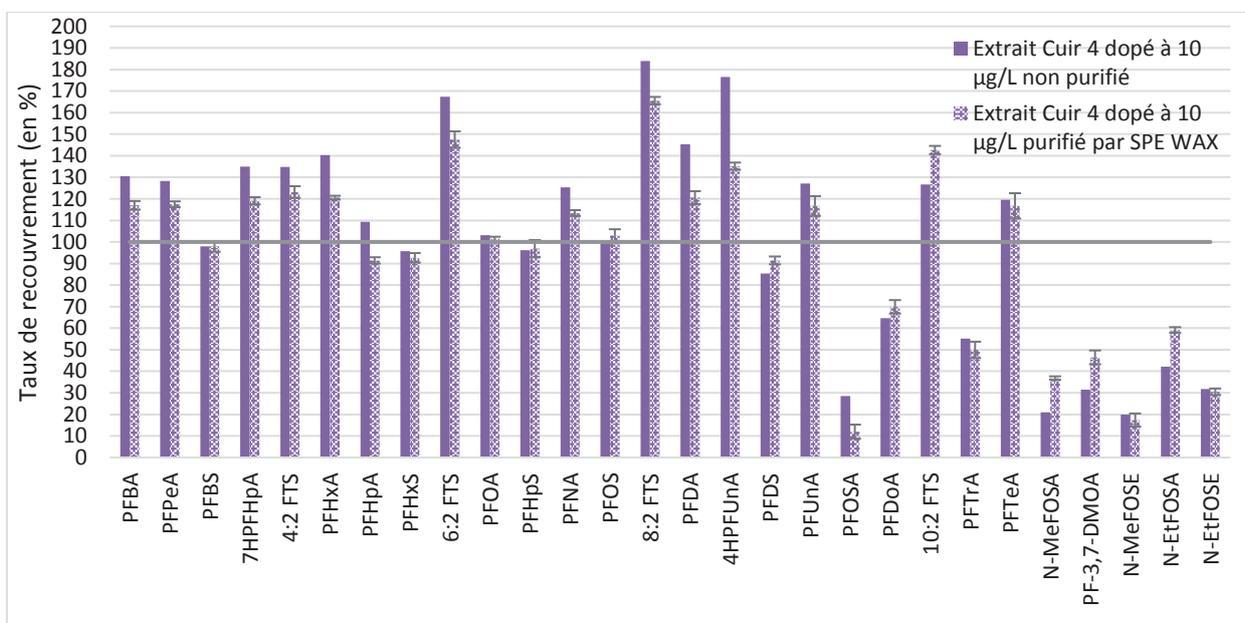


Figure 57 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 4 dopé à 10 µg/L et purifié ou non par SPE WAX

Pour le cuir 2 (Figure 55), la purification par SPE permet une réduction de l'exaltation du signal pour les FTSs. Par exemple, les taux de récupération du 6:2 FTS sans et avec purification par SPE sont respectivement de 166% et 121%. Cependant, la SPE n'apporte aucun changement pour les autres PFCs.

Les mêmes conclusions peuvent être tirées pour les cuirs 3 et 4 (Figure 56 et Figure 57) mais avec un effet moindre sur les FTSs.

En conclusion, si la SPE WAX réduit les effets de matrices pour certains cuirs, elle ne permet pas d'éliminer complètement les composés interférents générant les effets matrices. Les résultats obtenus

avec des cuirs différents, montrent que son efficacité est fortement liée à la nature des cuirs. Une autre stratégie doit être mise en place pour éliminer les effets de matrice.

3.6 Changement de solvant d'extraction

Les résultats issus des travaux en SPE ont montré que la SPE, si elle limite certains effets de matrices, ne permet pas de les supprimer. Ainsi, un changement de solvant d'extraction est envisagé pour essayer de limiter la co-extraction de composés responsables des effets matrices.

Le mélange acétonitrile/eau 80/20 a été évalué car ce mélange possède la même force éluante que le méthanol, c'est-à-dire la même polarité globale mais des contributions à sa polarité différentes. L'acétonitrile a également été testé seul.

Les échantillons de cuirs 1 et 2 ont été extraits avec ces 3 solvants dans des conditions identiques de température et de temps. Ces extraits ont été dopés à 10 µg/L puis analysés.

La comparaison de la coloration des extraits, dans les encarts des Figure 58 et Figure 60, met clairement en évidence que les solvants n'extraient pas les mêmes composés.

La Figure 58 permet de comparer les taux de recouvrement (calculés avec l'Équation 2) pour les extraits dopés du cuir 1 en fonction du solvant d'extraction utilisé (extraits non purifiés) afin de visualiser l'importance des effets de matrice en fonction du solvant utilisé pour l'extraction. La Figure 59 montre les fulls scans des différents extraits avant dopage pour voir l'influence du solvant d'extraction sur le courant d'ions total.

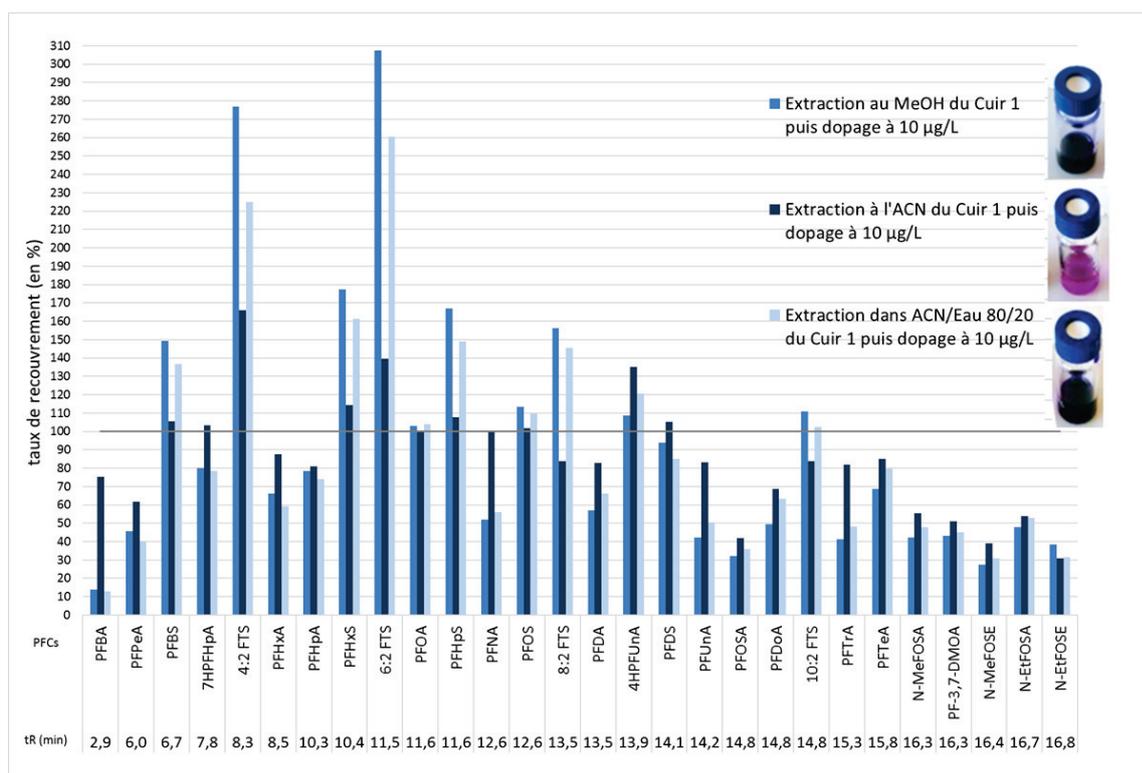


Figure 58 : taux de recouvrement suite au dopage du cuir 1 après extraction dans différents solvants (méthanol, acétonitrile/eau 80/20 et acétonitrile)

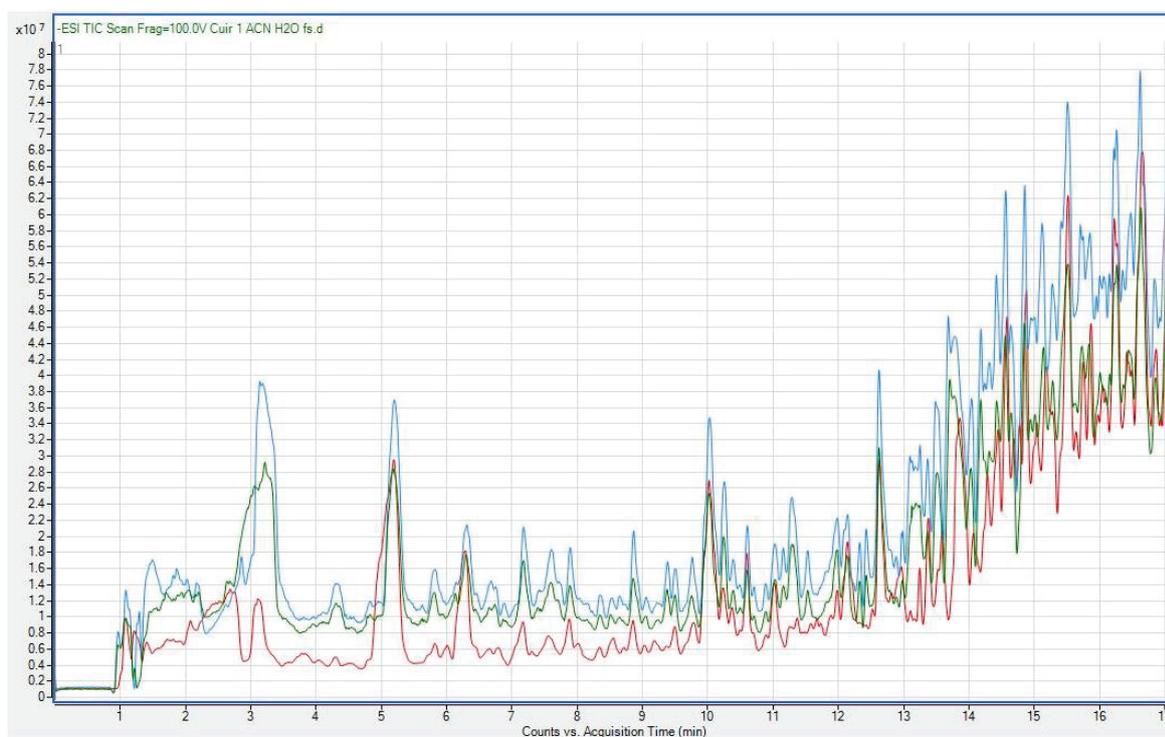


Figure 59 : fulls scans de l'extrait du cuir 1 non dopé extrait à 60°C pendant 2h au bain à ultrasons avec comme solvant d'extraction, le méthanol (en bleu) ou l'acétonitrile (en rouge) ou le mélange acétonitrile/eau 80/20 (en vert)

Globalement, l'extrait dans le méthanol et celui dans le mélange acétonitrile/eau 80/20 ont des taux de recouvrement comparables. L'extraction dans l'acétonitrile pur permet d'améliorer le taux de

recouvrement pour de nombreux composés et notamment de réduire les effets d'exaltation de signal des FTSs.

En effet, pour la famille des FTSs, l'extraction dans l'acétonitrile modifie les composés co-extraits ce qui permet de réduire l'effet matrice qui provoquait une augmentation du signal. Par exemple, le taux de recouvrement du 4:2 FTS est de 277% pour l'extrait dans le méthanol alors qu'il est de 166% pour l'extrait dans l'acétonitrile.

Pour certains PFCAs comme le PFBA et le PFNA, l'extraction dans l'acétonitrile permet d'éviter l'effet matrice suppresseur de signal qui avait lieu avec les extraits dans le méthanol. Au temps de rétention de ces composés, le full scan de la Figure 59 montre un courant d'ions plus faible pour l'extrait dans l'acétonitrile que pour les autres solvants.

Concernant l'extrait de cuir 2, la Figure 60 met en évidence que pour la grande majorité des composés, le taux de recouvrement obtenu est similaire quel que soit le solvant utilisé. Pour les derniers composés subissant la suppression d'ions, le taux de recouvrement est plus élevé avec les extraits dans l'acétonitrile mais les taux de recouvrement restent entre 35% et 71%. En effet, la Figure 61 montre que les fulls scans des différents extraits sont très similaires dans cette zone du chromatogramme. Une légère diminution du courant d'ions est visible pour l'extrait dans l'acétonitrile mais ne suffit pas à réduire les effets matrices.

Contrairement au cuir 1, l'extraction dans l'acétonitrile du cuir 2 ne permet pas de diminuer l'effet matrice pour les FTSs.

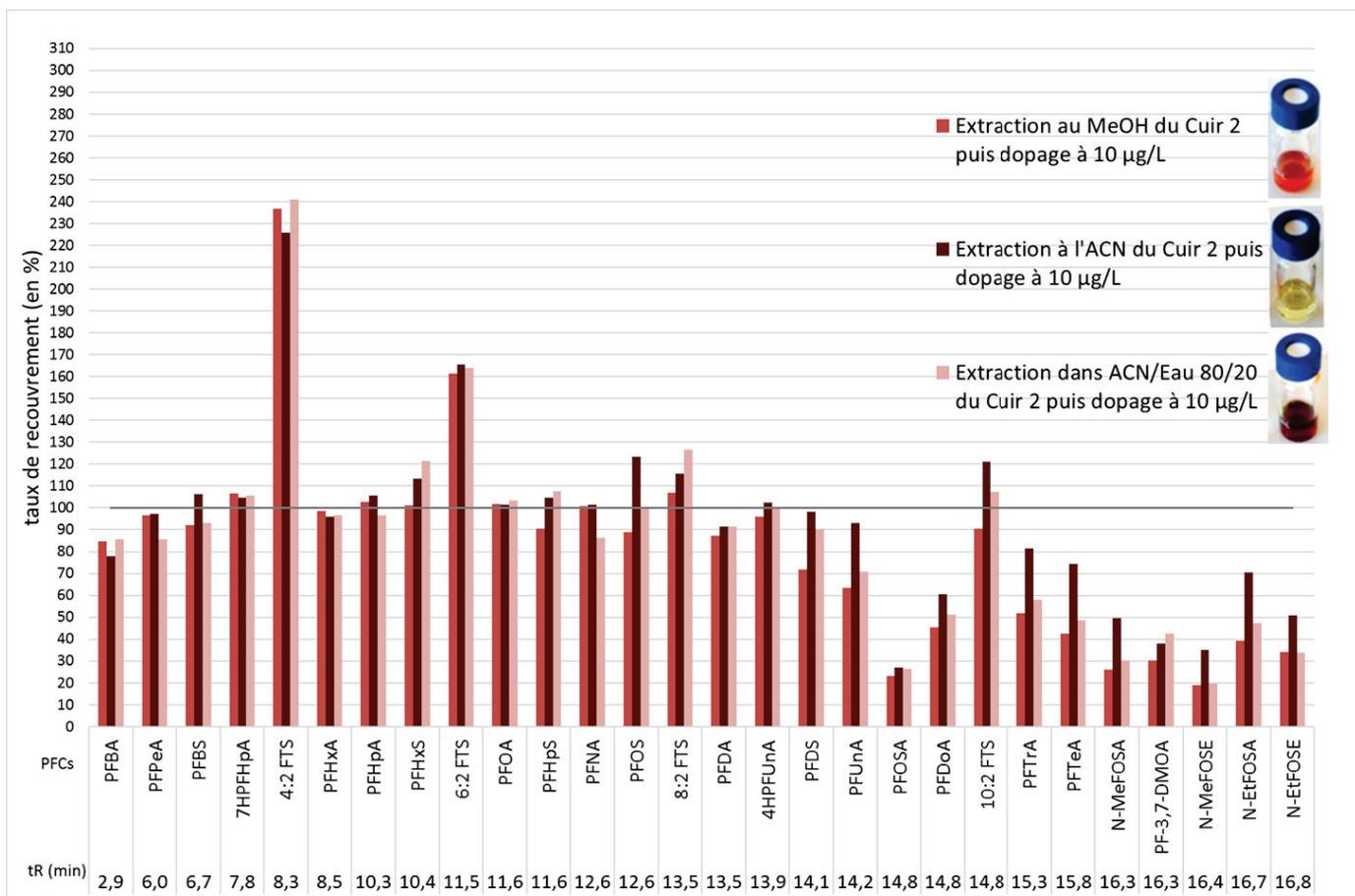


Figure 60 : taux de recouvrement suite au dopage du cuir 2 après extraction dans différents solvants (méthanol, acétonitrile/eau 80/20 et acétonitrile)

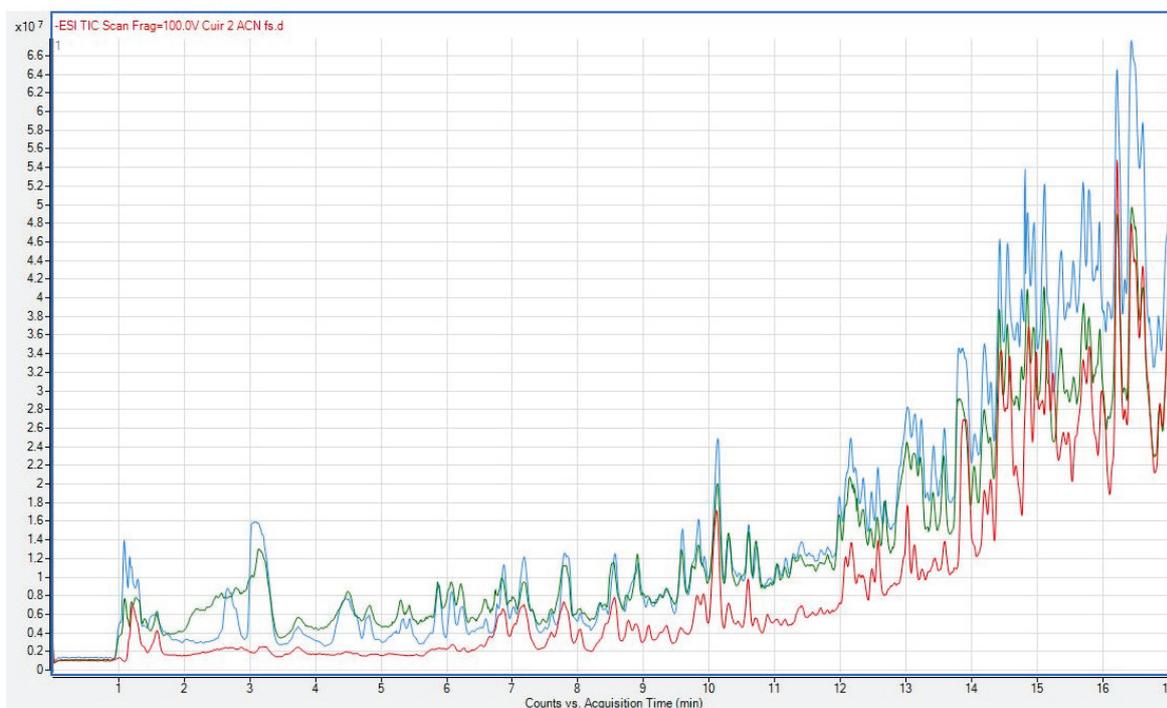


Figure 61 : fulls scans de l'extrait du cuir 2 non dopé extrait à 60°C pendant 2h au bain à ultrasons avec comme solvant d'extraction, le méthanol (en bleu) ou l'acétonitrile (en rouge) ou le mélange acétonitrile/eau 80/20 (en vert)

En conclusion, le méthanol et le mélange acétonitrile/eau 80/20 possédant la même force éluante globale conduisent à des effets matrices proches et à des taux de recouvrement du même ordre de grandeur. Pour l'acétonitrile, les effets matrices suppresseurs ou amplificateurs de signal se trouvent diminués pour certains cuirs et pour certains PFCs. Un changement de solvant dans la norme ISO 23702-1:2018 pourra être envisagé pour remplacer le méthanol par l'acétonitrile.

A noter que le solvant choisi doit extraire 100% des PFCs mais le pourcentage des PFCs extraits avec le méthanol et avec les autres solvants n'est pas connu.

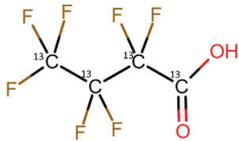
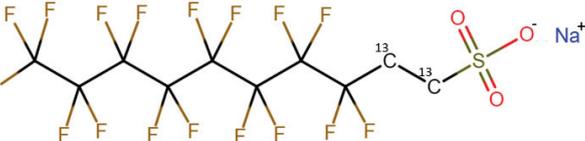
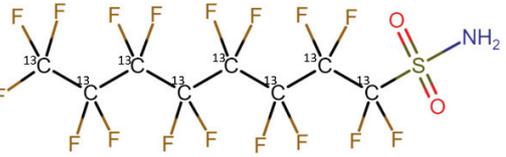
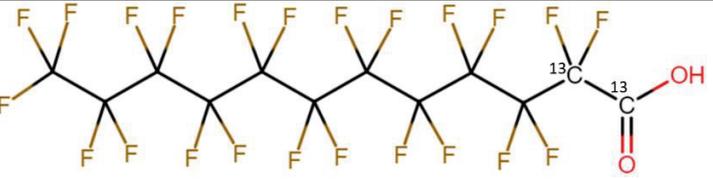
Pour la suite, le méthanol est conservé comme solvant d'extraction pour tester un changement à la fois.

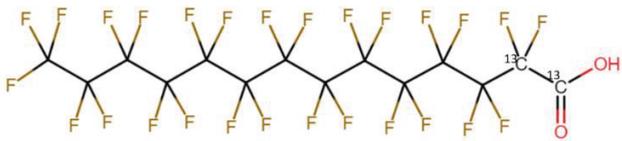
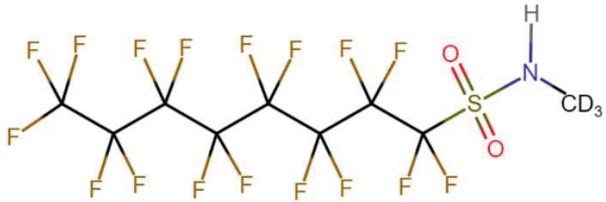
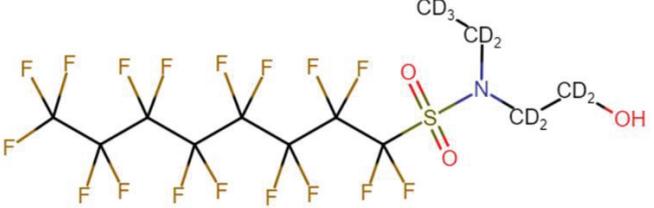
3.7 Ajout d'étalons internes

La SPE WAX et le changement de solvant d'extraction n'ont pas permis d'éliminer les effets matrices de façon systématique pour tous les cuirs. Il serait possible de tenter de multiplier les étapes de purifications mais ce choix nécessite une longue mise en œuvre. La stratégie retenue est l'ajout de nouveaux étalons internes pour tenter de corriger les effets matrices.

De nouveaux étalons internes, présentés dans le Tableau 11 sont ajoutés en plus du PFOS et PFOA marqués au carbone 13 pour tenter de corriger les effets matrices.

Tableau 11 : nouveaux étalons internes et leur structure chimique

Etalons internes	Structures chimiques
MPFBA	
M2-8:2 FTS	
M8FOSA	
MPFDoA	

M2PFTeA	
d-N-MeFOSA	
d9-N-EtFOSE	

Ainsi, les extraits des cuirs dopés à 10 µg/L précédemment quantifiés avec le PFOS marqué ou le PFOA marqué au carbone 13 comme étalons internes, sont quantifiés à nouveau mais avec ces étalons internes auxquels s'ajoutent les 7 nouveaux étalons internes. Ils sont associés aux PFCs, de structure et/ou temps de rétention proches. Les résultats obtenus avec ces deux quantifications sont ensuite comparés pour pouvoir affiner le choix des étalons internes par composé. Pour chaque composé, l'étalon interne retenu est celui qui permet d'atteindre les taux de recouvrement les plus proches de 100% (le détail est donné en section Matériels et Méthodes Partie 3).

En effet, par exemple, pour les extraits des cuirs 1 et 2 (Figure 62 et en Figure 63), les changements d'étalons internes pour la quantification de 11 composés ont permis d'atteindre des taux de recouvrement entre 72 et 126% pour ces composés. Certains composés n'ayant pas leur homologue marqué, sont sous-estimés, comme le PFPeA dont le taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 1 est de 37% ou encore le PFOA avec un taux de recouvrement de 61% dans l'extrait du cuir 2. Pour ces composés, un changement d'étalon interne n'a pas pu être possible car aucun choix parmi les nouveaux étalons ajoutés permettait d'avoir des taux de recouvrement proches de 100%.

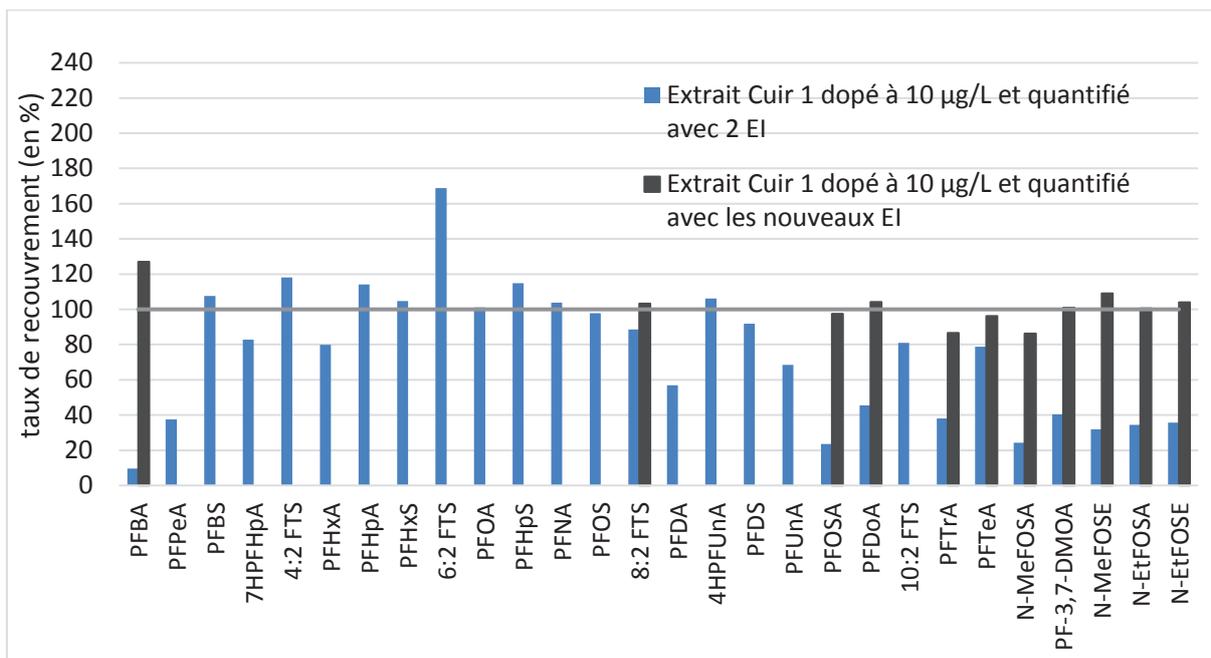


Figure 62 : modification des étalons internes pour la quantification de l'extrait du cuir 1. En bleu avec MPFOS et MPFOA et en noir avec les nouveaux étalons internes

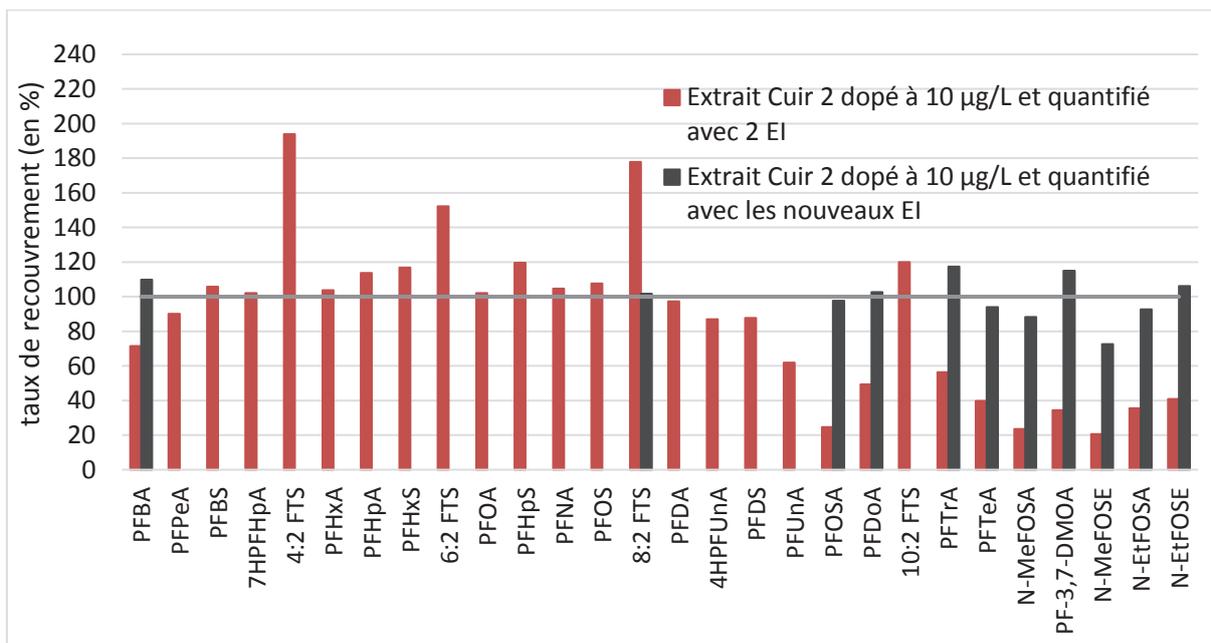


Figure 63 : modification de étalons internes pour la quantification de l'extrait du cuir 2. En rouge avec MPFOS et MPFOA et en noir avec les nouveaux étalons internes

La quantification avec deux étalons internes comme dans la norme (Figure 64) ou avec neuf étalons internes (Figure 65) est comparée pour les extraits des cuirs 1 à 13 et les extraits des cuirs CTC 1 à 8. Seuls les taux de recouvrement des PFCs (calculés avec l'Équation 2) ayant subi un changement d'étalon interne sont représentés.

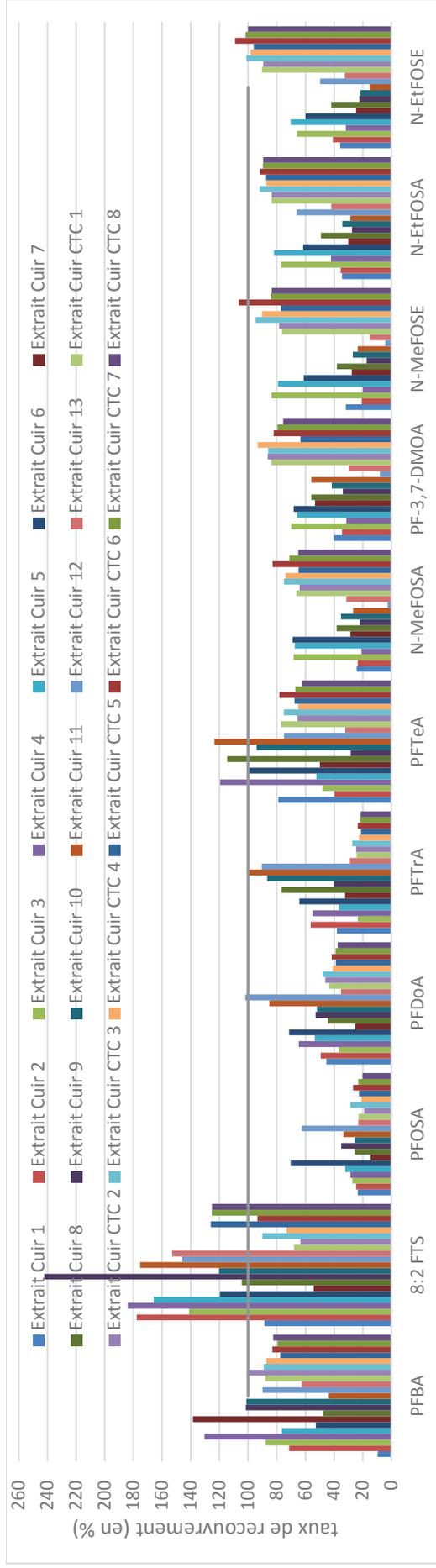


Figure 64 : taux de recouvrement pour la quantification d'extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec deux étalons internes (PFOs et PFOA marqués au carbone 13)

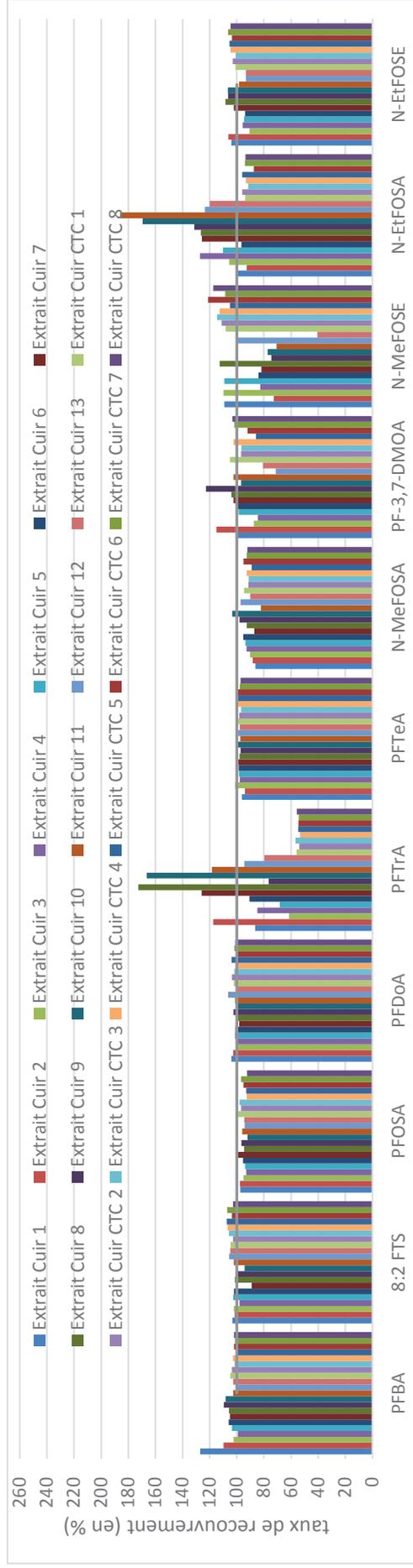


Figure 65 : taux de recouvrement pour la quantification d'extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les nouveaux étalons internes

Pour la plupart des extraits de cuirs dopés, le changement d'étalon interne pour un étalon interne plus proche en structure ou en temps de rétention a permis de meilleurs taux de recouvrement.

En effet, pour le PFBA, le 8:2 FTS, le PFOSA, le PFDoA, le PFTeA, le N-MeFOSE et le N-EtFOSE, la quantification avec leur homologue marqué au carbone 13 ou deutéré permet, en corrigeant les effets matrices des extraits de cuirs, d'atteindre des taux de recouvrement entre 82% et 126%.

Pour le PFTrA et le N-EtFOSE, les nouveaux étalons internes (le MPFDoA et le d9-N-EtFOSE) améliorent les taux de recouvrement pour la plupart des cuirs mais mènent parfois à une surestimation. Par exemple, pour les extraits des cuirs 8 et 10, le PFTrA quantifié avec le MPFOA avait des taux de recouvrement de 76% et 86% respectivement. Alors que la quantification avec le MPFDoA conduit à des taux de recouvrement entre 172% et 166%.

La quantification du PF-3,7-DMOA et du N-MeFOSE avec le d-N-MeFOSE, en raison de leur temps de rétention proches, permet aux extraits de cuirs d'avoir des taux de recouvrement plus proches des 100% (entre 70 et 122%) ; sauf pour l'extrait du cuir 13 qui a un taux de recouvrement de 40% pour le N-MeFOSE mais ce taux reste trois fois supérieur à celui obtenu avec la quantification avec le MFPOA, cet étalon interne étant trop éloigné en temps de rétention du N-MeFOSE.

Afin d'avoir une vue d'ensemble de la quantification des cuirs avec les 9 étalons internes, les taux de recouvrement obtenus (calculés avec l'Équation 2) sont représentés pour chaque extrait de cuir dopé de la Figure 66 à la Figure 68.

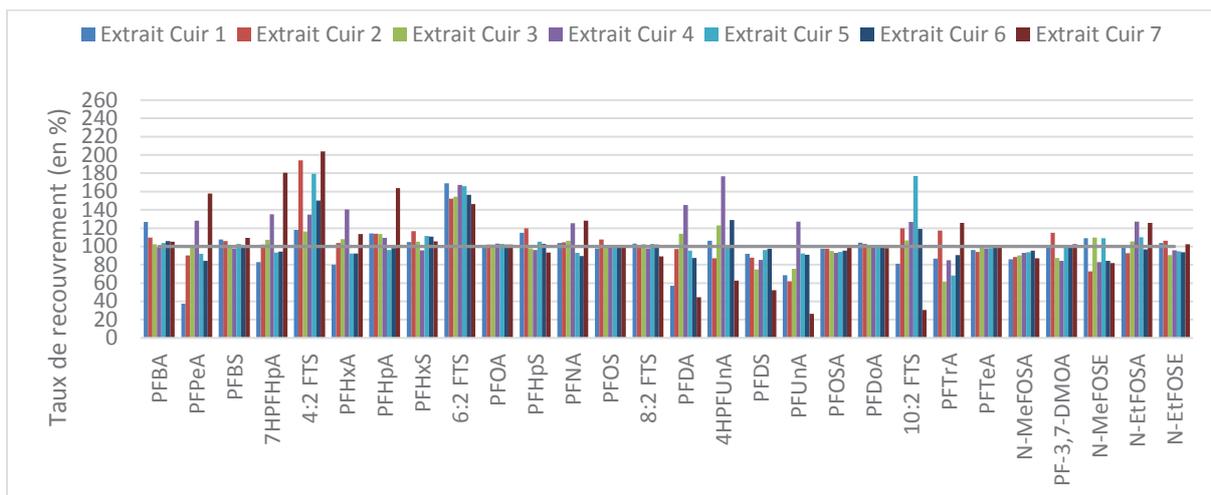


Figure 66 : taux de recouvrement des PFCs par ordre d'élution pour les extraits de cuirs 1 à 7 dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les neuf étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13 et les nouveaux)

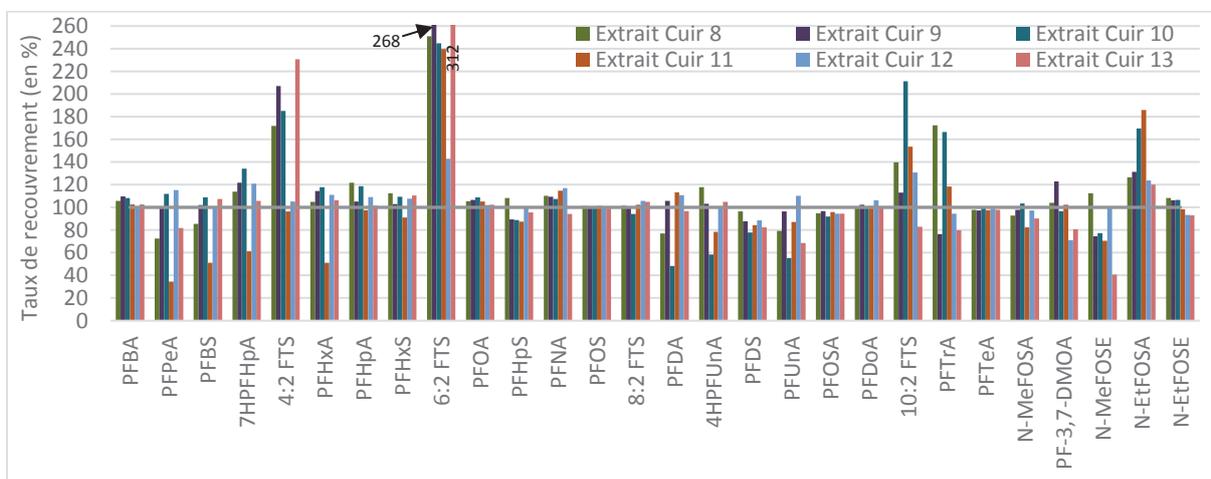


Figure 67 : taux de recouvrement des PFCs par ordre d'élution pour les extraits de cuirs 8 à 13 dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les neuf étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13 et les nouveaux)

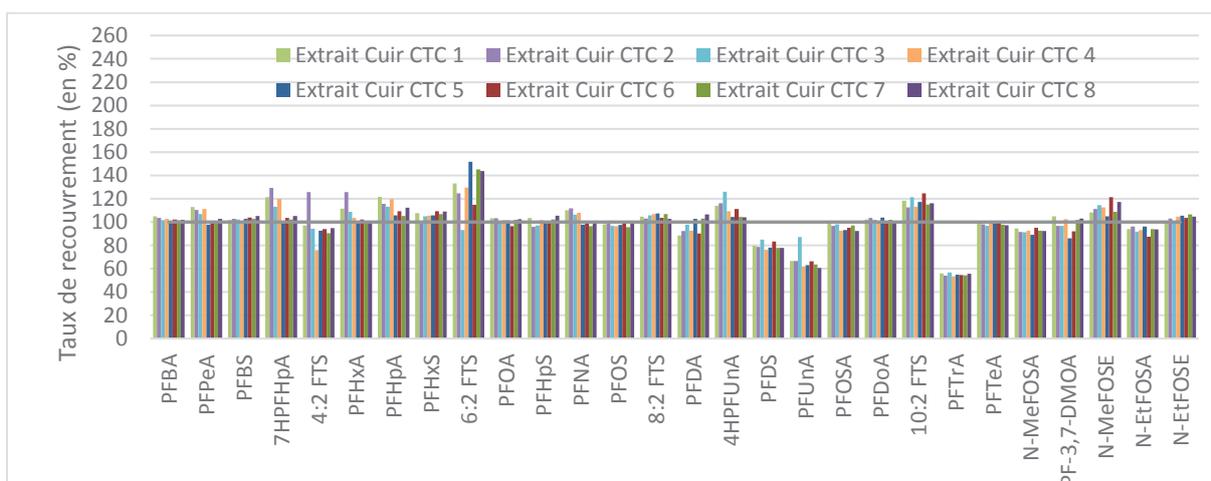


Figure 68 : taux de recouvrement des PFCs par ordre d'élution pour les extraits de cuirs CTC 1 à 8 dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les neuf étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13 et les nouveaux)

Ces figures montrent que l'ajout d'étalons internes a amélioré la quantification des PFCs en compensant les effets matrices. Cependant, pour certains composés n'ayant pas leur homologue

marqué, des sous-estimations ou surestimations dues aux effets matrices sont toujours présentes. Par exemple, le 4:2 FTS, le 6:2 FTS et le 10:2 FTS sont surestimés dans la plupart des reliquats de cuirs. Il serait nécessaire d'ajouter leur homologue marqué et d'ajouter d'autres étalons internes pour assurer une quantification exacte quel que soit le cuir analysé.

3.8 Conclusion

La purification des extraits de cuirs par SPE WAX n'est pas suffisante, puisqu'elle mène à une diminution des effets matrices que pour certains cuirs et pour certains composés. Même si la SPE ne permet pas une amélioration de la quantification, elle peut permettre une diminution de l'encrassement du spectromètre de masse. Le changement de solvant ne réduit pas suffisamment les composés co-extraits interférents responsables des sous-estimations et des surestimations.

L'ajout d'étalons internes a permis d'atteindre des taux de recouvrement avoisinant les 100% pour les analytes homologues ou proches en structure et en temps de rétention. Les nouveaux étalons internes ne suffisent pas à compenser les effets matrices de tous les analytes, il faudrait quantifier chaque analyte avec son homologue marqué. Cependant, un étalon interne par analyte entraînerait une augmentation du prix de l'analyse et doublerait le nombre de transitions MRM à analyser sur la même plage de temps de rétention. Il pourrait alors être nécessaire d'analyser tous les composés en 2 injections pour permettre une fréquence d'acquisition suffisante.

Chapitre 4 : Matériels et Méthodes

1 Séparation chromatographique

La séparation est réalisée sur la LC Agilent 1260 Infinity II à 40°C avec la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 150 x 2,1 mm 2,7 µm, avec comme phase mobile une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM (pour permettre la formation d'adduits acétates) et du méthanol (permettant d'obtenir des aires de pics plus élevées que l'acétonitrile). Le débit est de 0,3 mL/min, et le volume d'injection de 3 µL.

Gradient pour le développement de méthode :

Il commence par 30% de méthanol et atteint 90% en 14 min, un palier à 90% pendant 3,5 min est ajouté.

Optimisation du gradient avec le logiciel Osiris :

- Pour déterminer expérimentalement le volume mort, le glyphosate (marqueur de temps mort) est injecté à un débit de 0,3 mL/min et à une composition de 50/50 v/v (acétate d'ammonium 10 mM/MeOH)

- Pour la détermination du temps de délai, la colonne est retirée. La phase mobile A est composée de méthanol de qualité LC-MS et la phase mobile B de méthanol qui n'est pas de qualité LC-MS. Après un palier isocratique de 2 minutes à 100% de A, le %B est augmenté jusqu'à 100% en 12 minutes. Une impureté du méthanol est suivie en SIM pour un m/z de 198 afin de visualiser le gradient réel par rapport au gradient programmé.

- Pour la détermination des temps de rétention des PFCs à 10 µg/L avec un gradient lent et un gradient rapide, le gradient démarre par 10% de méthanol (et 90% d'une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM) puis atteint 99% de méthanol au bout de 31,33 min (pour le gradient lent) ou au bout de 10 min (pour le gradient rapide).

2 Optimisation des paramètres du spectromètre de masse

La détection MS/MS des PFCs est réalisée avec le triple quadripôle Agilent 6470 LC/TQ avec une source électrospray en mode négatif. Les paramètres de la source sont donnés dans le Tableau 12 et correspondent aux paramètres qui étaient utilisés au CTC pour analyser le PFOS et le PFOA.

Tableau 12 : paramètres de la source électrospray en mode négatif

Paramètres	Valeurs
Température du gaz	320°C
Débit du gaz	6 L/min
Pression de nébulisation	60 psi

Température du Sheath gaz	350°C
Débit du Sheath gaz	11 L/min
Tension du capillaire négative	3 750 V

Le mode d'acquisition « **Single Ion Monitoring** » (**SIM**) est utilisé pour suivre le m/z 198 (correspondant à une impureté du méthanol) afin de déterminer le temps de délai.

Le mode d'acquisition **full scan (ou balayage)** est choisi pour étudier la présence d'interférences dans les blancs de méthanol et dans les extraits de cuirs, pour estimer l'influence de la SPE sur les extraits de cuirs et pour évaluer l'influence du changement de solvant d'extraction sur les extraits de cuirs obtenus. Ce balayage est effectué entre les m/z de 50 à 800 avec un fragmentor (la tension à appliquer à l'extrémité de sortie du capillaire) de 100 V et une tension d'accélération de 5 V.

Le mode d'acquisition « **Multiple Reaction Monitoring** » (**MRM**) permet la quantification des PFCs. Pour chaque ion précurseur, le fragmentor, l'énergie de collision et la tension d'accélération des ions produits sont optimisés. Le fragmentor est optimisé entre 50 et 200 V avec un pas de 10 V. Le fragmentor donnant l'intensité de pic la plus grande est choisi. L'énergie de collision est étudiée entre 5 et 50 V avec un pas de 5 V. Il en résulte le choix de deux ions produits (si possible différents de l'ion précurseur) et énergies de collisions associées permettant d'avoir les plus fortes abondances. Enfin, la tension d'accélération est ajustée entre 2 et 7 V avec un pas de 1 V. Pour chaque transition (ion précurseur donne ion produit), la tension d'accélération donnant l'aire de pic la plus grande est choisie.

3 Quantification

La **calibration** est réalisée à partir des solutions commerciales individuelles à 50 000 µg/L dans le méthanol des fournisseurs Wellington et Chiron. Ainsi, un mélange dans le méthanol de l'ensemble des PFCs (sauf les FTOHs) à 1 000 µg/L (et à 5 000 µg/L pour le PF-3,7-DMOA) est effectué. Ensuite, le mélange précédent est dilué pour préparer un mélange dans le méthanol à 25 µg/L en PFCs (125 µg/L pour le PF-3,7-DMOA) et pour ajouter les FTOHs pour qu'ils soient à une concentration de 2 500 µg/L dans ce mélange. Un mélange dans le méthanol avec les étalons internes utilisés à 100 µg/L est préparé. Ces deux mélanges sont dilués dans le méthanol pour réaliser les calibrations avec une concentration en étalons internes de 10 µg/L et les concentrations en PFCs qui s'étendent entre 50 et 1 000 µg/L pour les FTOHs, entre 1,25 et 50 µg/L pour les PF-3,7-DMOA et entre 0,25 et 10 µg/L pour les autres PFCs.

La courbe de calibration est linéaire avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,997.

La **quantification** est réalisée en étalonnage interne. Une exception est faite pour la quantification des PFCs contenus dans la fraction de lavage SPE, qui est effectuée en étalonnage externe.

La limite de quantification (LOQ) estimée sur les points de gamme est de 1,25 µg/L pour le PF-3,7-DMOA, entre 50 µg/L et 500 µg/L pour les FTOHs et de 0,25 µg/L pour les autres PFCs.

Quantification à deux étalons internes : le PFOS et PFOA marqués au carbone 13 (MPFOA et MPFOS) sont utilisés pour une quantification comme dans la norme ISO 23702-1:2018. Le Tableau 13 montre avec quel étalon interne est réalisée la quantification pour chaque famille de PFCs étudiée. Le choix repose sur des similarités de structures chimiques.

Tableau 13 : deux étalons internes, le PFOS et PFOA marqués au carbone 13 (MPFOA et MPFOS) associés aux familles de PFCs

Familles de PFCs	Etalons internes associés
PFCAs	MPFOA
PFASs	MPFOS
FTSs	MPFOS
FOSAs	MPFOS
FOSEs	MPFOS

Quantification à 9 étalons internes : d'autres étalons internes sont ajoutés et associés aux PFCs de structure proche et/ou de temps de rétention proche, comme présenté dans le Tableau 14.

Tableau 14 : quantification des PFCs avec 9 étalons internes (incluant les 7 nouveaux étalons internes)

PFCs	Etalons internes associés
PFBA	MPFBA
PFPeA	MPFOA
PFBS	MPFOS
7HPFHpA	MPFOA
4:2 FTS	MPFOS
PFHxA	MPFOA
PFHpA	MPFOA
PFHxS	MPFOS
6:2 FTS	MPFOS
PFOA	MPFOA
PFHpS	MPFOS
PFNA	MPFOA
PFOS	MPFOS
8:2 FTS	M2-8:2 FTS
PFDA	MPFOA

4HPFUnA	MFPOA
PFDS	MPFOS
PFUnA	MPFOA
PFOSA	M8FOSA
PFDoA	MPFDoA
10:2 FTS	MPFOS
PFTTrA	MPFDoA
PFTeA	M2PFTeA
N-MeFOSA	d-N-MeFOSA
PF-3,7-DMOA	d-N-MeFOSA
N-MeFOSE	d-N-MeFOSA
N-EtFOSA	d9-N-EtFOSE
N-EtFOSE	d9-N-EtFOSE

4 Echantillons de cuirs

Les échantillons de cuirs pour étudier la masse d'une prise d'essai représentant un carré de 10 x 10 cm correspondent à 35 cuirs différents pris au hasard dans les reliquats CTC.

Pour les autres essais, 21 cuirs différents sont utilisés (Tableau 15), dont les cuirs 1 à 13 issus des reliquats CTC et les 8 cuirs CTC préparés dans la tannerie CTC (modes opératoires en annexe 4).

Tableau 15 : présentations des cuirs dopés

Cuirs	Couleurs des cuirs	Animal	Tannage	Retannage	Pigment, colorant ou finition	Extraits obtenus	PFCS présents dans l'extrait brut
1	Bleu	Chèvre	Végétal (cuir gras)	Information connue non connue	Finition		<LQ
2	Marron rouge	Bovin (croute)	Information connue non connue	Information connue non connue	Information non connue		<LQ
3	Rouge	Veau	Chrome	Information connue non connue	Colorant mais pas de finition		<LQ
4	Blanc bleuté	Agneau	Chrome	Information connue non connue	Information non connue		<LQ
5	Beige	Veau	Chrome	Synthétique	Information non connue		<LQ
6	Noir	Bovin	Chrome	Information connue non connue	Pigmenté		<LQ
7	Turquoise	Bovin (croute)	Chrome	Information connue non connue	Pigmenté		PFBS = 42,95 µg/L N-MeFOSE = 2,20 µg/L
8	Bleu gris	Aucune information connue					N-MeFOSE = 7,87 µg/L

9	Blanc (cuir pour ameublement)	Buffle (fleur)	Chrome	Information connue	non	Information non connue		N-MeFOSE = 2,16 µg/L
10	Noir	Buffle	Chrome	Information connue	non	Information non connue		N-MeFOSE = 2,49 µg/L
11	Marron	Bovin	Végétal	Information connue	non	Peu de finition		N-MeFOSE = 3,34 µg/L
12	Noir	Bovin (nubuck)	Chrome	Information connue	non	Information non connue		PFHxA = 2,18 µg/L PFHpA = 5,32 µg/L PFOA = 2,47 µg/L
13	Marron	Bovin (fleur)	Chrome	Information connue	non	Pigmenté		<LQ
1 CTC	Marron	Agneau	Chrome	Végétal		Colorant métallifère base chrome et cobalt (colorant post tannage, étape teinture)		PFHxS = 0,63 µg/L
2 CTC	Marron	Agneau	Chrome	Synthétique		Colorant métallifère base chrome et cobalt		PFHxS = 0,82 µg/L
3 CTC	Marron	Agneau	Chrome	Résine acrylique		Colorant métallifère base chrome et cobalt		<LQ

4 CTC	Marron	Agneau	Chrome	Résine dicyandiamide	Colorant métallifère base chrome et cobalt		PFHxS = 0,53 µg/L
5 CTC	Rouge	Agneau	Chrome	Non	Colorant acide		PFHxS = 0,37 µg/L
6 CTC	Rouge	Agneau	Chrome	Non	Colorant métallifères à base de chrome (rouge)		<LQ
7 CTC	Noir	Agneau	Chrome	Non	Colorant métallifères à base de chrome (noir)		PFHxS = 0,33 µg/L
8 CTC	Bleu gris	Agneau	Chrome	Non	Colorant métallifères à base de chrome (bleu)		PFHxS = 0,64 µg/L

Pour la préparation de l'échantillon, le cuir est découpé en un carré de 10 x 10 cm (soit une surface de 100 cm²) et la masse de ce carré est déterminée. Ce carré est ensuite découpé en petits morceaux de 3 mm à 5 mm de côté (norme ISO 4044).

Pour l'extraction, elle est réalisée avec 40 mL de méthanol (les PFCs étant des composés hydrophobes) à 60°C aux ultrasons pendant 120 min pour extraire le plus de PFCs possible du cuir comme certains sont des composés organiques persistants qui peuvent contaminer la chaîne alimentaire. Puis, les extraits sont filtrés avec un filtre en polypropylène à 0,2 µm (filtre qui a été vérifié, il n'induit pas d'interférence). Pour l'étude sur l'influence du changement du solvant d'extraction, le méthanol est remplacé par un mélange acétonitrile/eau 80/20 (mélange de même force éluante que le méthanol mais avec des contributions à sa polarité différentes) ou par de l'acétonitrile.

Le dopage des extraits de cuirs est effectué au point haut de la gamme, à 10 µg/L en PFCs (soit 50 µg/L pour le PF-3,7-DMOA) et à 10 µg/L en étalons internes.

5 Purification SPE WAX

La purification SPE est mise en œuvre avec la cartouche Affinisep AttractSPE™ WAX - PFC 6 mL – 150 mg

Les volumes de dépôt, de lavage et d'élution (1,5 mL) correspondent à 2 à 3 fois le volume de l'adsorbant.

Les pourcentages sont des pourcentages volumiques.

Pour estimer la répétabilité de la SPE WAX manuelle, le mode opératoire suivant est utilisé, il correspond à des conditions proches de celles conseillées par les fournisseurs :

- Dépôt : 1,5 mL d'une solution aqueuse à 100 µg/L en PFCs et en EI contenant 2% d'acide formique et 20% de méthanol (la capture des PFCs est favorisée en protonant les amines du support SPE et en déposant les PFCs ionisables sous forme anionique),
- Lavage : 1,5 mL d'une solution aqueuse à 2% d'acide formique et avec 20% de méthanol,
- Elution : 1,5 mL de 2% d'ammoniaque dans le méthanol (les amines du support sont déprotonées et les interactions sont rompues).

Pour l'optimisation de la SPE WAX, le mode opératoire suivant est utilisé :

- Dépôt : 1,5 mL d'une solution aqueuse à 100 µg/L en PFCs et en EI contenant 2% d'acide formique et entre 20% et 65% de méthanol,
- Lavage : 1,5 mL x 2 d'une solution aqueuse à 2% d'acide formique et avec entre 65% et 98% de méthanol (l'intérêt de laver avec le plus grand pourcentage de méthanol possible est d'éliminer le plus d'interférents hydrophobes possible),
- Elution : 1,5 mL de 2% d'ammoniaque dans le méthanol.

Pour les deux modes opératoires précédents, les fractions de lavages et d'élution sont récupérées (la cartouche est éluée à sec après le premier lavage, après le second lavage et après l'élution). Les fractions sont diluées par 10 dans le méthanol avant injection.

Conclusion Générale

Ce travail de thèse, réalisé au sein du Comité professionnel de développement Cuir, Chaussure, Maroquinerie (CTC) en partenariat avec l'Institut des Sciences Analytiques (ISA), était centré sur l'analyse du formaldéhyde et des composés poly et perfluorés dans les cuirs.

L'objectif principal de ce projet était, d'améliorer ou de développer des méthodes analytiques pour permettre à la filière cuir d'assurer l'innocuité des produits finis en répondant aux exigences réglementaires. Ce travail de thèse illustre, à travers les exemples du formaldéhyde et des composés poly et perfluorés, la difficulté de développer une méthode d'analyse adaptée à tous les cuirs en raison de la complexité et de la diversité de cette matrice. Les résultats obtenus sur des cuirs différents montrent qu'ils sont parfois dépendants des procédés de fabrication des cuirs pourtant inconnus au moment de leur analyse.

Concernant le formaldéhyde, en chapitre 2, il a d'abord été nécessaire de mettre en évidence et de confirmer la surestimation de la teneur en formaldéhyde pour les cuirs retannés avec des résines capables de libérer le formaldéhyde par hydrolyse au cours de la réaction de dérivation. Ensuite, différentes conditions de dérivation ont été testées afin d'éliminer ce biais de quantification. Il a été prouvé que la dérivation sans ajout d'acide et en chauffant permet d'empêcher l'hydrolyse des résines et d'aboutir à une quantification exacte du formaldéhyde dans les cuirs indépendamment de leur procédé de fabrication. Le temps d'attente entre la fin de la dérivation et l'analyse n'a plus d'influence sur la teneur en formaldéhyde mesurée. Une autre méthode utilisant une dérivation en ligne à l'acétylacétone permet également d'empêcher l'hydrolyse des résines et conduit aux mêmes teneurs que la nouvelle méthode. Cette dernière a conduit à la version 2021 de la norme ISO 17226-1 et à la rédaction d'un article scientifique. Ce chapitre 2 conclut avec la bonne répétabilité et reproductibilité de cette méthode estimées à travers des essais inter laboratoires à l'échelle internationale. Ainsi, l'objectif fixé initialement est atteint.

Dans le chapitre 3, les recherches portent sur la détermination des composés poly et perfluorés dans le cuir. Tout d'abord, ces composés réglementés ont été étudiés et classés en familles de structures et propriétés chimiques proches. Le premier objectif était la modification du mode opératoire de préparation pour qu'il puisse permettre de donner un résultat en $\mu\text{g}/\text{m}^2$ et en $\mu\text{g}/\text{kg}$ afin de répondre aux différentes réglementations. Ensuite, l'optimisation des conditions de séparation et de détection par chromatographie liquide en phase inverse couplée à un spectromètre de masse en tandem a été réalisée. Une trentaine de PFCs sont élués en 11 minutes. Les limites de quantifications sont suffisamment basses pour répondre aux cahiers des charges ($1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ pour le PFOS), mais des essais de dopage sur la matrice cuir ont révélé que les composés co-extraits induisent d'importants effets matrices responsables de la surestimation ou de la sous-estimation de certains composés. Afin de

diminuer ces effets, une étape de purification et préconcentration par SPE WAX ou un changement de solvants d'extraction ont été testés. Ces deux changements testés séparément ont conduit à une diminution de ces effets limitée à certains cuirs et à certains composés. L'ajout d'étalons internes est la seule solution qui a permis de corriger efficacement les effets matrices mais nécessiterait de quantifier chaque analyte avec son homologue marqué, ce qui entrainerait une augmentation de prix et des contraintes pour avoir une fréquence d'acquisition satisfaisante. D'autre part, afin de pouvoir doser les familles de PFCs ne pouvant pas être analysées par chromatographie en phase liquide, une méthode GC-MS sera développée. La GC-MS peut également permettre l'analyse des FOSEs et des FOSAs qui présentaient une suppression de signal en LC-MS/MS. Pour ces deux familles, il peut être plus pertinent de les analyser par GC-MS où il y a moins d'effets matrices à l'ionisation. La GC-MS pourrait aussi permettre de diminuer les limites de quantification des FTOHs.

Grâce à l'ensemble des développements de méthodes, des propositions seront faites dans le cadre de la modification de la norme ISO 23702-1 2018 pour assurer la quantification des PFCs dans les cuirs.

Références bibliographiques

- (1) CTC. CTC à travers l'histoire <https://www.ctc-services.org/connaitre-ctc-45-6.html> (accessed 2019 -10 -28).
- (2) Legifrance. Loi N° 2003-1312 Du 30 Décembre 2003 de Finances Rectificative Pour 2003 - Article 71.
- (3) Richard, S. Attestation d'accréditation N°1-0130 rév.16. *COFRAC* **2018**, 37.
- (4) CTC. Conseil et Expertise Cuir, Chaussure, Maroquinerie, Ganterie : nos valeurs <https://www.ctcgroupe.com/fr/a-propos-de-ctc/valeurs-27-1.html>.
- (5) International council of tanners. *International Glossary of Leather Terms*, 2nd Edition.; 1975.
- (6) Vitteau, B.; Poncet, T.; Valot, E.; Vuillermet, C.; De Cagny, M.-N.; Campagna, A.; Favier, L.; Issartel, J.; Humbert, N.; Hustache-Mathieu, N.; Lepretre, A.-L.; Liauzon, R. *Le Cuir Dans Tous Ses États*, CTC.; Les indispensables de CTC; 2011.
- (7) Pant, S.; Gahlot, M. *Natural Dyeing of Leather Going GREEN*; AP Lambert Academic Publishing, 2015.
- (8) Covington, A. D. *Tanning Chemistry: The Science of Leather*; Royal Society of Chemistry, 2009.
- (9) Gobilliard, J. *Tannage et Corroyage Des Cuirs et Peaux*, Editions Scientifiques & Techniques.; Eyrolles, 1955.
- (10) Koppenhoefer, R. M.; Highberger, J. H.; Debeukelaer, F. L. *The Chemistry and Technology of Leather*, REINHOLD BOOK.; Fred O'Flaherty, Willian T. Roddy and Robert M. Lollar, 1956; Vol. Volume 1-Preparation for tannage.
- (11) Committee of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies. *Leather Technical Dictionary*, Eduard Roether Verlag Darmstadt.; 1977.
- (12) Sathiyamoorthy, M.; Selvi, V.; Mekonnen, D.; Habtamu, S. Preparation of Eco-Friendly Leather by Process Modifications to Make Pollution Free Tanneries. *J. Eng. Comput. Appl. Sci.* **2013**, 2 (5), 6.
- (13) Thanikaivelan, P.; Rao, J. R.; Nair, B. U.; Ramasami, T. Progress and Recent Trends in Biotechnological Methods for Leather Processing. *Trends Biotechnol.* **2004**, 22 (4), 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.02.008>.
- (14) Beghetto, V.; Zancanaro, A.; Scrivanti, A.; Matteoli, U.; Pozza, G. The Leather Industry: A Chemistry Insight Part I: An Overview of the Industrial Process. *Sci. Ca' Foscari* **2013**, 12–22.
- (15) Dixit, S.; Yadav, A.; Dwivedi, P. D.; Das, M. Toxic Hazards of Leather Industry and Technologies to Combat Threat: A Review. *J. Clean. Prod.* **2015**, 87, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.10.017>.
- (16) Fontaine, M. Etude de l'évolution de La Teneur En Chrome Hexavalent Dans Le Cuir, Influence Des Conditions de Fabrication et Importance Des Facteurs Environnementaux, Thèse Université Claude Bernard Lyon 1, 2017.
- (17) Thanikaivelan, P.; Rao, J. R.; Nair, B. U.; Ramasami, T. Recent Trends in Leather Making: Processes, Problems, and Pathways. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2005**, 35 (1), 37–79. <https://doi.org/10.1080/10643380590521436>.
- (18) Heidemann, E. *Fundamentals of Leather Manufacturing*, Eduard Roether KG.; 1993.
- (19) Tasca, A. L.; Puccini, M. Leather Tanning: Life Cycle Assessment of Retanning, Fatliquoring and Dyeing. *J. Clean. Prod.* **2019**, 226, 720–729. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.335>.
- (20) Wolf, G.; Huffer, S. Formaldehyde in Leather - A Survey. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **2002**, 97 (11), 456–464.

- (21) Bayramoglu, E. E.; Yorgancioglu, A.; Onem, E. Analysis of Release of Free Formaldehyde Originated from THP Salt Tannages in Leather by High Performance Liquid Chromatography: Origanum Onites Essential Oil as Free Formaldehyde Scavenger. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **2013**, *108*, 411–419.
- (22) Faithfull, N. S.; Weers, J. G. Perfluorocarbon Compounds. *Vox Sang.* **1998**, *74* (S2), 243–248. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1998.tb05426.x>.
- (23) Buck, R. C.; Murphy, P. M.; Pabon, M.; Posner, S.; Fromel, T.; Knepper, T. P.; Gellrich, V.; Eschauzier, C.; de Voogt, P.; Brauch, H.-J.; Lange, F. T.; Lutze, H.; Panglisch, S.; Bergmann, A.; Schmidt, T. C.; Farré, M.; Llorca, M.; Pérez, S.; Barceló, D.; Wilhelm, M.; Holzer, J. *Polyfluorinated Chemicals and Transformation Products*; Knepper, T. P., Lange, F. T., Eds.; The Handbook of Environmental Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012; Vol. 17. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-21872-9>.
- (24) Wolf, G. Formaldehyde in Leather: Causes and Avoidance. *World Leather* **2002**, *15* (1), 46–52.
- (25) European Chemicals Agency. Comprendre REACH <https://echa.europa.eu/fr/regulations/reach/understanding-reach> (accessed 2021 -01 -20).
- (26) Jones, K. C.; de Voogt, P. Persistent Organic Pollutants (POPs): State of the Science. *Environ. Pollut.* **1999**, *100*, 209–221. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00098-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00098-6).
- (27) Hung, H.; Katsoyiannis, A. A.; Guardans, R. Ten Years of Global Monitoring under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs): Trends, Sources and Transport Modelling. *Environ. Pollut.* **2016**, *217*, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.035>.
- (28) Foth, H.; Hayes, A. Concept of REACH and Impact on Evaluation of Chemicals. *Hum. Exp. Toxicol.* **2008**, *27*, 5–21. <https://doi.org/10.1177/0960327107087801>.
- (29) Astruc, C. Allergènes Dans Les Cuirs et Textiles : Prochaine Cible de REACH. *CTC Entrep.* **2020**, No. 3, 14–16.
- (30) TFL. Restricted substances in leather https://www.tfl.com/media/03-tfl.com-and-intranet/salesfolder/sf_tfl_eco_tec_restricted_substances_in_leather_glo_en.pdf.
- (31) Lederfabrik Josef Heinen GmbH & Co. KG. List of restricted substances in our leather https://www.heinen-leather.de/site/assets/files/1236/rs-list_terra-care_en.pdf.
- (32) Srivastava, S.; Ahmad, A. H.; Thakur, I. S. Removal of Chromium and Pentachlorophenol from Tannery Effluents. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98* (5), 1128–1132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.011>.
- (33) Fasth, I. M.; Ulrich, N. H.; Johansen, J. D. Ten-Year Trends in Contact Allergy to Formaldehyde and Formaldehyde-Releasers. *Contact Dermatitis* **2018**, *79* (5), 263 à 269. <https://doi.org/10.1111/cod.13052>.
- (34) Commission regulation (EU) No 605/2014 of 5 June 2014 amending, for the purposes of introducing hazard and precautionary statements in the Croatian language and its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures. *Off. J. Eur. Union* **2014**, *14*.
- (35) Commission Européenne. Commission Directive (EU) 2019/1929 of 19 November 2019 Amending Appendix C to Annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council for the Purpose of Adopting Specific Limit Values for Chemicals Used in Certain Toys, as Regards Formaldehyde. *Off. J. Eur. Union* **2019**, *4*.
- (36) Modern Testing Services. GB Testing for Textile and Leather Products http://www.mts-global.com/upload/2018-02-15/GB_Testing_Booklet.pdf (accessed 2018 -12 -10).

- (37) Kirsch, P. *Modern Fluoroorganic Chemistry: Synthesis, Reactivity, Applications*; John Wiley & Sons, 2006.
- (38) National Institute of Environmental Health Sciences. Perfluorinated Chemicals (PFCs) https://www.niehs.nih.gov/health/materials/perflourinated_chemicals_508.pdf (accessed 2018 -12 -18).
- (39) Webster, G. Potential Human Health Effects of Perfluorinated Chemicals (PFCs). *Natl. Collab. Cent. Environ. Health* **2010**, 10.
- (40) United States Environmental Protection Agency (EPA). Health Effects Support Document for Perfluorooctanoic Acid (PFOA). **2016**, 322.
- (41) Rainieri, S.; Conlledo, N.; Langerholc, T.; Madorran, E.; Sala, M.; Barranco, A. Toxic Effects of Perfluorinated Compounds at Human Cellular Level and on a Model Vertebrate. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, 104, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.041>.
- (42) Commission Européenne. Règlement (UE) n° 757/2010 de la Commission du 24 août 2010 modifiant les annexes I et III du règlement (CE) n° 850/2004 du Parlement européen et du Conseil concernant les polluants organiques persistants. *J. Off. Union Eur.* 8.
- (43) Commission Européenne. RÈGLEMENT (UE) 2017/ 1000 DE LA COMMISSION - du 13 juin 2017 - modifiant l'annexe XVII du règlement (CE) no 1907/ 2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), en ce qui concerne l'acide pentadécafluorooctanoïque (PFOA), ses sels et les substances apparentées au PFOA. *J. Off. Union Eur.* **2017**, 5.
- (44) Journal officiel de l'Union européenne. Règlement (UE) 2021/1297 de La Commission Du 4 Août 2021 Modifiant l'annexe XVII Du Règlement (CE) No 1907/2006 Du Parlement Européen et Du Conseil En Ce Qui Concerne Les Acides Perfluorocarboxyliques d'une Longueur de Chaîne Comprise Entre 9 et 14 Atomes de Carbone (PFCA En C9-C14), Leurs Sels et Les Substances Apparentées Aux PFCA En C9-C14. 2021.
- (45) Oeko-Tex® - International Association for Research and Testing in the Field of Textile and Leather Ecology. Standard 100 by Oeko-Tex https://www.oeko-tex.com/importedmedia/downloadfiles/STANDARD_100_by_OEKO-TEX_R_-_Standard_en.pdf (accessed 2020 -03 -19).
- (46) Kleban, M. Free Formaldehyde - a Practical Guide. *Leather international*. 2003, pp 26–29.
- (47) Bône, S.; Vautrin, C.; Barbesant, V.; Truchon, S.; Harrison, I.; Geffroy, C. Microencapsulated Fragrances in Melamine Formaldehyde Resins. *CHIMIA* **2011**, 65 (3), 177–181. <https://doi.org/10.2533/chimia.2011.177>.
- (48) Stoppa, E. Formaldehyde in Leathergoods: Remedies and Solutions. *Leather international*. 2005, pp 24–26.
- (49) Ma, S.; Walker, M.; Bartle, M. Formaldehyde Analysis : Test Methods and Results. *World Leather*. May 2007, pp 27–31.
- (50) Gryllaki-Berger, M.; Mugny, Ch.; Perrenoud, D.; Pannatier, A.; Frenk, E. A Comparative Study of Formaldehyde Detection Using Chromotropic Acid, Acetylacetone and HPLC in Cosmetics and Household Cleaning Products. *Contact Dermatitis* **1992**, 26 (3), 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1992.tb00284.x>.
- (51) Birkeland, M. J.; Lorenz, L.; Wescott, J. M.; Frihart, C. R. Determination of Native (Wood Derived) Formaldehyde by the Desiccator Method in Particleboards Generated

- during Panel Production. *Holzforschung* **2010**, *64* (4). <https://doi.org/10.1515/hf.2010.070>.
- (52) Xuzheng, Y.; Xuechuan, W.; Weina, L.; Sujie, J. Research on Formaldehyde Emission Characteristics of Leather with Porous Structure by Sealed Jar Method. *Soc. Leather Technol. Chem. J.* **2017**, *101* (6), 284–289.
- (53) Yoshikawa, K.; Morita, T.; Ishikawa, T.; Sakuragawa, A. Determination of Formaldehyde in Seawater Samples by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection Using an Acetylacetone Derivatization. *Bull. Soc. Sea Water Sci. Jpn.* **2011**, *65* (3), 8.
- (54) Font, J.; Viera, S.; Rius, T.; Reyes, M.; Jorba, M.; Verdú, E.; Juárez, M. A.; Cuadros, S.; Marsal, A. Inter-Laboratory Study on Formaldehyde Determination by HPLC. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **2008**, *103*, 53–61.
- (55) Nie, Y.; Coban, L.; Li, S.; Kleine-Benne, E. Automated Determination of Formaldehyde Emissions from Materials by On-Sorbent Derivatization and Thermal Desorption GC/MS. *GERSTEL Appl. Note* **2018**, No. 197, 14.
- (56) Lampard, G. Formaldehyde - the Final Straw ? *Leather International*. November 2001, pp 65–68.
- (57) Nash, T. The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction. *Biochem. J.* **1953**, *55* (3), 416–421. <https://doi.org/10.1042/bj0550416>.
- (58) Zhao, Y.; Guo, D.; Huang, Z.; Chang, W.; Qi, X.; Li, Z. Proficiency Testing for Determination of Formaldehyde in Leather in China. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *82*, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.014>.
- (59) Blanc, N.; Humbert, N.; Cannot, J.-C. HPLC versus Spectrophotometry for the Quantitation of Trace Amounts of Formaldehyde in Leathers. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **2009**, *104*, 1–8.
- (60) Wang, Y.; Sun, X.; Han, Q.; James, T. D.; Wang, X. Highly Sensitive and Selective Water-Soluble Fluorescent Probe for the Detection of Formaldehyde in Leather Products. *Dyes Pigments* **2021**, *188* (109175), 7.
- (61) Pereira, T. M.; Kümmerle, A. E. Hydrazone-Based Small-Molecule Chemosensors. In *Computational Biology and Chemistry*; 2020.
- (62) Cuadros, S.; Font, J.; Izquierdo, F.; Cuadros, R. M.; Ollé, L.; Marsal, A. Determination of Formaldehyde Content in Leather Standard EN ISO 17226 (Parts 1 and 2), Revision and Possible Improvements. *Soc. Leather Technol. Chem. J.* **2016**, *100*, 167–174.
- (63) Meng, X.-L.; Nie, Y.; Sun, J.; Cheng, W.-G.; Wang, J.-Q.; He, H.-Y.; Zhang, S.-J. Functionalized Dicyandiamide–Formaldehyde Polymers as Efficient Heterogeneous Catalysts for Conversion of CO₂ into Organic Carbonates. *Green Chem.* **2014**, *16* (5), 2771–2778. <https://doi.org/10.1039/C3GC42331J>.
- (64) ANSES. Guide de validation des méthodes d'analyses https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf.
- (65) Désenfant, M.; Priel, M.; Rivier, C. Évaluation Des Incertitudes Des Résultats d'analyse. *Tech. Ing.* **2005**, No. P105.
- (66) Wellington Laboratories. Reference and Handling Guide: Perfluoroalkyl Compounds. 2012.
- (67) Smith, J. W. N.; Beuthe, B.; Dunk, M.; Demeure, S.; Carmona, J. M. M.; Medve, A.; Spence, M. J.; Pancras, T.; Schrauwen, G.; Held, T.; Baker, K.; Ross, I.; Slenders, H. Environmental fate and effects of poly-and perfluoroalkyl substances (PFAS) https://www.concawe.eu/wp-content/uploads/2016/06/Rpt_16-8.pdf.
- (68) Journal officiel de l'Union européenne. Coefficient de Partage (n-Octanol/Eau), Méthode HPLC (Chromatographie En Phase Liquide à Haute Performance). **2016**.

- (69) Eichler, C. M. A.; Little, J. C. A Framework to Model Exposure to Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Indoor Environments. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2020**, *22* (3), 500–511. <https://doi.org/10.1039/C9EM00556K>.
- (70) United States Environmental Protection Agency (EPA). CompTox Chemicals Dashboard <https://comptox.epa.gov/dashboard/>.
- (71) Interstate Technology Regulatory Council. PFAS - Per- and Polyfluoroalkyl Substances https://pfas-1.itrcweb.org/4-physical-and-chemical-properties/#4_1.
- (72) SGS. Physical and Chemical Properties of PFAS compounds https://www.sgs-ehsusa.com/wp-content/uploads/2018/09/Physical-and-Chemical-Properties-of-PFAS-compounds_vKFMH.pdf.
- (73) Vestergren, R.; Herzke, D.; Wang, T.; Cousins, I. T. Are Imported Consumer Products an Important Diffuse Source of PFASs to the Norwegian Environment? *Environ. Pollut.* **2015**, *198*, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.034>.
- (74) Wang, Z.; Xie, Z.; Möller, A.; Mi, W.; Wolschke, H.; Ebinghaus, R. Atmospheric Concentrations and Gas/Particle Partitioning of Neutral Poly- and Perfluoroalkyl Substances in Northern German Coast. *Atmos. Environ.* **2014**, *95*, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.06.036>.
- (75) Zhang, Y.; Wang, Y.; Tang, C.; Nie, J.; Xu, C. Development of Extraction Methods for the Analysis of Perfluorinated Compounds in Leather with High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. 2018, p 6.
- (76) Kotthoff, M.; Müller, J.; Jüriling, H.; Schlummer, M.; Fiedler, D. Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in Consumer Products. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22* (19), 14546–14559. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4202-7>.
- (77) Herzke, D.; Olsson, E.; Posner, S. Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) in Consumer Products in Norway – A Pilot Study. *Chemosphere* **2012**, *88*, 980–987. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.035>.
- (78) Pico, Y.; Blasco, C.; Farré, M.; Barceló, D. Occurrence of Perfluorinated Compounds in Water and Sediment of L’Albufera Natural Park (València, Spain). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2012**, *19*, 946–957. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0560-y>.
- (79) Wang, X. F.; Wang, Q.; Li, Z. G.; Huang, K.; Li, L. D.; Zhao, D. H. Determination of 23 Perfluorinated Alkylated Substances in Water and Suspended Particles by Ultra-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. Environ. Sci. Health Part A* **2018**, *53* (14), 1277–1283. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1528042>.
- (80) Enevoldsen, R.; Juhler, R. K. Perfluorinated Compounds (PFCs) in Groundwater and Aqueous Soil Extracts: Using Inline SPE-LC-MS/MS for Screening and Sorption Characterisation of Perfluorooctane Sulphonate and Related Compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1161–1172. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4066-0>.
- (81) Haug, L. S.; Salihovic, S.; Jogsten, I. E.; Thomsen, C.; van Bavel, B.; Lindström, G.; Becher, G. Levels in Food and Beverages and Daily Intake of Perfluorinated Compounds in Norway. *Chemosphere* **2010**, *80*, 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.023>.
- (82) Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; van Leeuwen, S. Tetrahydrofuran–Water Extraction, in-Line Clean-up and Selective Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Quantitation of Perfluorinated Compounds in Food at the Low Picogram per Gram Level. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 5913–5921. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.032>.
- (83) Zacs, D.; Bartkevics, V. Trace Determination of Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid in Environmental Samples (Surface Water, Wastewater, Biota,

- Sediments, and Sewage Sludge) Using Liquid Chromatography – Orbitrap Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1473*, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.060>.
- (84) Biotage. Method Development Guidelines: Solid Phase Extraction Using ISOLUTE ENV+ for the Extraction of Aqueous Samples. **2020**, 3.
- (85) Waters. Taking the Complexity out of SPE Method Development <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005685en.pdf>.
- (86) Anumol, T.; Stevens, J.; Xu, X. Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) in Biological Fluid Using a Novel Lipid Removing Sorbent and LC-MS/MS. *Appl. Note Environ. Agil.* **8**.
- (87) Sigma-Aldrich. Solid Phase Extraction Products <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/581/355/t402150.pdf>.
- (88) Sacco, L. Quand Le Graphite Devient Un Semi-Conducteur. *Futura Sci.* **2009**.
- (89) Wang, L.; Sun, H.; Yang, L.; He, C.; Wu, W.; Sun, S. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Perfluoroalkyl Carboxylic Acids and Perfluorooctanesulfonate in Bivalve Shells: Extraction Method Optimization. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.074>.
- (90) Delinsky, A. D.; Strynar, M. J.; McCann, P. J.; Varns, J. L.; McMillan, L.; Nakayama, S. F.; Lindstrom, A. B. Geographical Distribution of Perfluorinated Compounds in Fish from Minnesota Lakes and Rivers. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 2549–2554. <https://doi.org/10.1021/es903777s>.
- (91) Yeung, L. W. Y.; Taniyasu, S.; Kannan, K.; Xu, D. Z. Y.; Guruge, K. S.; Lam, P. K. S.; Yamashita, N. An Analytical Method for the Determination of Perfluorinated Compounds in Whole Blood Using Acetonitrile and Solid Phase Extraction Methods. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 4950–4956. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.070>.
- (92) Wu, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Zhao, Y.; Guo, F.; Liu, J.; Cai, Z. Perfluorinated Compounds in Seafood from Coastal Areas in China. *Environ. Int.* **2012**, *42*, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.04.007>.
- (93) Zhu, P.; Ling, X.; Liu, W.; Kong, L.; Yao, Y. Simple and Fast Determination of Perfluorinated Compounds in Taihu Lake by SPE-UHPLC–MS/MS. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1031*, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.031>.
- (94) Wolf, S. T.; Reagen, W. K. Method for the Determination of Perfluorinated Compounds (PFCs) in Water by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). *Anal. Methods* **2011**, *3*, 1485–1493. <https://doi.org/10.1039/c1ay05190c>.
- (95) Martín, J.; Rodríguez-Gómez, R.; Zafra-Gómez, A.; Alonso, E.; Vilchez, J. L.; Navalón, A. Validated Method for the Determination of Perfluorinated Compounds in Placental Tissue Samples Based on a Simple Extraction Procedure Followed by Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Talanta* **2016**, *150*, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.020>.
- (96) Kato, K.; Basden, B. J.; Needham, L. L.; Calafat, A. M. Improved Selectivity for the Analysis of Maternal Serum and Cord Serum for Polyfluoroalkyl Chemicals. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (15), 2133–2137. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.051>.
- (97) Yang, L.; Jin, F.; Zhang, P.; Zhang, Y.; Wang, J.; Shao, H.; Jin, M.; Wang, S.; Zheng, L.; Wang, J. Simultaneous Determination of Perfluorinated Compounds in Edible Oil by Gel-Permeation Chromatography Combined with Dispersive Solid-Phase Extraction

- and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 8364–8371. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03903>.
- (98) Jahnke, A.; Huber, S.; Temme, C.; Kylin, H.; Berger, U. Development and Application of a Simplified Sampling Method for Volatile Polyfluorinated Alkyl Substances in Indoor and Environmental Air. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1164* (1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.068>.
- (99) Lacina, O.; Hradkova, P.; Pulkrabova, J.; Hajslova, J. Simple, High Throughput Ultra-High Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Trace Analysis of Perfluorinated Alkylated Substances in Food of Animal Origin: Milk and Fish. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4312–4321. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.061>.
- (100) Powley, C. R.; George, S. W.; Ryan, T. W.; Buck, R. C. Matrix Effect-Free Analytical Methods for Determination of Perfluorinated Carboxylic Acids in Environmental Matrixes. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (19), 6353–6358. <https://doi.org/10.1021/ac0508090>.
- (101) Waters. SPE for Environmental Samples <https://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/SPEforEnvSamples.pdf>.
- (102) McCullagh, M.; Hodgkinson, M.; Dillon, L.; van Bavel, B.; Burgess, J. A.; Ericson Jogsten, I. Determination and Characterization of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS's) in Environmental Samples Using UPLC Ion Mobility MS. *Appl. Note Waters* **2014**, *9*.
- (103) Bjerregaard-Olesen, C.; Bossi, R.; Bech, B. H.; Bonfeld-Jørgensen, E. C. Extraction of Perfluorinated Alkyl Acids from Human Serum for Determination of the Combined Xenoestrogenic Transactivity: A Method Development. *Chemosphere* **2015**, *129*, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.071>.
- (104) Zhou, Y.; Lian, Y.; Sun, X.; Fu, L.; Duan, S.; Shang, C.; Jia, X.; Wu, Y.; Wang, M. Determination of 20 Perfluoroalkyl Substances in Greenhouse Vegetables with a Modified One-Step Pretreatment Approach Coupled with Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry(UPLC-MS-MS). *Chemosphere* **2019**, *227*, 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.034>.
- (105) Hanari, N.; Itoh, N.; Ishikawa, K.; Yarita, T.; Numata, M. Variation in Concentration of Perfluorooctanoic Acid in Methanol Solutions during Storage. *Chemosphere* **2014**, *94*, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.040>.
- (106) Lahey, C. M.; Ting, G. W. E.; Yeong, H. X. C.; Jackie, J.; Chong, C. M.; Loo, L. C. Fast and Accurate Analysis of Fluorotelomer Alcohols and Acrylates using Triple Quadrupole GC-MS/MS https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/applications/posters/10006/apo216047.pdf.
- (107) Yeong, C.; Loo, L. C.; Sakamoto, Y. Analyses of PFOS and PFOA Precursors in Textile Products Using EI-MRM and PCI-SIM Method <https://gcms.cz/labrulez-bucket-strapih3hsa3/paper/jpo218053.pdf>.
- (108) Posner, S. Analytical Method for PFOA (and Higher Homologues) in Articles - Challenges and Current Status. *Swerea IVF* *15*.
- (109) Ericson Jogsten, I. Per- and polyfluorinated compounds (PFC) analysis of various matrices using UPLC-MS/MS and GC-MS/MS https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/SW_NMS2011_Food_and_env_38_Ingrid_Ericson.pdf.
- (110) Lee, J. X.; Lee, S. A.; Lim, T. Y. A.; Liw, W. T.; Xing, J.; Zhan, Z. Analysis of Perfluorooctane Sulfonamidoethanols (FOSEs) and Fluorotelomer Alcohols (FTOHs) in Textiles by LC/MS/MS

- https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/applications/application_note/13744/apo120021.pdf.
- (111) Li, D.; Liang, S.-H.; Steimling, J.; Kahler, T.; Connolly, P. Perfluorinated Compounds (PFCs) on Raptor C18 (1.8 μm) https://ez.restek.com/images/cgram/lc_ev0540.pdf.
- (112) Van der Veen, I.; Weiss, J. M.; Hanning, A.-C.; de Boer, J.; Leonards, P. E. G. Development and Validation of a Method for the Quantification of Extractable Perfluoroalkyl Acids (PFAAs) and Perfluorooctane Sulfonamide (FOSA) in Textiles. *Talanta* **2016**, *147*, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.021>.
- (113) Shoemaker, J. A.; Grimmett, P. E.; Boutin, B. K. Method 537. Determination of Selected Perfluorinated Alkyl Acids in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). *EPA* **2009**, No. version 1.1.
- (114) Chatellier, C.; Lestremau, F. Analyse de composés perfluorés dans l'eau naturelle par extraction sur phase solide en ligne couplée à de la chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse en tandem. *AQUAREF* **2013**, 55.
- (115) Shimadzu. Analysis of PFCs in Environmental Water Using Triple Quadrupole LC/MS/MS [LCMS-8030]. *Application News*.
- (116) Forchi, O. *Mise Au Point d'une Méthode de Purification Pour Le Dosage Des Perfluoralkyles Dans Les Cuirs (Document Interne)*; Rapport de stage; CTC, 2011; p 25.
- (117) Interchim. Extraction sur phase solide <https://www.interchim.fr/cat/A62-A105-Extraction-SPE-Part1.pdf>.

Liste des tableaux

Tableau 1 : résultats d'un essai inter laboratoire pour l'analyse du formaldéhyde suivant la norme ISO 17226-1. Tableau des moyennes, écarts types de répétabilité et reproductibilité. Adapté de ⁵⁴	34
Tableau 2 : comparaison des concentrations en formaldéhyde obtenues, du temps et des limites de détection avec la nouvelle méthode FAB-1 avec la méthode au DNPH et avec celle à l'acétylacétone, adaptée de ⁶⁰	37
Tableau 3 : les familles de PFCs étudiées ⁶⁶	68
Tableau 4 : propriétés physico-chimiques de PFCs appartenant à des familles différentes (est : estimation, exp : résultats expérimentaux, np : non précisé).....	70
Tableau 5 : différentes conditions d'extraction des PFCs dans les cuirs.....	72
Tableau 6 : structures et mécanismes de rétention des différents adsorbants SPE pour la purification et/ou concentration précédant l'analyse des PFCs	74
Tableau 7 : différentes SPE utilisées pour la purification et/ou la concentration des PFCs. Abréviations : AA : Acide Acétique Ac : Acétate, AcAm : Acétate d'ammonium, ACN : Acétonitrile, AF : Acide formique, H ₂ O : eau, MeOH : Méthanol, MTBE : Méthyl Tert-Butyl Ether et NH ₄ OH : ammoniacque	75
Tableau 8 : taux de recouvrement pour un saumon dopé purifié par SPE WAX puis SPE Envi Carb. Adapté de ⁸²	79
Tableau 9 : détections utilisées pour la quantification des PFCs après leurs séparations par chromatographie liquide.....	86
Tableau 10 : temps de rétention et transitions MRM pour chaque PFC et étalon interne	95
Tableau 11 : nouveaux étalons internes et leur structure chimique	116
Tableau 12 : paramètres de la source électrospray en mode négatif	123
Tableau 13 : deux étalons internes, le PFOS et PFOA marqués au carbone 13 (MPFOA et MPFOS) associés aux familles de PFCs	125
Tableau 14 : quantification des PFCs avec 9 étalons internes (incluant les 7 nouveaux étalons internes)	125
Tableau 15 : présentations des cuirs dopés.....	127

Liste des figures

Figure 1 : coupe schématique d'une peau de bovin, adaptée de ⁹	17
Figure 2 : aspect schématique d'une peau de bovin ⁹	18
Figure 3 : rupture du pont disulfure dans la cystine de la kératine, adaptée de ⁸	19
Figure 4 : logigramme des étapes de la fabrication du cuir avec des exemples de produits chimiques pouvant être utilisés, adapté de ¹⁶	23
Figure 5 : formaldéhyde dans le procédé de fabrication du cuir avec en bleu les principales étapes où le formaldéhyde peut être utilisé.....	27
Figure 6 : libération du formaldéhyde par hydrolyse de la résine mélamine, adaptée de ⁴⁷	27
Figure 7 : réaction entre le formaldéhyde et l'acide chromotrope menant à la formation du dibenzoxanthylum monocationique ⁵¹	28
Figure 8 : relargage du formaldéhyde dans le système scellé, adapté de ⁵²	29
Figure 9 : Schéma réactionnel de la dérivation du formaldéhyde avec l'acétylacétone ⁵³	29
Figure 10 : schéma réactionnel de la dérivation du formaldéhyde avec le 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) ⁵⁵	30
Figure 11 : z scores des différents laboratoires pour la mesure du formaldéhyde dans les échantillons des cuirs A et B avec une méthode proche de la norme ISO 17226-2. En jaune les bornes pour un z score, en valeur absolue inférieur ou égal à 2 signifiant que les performances sont satisfaisantes. Adaptée de ⁵⁸	33
Figure 12 : chromatogrammes pour une solution de formaldéhyde (en haut) et une solution d'acétaldéhyde (en bas) dérivées au DNPH et analysées dans les conditions de la norme ISO 17226-1 :2019. La séparation est réalisée avec une colonne C18 (150 mm x 3,9 mm 5µm), avec un volume d'injection de 20 µL, à un débit de 1,0 mL/min, avec comme phase mobile l'acétonitrile et l'eau (60/40 v/v). La détection est effectuée à 350 nm. Adaptée de ⁵⁴	35
Figure 13 : comparaison de la teneur en formaldéhyde obtenue en LC-MS/MS par rapport à celle obtenue en LC-DAD pour 19 échantillons de cuirs. La séparation LC est réalisée avec une colonne Purospher® Star C18 (25 cm x 3 mm), un volume d'injection de 10 µL, une température de 30°C, un débit de 0,5 mL/min, une phase mobile composée d'acétonitrile et d'eau, un gradient qui commence par 50% en acétonitrile, atteint 66% en 12 min puis 90% après 3 min et maintient 90% en acétonitrile pendant 2 min. Pour la LC-DAD, une LC Agilent 1100S et un DAD Agilent 1100 sont utilisés, le formaldéhyde dérivé est détecté à 360 nm avec une longueur d'onde de référence à 540 nm. Pour la LC-MS/MS, une LC Agilent 1200 est couplée à un triple quadripôle Agilent 6410 avec une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique en mode négatif. Les transitions MRM de	

quantification et de qualification sont 205->132,8 et 205->76,2 respectivement. Les concentrations sont exprimées en mg/kg dans des échelles logarithmiques ⁵⁹	36
Figure 14 : réaction entre le formaldéhyde et une sonde basée sur la fluorescence ⁶⁰ . PET correspond au transfert d'électrons photo-induit.	36
Figure 15 : teneurs en formaldéhyde obtenues avec la norme ISO 17226-2 après une extraction avec agitation magnétique ou linéaire ⁶²	38
Figure 16 : teneurs en formaldéhyde en fonction du temps de réaction avec le DNPH ⁶²	39
Figure 17 : structure de la résine dicyandiamide ⁶³	39
Figure 18 : spectre infrarouge de la résine de tannage (en violet), de l'extrait de cuir obtenu avec la norme ISO 17226-1 (en rouge) et celui du formaldéhyde (en gris), adapté de ⁴⁶	40
Figure 19 : résumé du mode opératoire (inspiré de la norme ISO 17226-1 2019) pour quantifier le formaldéhyde dans un échantillon de cuir avec la LC-DAD Agilent 1290	41
Figure 20 : comparaison des teneurs en formaldéhyde obtenues avec la norme ISO-17226-1 après le début de la dérivation, pendant l'intervalle de temps défini dans la norme (entre 1h et 3h) et avec la nouvelle méthode (dérivation au DNPH acétonitrile en 3h à 50°C puis analyse). Les incertitudes correspondent à deux fois les écarts types mesurés avec trois mesures (trois dérivations indépendantes).	59
Figure 21 : comparaison des teneurs en formaldéhyde pour différents cuirs analysés avec la norme ISO 17226-1 : 2019 en fin de dérivation (valeur normalisée à 1) et après 3h de dérivation. Les teneurs après 3h de dérivation sont normalisées par rapport à la teneur en début de dérivation et sont représentées par des ronds dont la couleur indique leur teneur en formaldéhyde.....	61
Figure 22 : comparaison de la teneur en formaldéhyde obtenue avec la norme ISO 17226-1:2019 après le début de la dérivation (valeur normalisée à 1) et avec la nouvelle méthode (DNPH dans l'acétonitrile dérivation pendant 3h à 50°C). Les teneurs obtenues avec la nouvelle méthode sont normalisées par rapport à la teneur de la norme en début de dérivation et sont représentées par des ronds dont la couleur indique leur teneur en formaldéhyde.....	63
Figure 23 : comparaison de la teneur en formaldéhyde en fin de dérivation dans les conditions de la nouvelle méthode (3h à 50°C avec le DNPH dans l'acétonitrile) et après attente sur le passeur (environ 7h d'attente). La teneur en formaldéhyde après 3h de dérivation est normalisée à 1 (ligne bleue) et encadrée de bornes d'incertitudes à 20%. Les teneurs en formaldéhyde après 7h d'attente sont normalisées par rapport à la valeur à 3h et sont représentées par des ronds dont la couleur indique leur teneur en formaldéhyde.	64
Figure 24 : Moyennes des teneurs en formaldéhyde obtenues par les laboratoires pour chaque cuir. L'incertitude correspond à 2 fois l'écart type de l'ensemble des teneurs mesurées pour un échantillon de cuir.....	65

Figure 25 : z scores pour les 8 laboratoires et pour les 7 cuirs analysés avec la nouvelle méthode	66
Figure 26 : les différentes étapes menant à la quantification des PFCs	71
Figure 27 : comparaison des rendements obtenus pour la purification par SPE WAX (60 mg) ou HLB (60 mg) de 100 mL d'eau dopé. Pour la SPE WAX, le conditionnement est réalisé avec du méthanol avec 0,1% d'ammoniaque, du méthanol et de l'eau. Le lavage utilise une solution tampon à pH 4,5, de l'eau et du méthanol, l'élution est mise en œuvre avec du méthanol contenant 0,1% d'ammoniaque. Pour la SPE HLB, il est uniquement précisé que le lavage ne contient pas plus de 10% de méthanol pour empêcher la perte des PFCs à chaîne courte. Adaptée de ⁷⁹	78
Figure 28 : mode opératoire d'une extraction et purification QuEChERS pour l'analyse de PFCAs et PFASs dans les légumes verts. Abréviations : GCB : carbone noir graphité, MgSO ₄ : sulfate de magnésium, MWCNT : nanotubes de carbone à parois multiples, PSA : amines primaires et secondaires. Adaptée de ¹⁰⁴	80
Figure 29 : mise en œuvre d'un QuEChERS colonne (adsorbant SPE) pour l'analyse de PFCAs et PFASs dans les légumes verts ¹⁰⁴	80
Figure 30 : comparaison des rendements (en %) pour un échantillon de poireaux dopé et purifié avec différentes méthodes incluant le QuEChERS colonne A (90 mg de amines primaires et secondaires, 15 mg de nanotubes de carbone à parois multiples), le QuEChERS colonne B (même composition que la colonne A, 80 mg de C18 et 60 mg de carbone noir graphité) la SPE WAX et un QuEChERS suivant un mode opératoire habituel ¹⁰⁴	81
Figure 31 : chromatogramme MRM de l'ordre d'élution des FOSAs, FTAs et des FOSEs. L'étalon interne est le naphthalène-D ₈ (Naph-D ₈). La colonne GC est la SH-Rtx™-200 (0,32 mm x 30 m 0,5 µm). L'injection de 2 µL est en mode splitless. Le gradient de température commence à 80°C puis augmente de 30°C par minute pour atteindre 260°C qui est maintenu pendant une minute. Le gaz vecteur est l'hélium à une vitesse constante de 48,7 cm/s et avec une pression initiale de 150 kPa pendant 1 minute. Le détecteur est un triple quadripôle avec une source à ionisation par impact électronique ¹⁰⁷	82
Figure 32 : chromatogrammes d'un point de gamme à 5 ng/mL obtenu avec une colonne GC SH-Stabilwax (0,25 mm x 30 m 0,25 µm). La détection est un triple quadripôle avec une source à ionisation par impact électronique en acquisition MRM. L'étalon interne est le MFBET (2-Perfluorobutyl-[1,1,2,2-2H ₄]-éthanol). L'injection de 1 µL est réalisée en mode splitless. Le gradient commence avec 40°C pendant 1 min puis une augmentation de 20°C par minute jusqu'à 150°C suivi d'une augmentations de 30°C par minute jusqu'à 240°C maintenu pendant 2 minutes. La vitesse du gaz vecteur est de 43,4 cm/s et une pression initiale de 315 kPa est appliquée pendant 1,5 min. Les pics en bleu clair correspondent aux transitions MRM de quantification, les pics en rose ou en bleu foncé aux transitions de qualification ¹⁰⁶	83

Figure 33 : chromatogramme MRM de 23 PFCs pour un échantillon d'eau dopé à 0,5 µg/L. Colonne LC Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm 2.6 µm), phase mobile avec une solution d'acétate d'ammonium à 5 mM et de l'acétonitrile. Le gradient commence par 10% d'acétonitrile, monte jusqu'à 90% d'acétonitrile en 3 min et maintient 90% pendant 1,2 min. Le débit est de 0,3 mL/min. La détection est réalisée avec un triple quadripôle avec une source électrospray en mode négatif. Légende 1 : PFBA, 2 : PFPeA, 3 : PFHxA, 4 : PFHpA, 5 : PFOA, 6 : PFNA, 7 : PFDA, 8 : PFUnA, 9 : PFDoA, 10 : PFTrA, 11 : PFTeA, 12 : Perfluorohexadecanoicacid PFHxDA, 13 : Perfluorooctadecanoicacid PFODA, 14 : PFBS, 15 : PFHxS, 16 : PFHpS, 17 : PFOS, 18 : PFDS, 19 : PFOSA, 20 : N-MeFOSA, 21 : N-EtFOSA, 22 : N-MeFOSE, 23 : N-EtFOSE⁷⁹ 84

Figure 34 : chromatogramme MRM obtenu avec une colonne LC Raptor C18 (2,1 x 50 mm 1,8 µm), avec comme phase mobile une solution d'acétate d'ammonium à 5 mM et du méthanol. Le gradient commence avec 20% en méthanol et atteint 95% après 6 min, puis est maintenu à 95% pendant 0,50 min. Le débit est de 0,4 mL/min. La détection MS/MS est en mode MRM avec une source électrospray en mode négatif. Légende : 1 PFBA, 2 PFPeA, 3 PFBS, 4 4:2FTS, 5 PFHxA, 6 Perfluoropentanesulfonic acid (PFPeS), 7 PFHpA, 8 PFHxS, 9 2-Perfluorohexyl ethanoic acid (FHEA), 10 6:2 FTS, 11 PFOA, 12 PFHpS, 13 PFNA, 14 PFOS, 15 2-Perfluorooctyl ethanoic acid (FOEA), 16 8:2 FTS, 17 PFDA, 18 Perfluorononanesulfonic acid (PFNS), 19 N-methyl perfluorooctanesulfonamidoaceticacid (N-MeFOSAA), 20 PFDS, 21 N-ethyl perfluorooctanesulfonamidoaceticacid (N-EtFOSAA), 22 PFOSA, 23 PFUnA, 24 2-Perfluorodecyl ethanoic acid (FDEA), 25 PFDoA, 26 10:2 FTS, 27 PFTrA, 28 N-MeFOSA, 29 N-MeFOSE, 30 PFTeA, 31 N-EtFOSA, 32 N-EtFOSE, 33 Perfluorohexadecanoicacid (PFHxDA), 34 Perfluorooctadecanoicacid (PFODA)¹¹¹ 84

Figure 35 : chromatogramme d'un point de gamme de PFCs à 1 ng/mL pour une colonne LC Fluorosep RP Octyl (2,1 mm 15 cm 5 µm) et comme colonne de garde Waters Symmetry C18 (3,9 x 20 mm 5 µm). La phase mobile est une solution de formate d'ammonium à 6,3 mM à un pH de 4 et du méthanol. Le débit est de 0,3 mL/min Le gradient commence par 35% de méthanol pendant 2 min puis augmente linéairement jusqu'à 95% en 53 min pour atteindre ensuite 100% en 10 min. La détection est réalisée avec en mode MRM avec un triple quadripôle avec une source électrospray en mode négatif⁸² 85

Figure 36 : installation d'une colonne de délai. Adaptée de¹¹⁵ 89

Figure 37 : séparation du PFOA à 1 000 ppt et d'une impureté du PFOA à des temps de rétention différents grâce à l'ajout d'une colonne de délai Develosil Packed Column C30-UG-5 (4,0 mm x 35 mm) entre le mélangeur et la boucle d'injection. Séparation LC avec une colonne Shim-pack FC-ODS (2,0 mm x 150 mm 3 µm), avec une solution du formate d'ammonium à 5 mM et de l'acétonitrile comme phase mobile, avec un gradient commençant à 25% d'acétonitrile et atteignant 85% en 20 min et avec un débit de 0,2 mL/min. La détection en mode MRM est réalisée avec un triple quadripôle avec une source électrospray en mode négatif¹¹⁵ 89

Figure 38 : chromatogramme d'un point de gamme à 10 µg/L avec en noir TIC MRM et en couleurs les transitions MRM de quantification des PFCs. La colonne Agilent est InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 150 x 2,1 x 2,7 µm, la phase mobile est constituée d'une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM et de méthanol et le débit est de 0,3 mL/min. La détection est réalisée avec le triple quadripôle Agilent 6470 LC/TQ avec une source électrospray en mode négatif	92
Figure 39 : simulation du chromatogramme optimal pour les PFCs proposée par le logiciel Osiris. Le facteur de rétention a été fixé entre 0,5 et 15 min et la résolution demandée est de 1,5.	93
Figure 40 : TIC MRM correspondant au point de gamme à 10 µg/L (préparé dans 25% d'eau et 75% de méthanol) avec la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 150 x 2,1 mm 2,7µm en utilisant le gradient optimal proposé par le logiciel Osiris qui commence par 54% de méthanol (46% d'une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM) et atteint 91,33% de méthanol en 6,91min. La détection est réalisée avec le triple quadripôle Agilent 6470 LC/TQ avec une source électrospray en mode négatif.....	94
Figure 41 : masse de 100 cm ² de cuirs pour 35 cuirs différents, valeur moyenne et incertitudes (correspondant à 2 fois l'écart type).....	97
Figure 42 : TIC MRM correspondant au point de gamme PFCs à 0,25 µg/L obtenu avec la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 150 x 2,1 mm 2,7 µm, avec comme phase mobile une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM et du méthanol. Le gradient commence par 30% de méthanol et atteint 90% en 14 minutes, un palier à 90% pendant 3,5 min est ensuite ajouté. La détection est réalisée avec le triple quadripôle Agilent 6470 LC/TQ avec une source électrospray en mode négatif.....	98
Figure 43 : taux de recouvrement des PFCAs en début de chromatogramme pour différents extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13).....	100
Figure 44 : taux de recouvrement des PFCAs en fin de chromatogramme pour différents extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13).....	101
Figure 45 : taux de recouvrement des PFASs pour différents extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13)	101
Figure 46 : taux de recouvrement des FTs pour différents extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13)	102
Figure 47 : taux de recouvrement des FOSEs pour différents extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13)	103
Figure 48 : taux de recouvrement des FOSAs pour différents extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13)	103
Figure 49 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 2 dilué ou non puis dopé à 10 µg/L.....	104
Figure 50 : fractions analysées pour l'optimisation de l'étape de lavage de la SPE WAX 150 mg.....	106

Figure 51 : taux de recouvrement pour la SPE WAX dans les lavages 1, 2 et la fraction d'élution avec une solution de lavage contenant 65% de méthanol et 2% d'acide formique. Elution avec 98% de méthanol et 2% d'ammoniaque.....	107
Figure 52 : taux de recouvrement pour la SPE WAX dans les lavages 1, 2 et la fraction d'élution avec une solution de lavage contenant 80% de méthanol et 2% d'acide formique. Elution avec 98% de méthanol et 2% d'ammoniaque.....	107
Figure 53 : fulls scans des extraits des cuirs 1 à 4 sans purification ou après SPE WAX.....	109
Figure 54 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 1 dopé à 10 µg/L et purifié ou non par SPE WAX	110
Figure 55 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 2 dopé à 10 µg/L et purifié ou non par SPE WAX	110
Figure 56 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 3 dopé à 10 µg/L et purifié ou non par SPE WAX	111
Figure 57 : taux de recouvrement pour l'extrait du cuir 4 dopé à 10 µg/L et purifié ou non par SPE WAX	111
Figure 58 : taux de recouvrement suite au dopage du cuir 1 après extraction dans différents solvants (méthanol, acétonitrile/eau 80/20 et acétonitrile).....	113
Figure 59 : fulls scans de l'extrait du cuir 1 non dopé extrait à 60°C pendant 2h au bain à ultrasons avec comme solvant d'extraction, le méthanol (en bleu) ou l'acétonitrile (en rouge) ou le mélange acétonitrile/eau 80/20 (en vert)	113
Figure 60 : taux de recouvrement suite au dopage du cuir 2 après extraction dans différents solvants (méthanol, acétonitrile/eau 80/20 et acétonitrile).....	115
Figure 61 : fulls scans de l'extrait du cuir 2 non dopé extrait à 60°C pendant 2h au bain à ultrasons avec comme solvant d'extraction, le méthanol (en bleu) ou l'acétonitrile (en rouge) ou le mélange acétonitrile/eau 80/20 (en vert)	115
Figure 62 : modification des étalons internes pour la quantification de l'extrait du cuir 1. En bleu avec MPFOS et MPFOA et en noir avec les nouveaux étalons internes.....	118
Figure 63 : modification de étalons internes pour la quantification de l'extrait du cuir 2. En rouge avec MPFOS et MPFOA et en noir avec les nouveaux étalons internes.....	118
Figure 64 : taux de recouvrement pour la quantification d'extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec deux étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13).....	119
Figure 65 : taux de recouvrement pour la quantification d'extraits de cuirs dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les nouveaux étalons internes	119

Figure 66 : taux de recouvrement des PFCs par ordre d'élution pour les extraits de cuirs 1 à 7 dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les neuf étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13 et les nouveaux)..... 121

Figure 67 : taux de recouvrement des PFCs par ordre d'élution pour les extraits de cuirs 8 à 13 dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les neuf étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13 et les nouveaux)..... 121

Figure 68 : taux de recouvrement des PFCs par ordre d'élution pour les extraits de cuirs CTC 1 à 8 dopés à 10 µg/L et quantifiés avec les neuf étalons internes (PFOS et PFOA marqués au carbone 13 et les nouveaux)..... 121

Annexes

Annexe 1 : Produits commerciaux utilisés pour la fabrication des cuirs

Produits chimiques	Caractéristiques	Fournisseurs
Pastozol BZ [®] conc.	Dégraissant	TRUMPLER, Worms, Allemagne
Trupowet pH [®]	Enzyme de trempe	TRUMPLER, Worms, Allemagne
Pastosol ED [®]	Enzyme	TRUMPLER, Worms, Allemagne
Truponat NF [®]	Agent qui aide au chaulage	TRUMPLER, Worms, Allemagne
Truponat HL [®]	Enzyme	TRUMPLER, Worms, Allemagne
Trupocal DE [®]	Déchaillant	TRUMPLER, Worms, Allemagne
Trupozym CCK [®]	Enzyme du confitage	TRUMPLER, Worms, Allemagne
Chromitan B [®]	Sulfate de chrome basique	LANXESS, Cologne, Allemagne
Feliderm MGO [®]	Magnésie pour basifier chrome	STAHL, Waalwijk, Pays-Bas
Supralan 67 [®]	Savon	ZSCHIMMER & SCHWARZ, Lahnstein, Allemagne
Neutralix A [®]	Neutralisant	K.J.QUINN, Graulhet, France
Coralon OT [®]	Dispersant pour colorant	STAHL, Waalwijk, Pays-Bas
Brun Sella Fast H [®]	Colorant métallifère base Chrome et Cobalt	TFL, Rheinfelden, Allemagne
Dolatan FHN [®]	Tanin synthétique phénol naphtalène sulfonique	ZSCHIMMER & SCHWARZ, Lahnstein, Allemagne
Actan RDC [®]	Résine dicyandiamide	ATC, Montanay, France
Pellastol ET [®]	Huile synthétique	ZSCHIMMER & SCHWARZ, Lahnstein, Allemagne
Pelgrassol MB [®]	Nourriture synthétique	ZSCHIMMER & SCHWARZ, Lahnstein, Allemagne
Trupotan R83 [®]	Résine acrylique	TRUMPLER, Worms, Allemagne
Rouge JRSN [®]	Colorant acide	STEINER SAS, Saint-Marcel, France
Rouge Sellaset H [®]	Rouge métallifère à base de chrome	TFL, Rheinfelden, Allemagne

Noir Sella Fast BC®	Noir métallifère à base de chrome	TFL, Rheinfelden, Allemagne
Bleu Sellaset HN®	Bleu métallifère à base de chrome	TFL, Rheinfelden, Allemagne
Mortanol 30®	Antifongique	ZSCHIMMER & SCHWARZ, Lahnstein, Allemagne
Supralan WE®	Emulsifiant	ZSCHIMMER & SCHWARZ, Lahnstein, Allemagne
Ensul BM 80®	Nourriture animal sulfité	ZSCHIMMER & SCHWARZ, Lahnstein, Allemagne

Annexe 2 : Mode opératoire des cuirs pour l'étude du formaldéhyde

Cuir pour l'étude du formaldéhyde : tannage chrome retannage avec ou sans résine		
Etapes	Produits	Pourcentages en masse
Tannage	Saumure 30°C	60%
	Pastozol BZ® conc. (dégraissant)	4%
	Saumure 30°C	100% x4
	Saumure 30°C	60°C
	Mortanol 30® (antiseptique)	0,1%
	Chromitan B® (Chrome)	7%
	Feliderm MGO® (magnésie pour basifier chrome)	0,7%
Eau 30°C	150% x 3	
Corroyage cuir (résine mélamine, dicyandiamide, résine)	Eau 45°C	150%
	Supralan WE® (émulsifiant)	0,2%
	Eau 30°C	50%
	Bicarbonate de soude	1%
	Eau 40°C	300%
	Eau 50°C	150%
	Tanin synthétique phénol naphtalène sulfonique (fournisseur confidentiel)	10% 10% 10%
Résine mélamine (fournisseur confidentiel)	6%	
Résine dicyandiamide (fournisseur confidentiel)	6%	

	Pellastol ET® (nourriture synthétique)	5%
	Ensul BM 80® (nourriture animal sulfité)	5%
	Acide formique	1% x 2

Annexe 3 : Norme ISO 23702-1 2018

La norme ISO 23702-1 de 2018 vise à quantifier des PFCs (3 PFAS, 11 PFCAs et PFOSA) dans le cuir. Son mode opératoire est récapitulé dans la figure ci-dessous. Pour le cuir verni, il est analysé sans son vernissage, s'il est possible de le retirer.

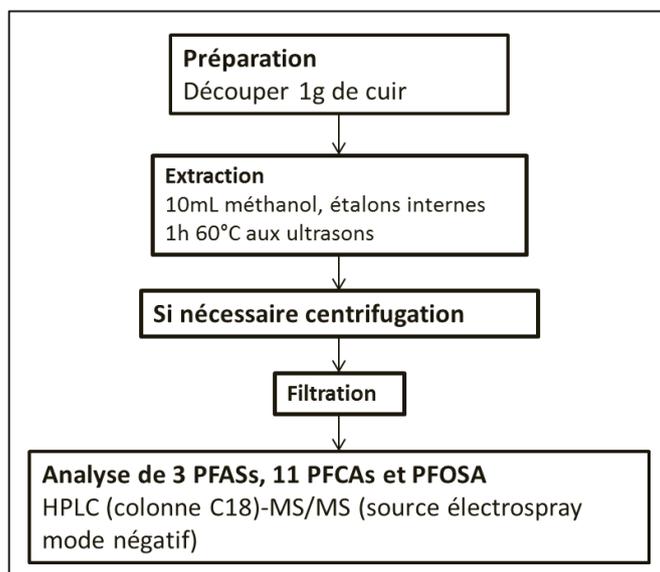


Figure : mode opératoire de la norme ISO 23702-1 :2018

L'extraction d'un échantillon de cuir découpé est réalisée en solvant organique dans un bain à ultrasons, avec l'ajout d'étalons internes comme le PFOS et le PFOA marqués au carbone 13.

Tableau : exemple de structures d'étalons internes PFOS et PFOA marqués (MPFOS et MPFOA)

Etalons internes	Structures chimiques
MPFOA	
MPFOS	

L'extrait est ensuite centrifugé, si nécessaire, filtré et analysé par LC-MS/MS en phase inverse. La phase mobile est une solution d'acétate d'ammonium à 10 mM et du méthanol. L'étalonnage est réalisé dans une gamme de concentrations s'étendant de 2,5 µg/L à 30 µg/L. Les résultats sont donnés en mg par kg de cuir.

Annexe 4 : Mode opératoire des cuirs pour l'étude des PFCs

Cuirs CTC : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 : agneau		
Etapas	Produits	Pourcentages en masse
Travail de rivière	Eau 30°C	150%
	Pastozol BZ® conc. (dégraissant)	0,1%
	Eau 30°C	150%
	Pastozol BZ® conc.	0,25%
	Trupowet pH® (enzyme de trempe)	0,8%
	Eau froide	50%
	Pastosol ED® (enzyme)	0,2%
	Truponat NF® (agent qui aide au chaulage)	1,5%
	Sulfhydrate de sodium	0,75%
	Chaux	1%
	Sulfure de sodium	1%
	Eau froide	100%
	Chaux	1,5%
	Sulfure de sodium	1,5%
	Truponat HL® (enzyme)	0,15%
Rincer	3 x 150%	
Tannage	Eau 30°C	150%
	Chaux	1,5%
	Eau 30°C	100%
	Trupocal DE® (déchaillant)	1%
	Métabisulfite de sodium	0,3%
	Pastozol BZ® conc. (dégraissant)	0,2%
	Trupocal DE®	2%

	<p>Eau 30°C</p> <p>Trupozym CCK® (enzyme du confitage)</p> <p>Eau 30°C</p> <p>Eau 30°C</p> <p>Sel</p> <p>Acide formique 85%</p> <p>Eau 30°C</p> <p>Acide sulfurique 95%</p> <p>Eau 30°C</p> <p>Chromitan B® (chrome)</p> <p>Feliderm MGO® (magnésie pour basifier chrome)</p> <p>Rincer</p>	<p>100%</p> <p>0,25%</p> <p>3 x 150%</p> <p>20%</p> <p>8%</p> <p>1%</p> <p>5%</p> <p>1%</p> <p>10%</p> <p>7%</p> <p>0,7%</p> <p>2 x 150%</p>
<p>Corroyage cuirs CTC 1, CTC 2, CTC 3 et CTC 4</p>	<p>Eau 40°C</p> <p>Supralan 67® (savon)</p> <p>Eau 30°C</p> <p>Eau 30°C</p> <p>Neutralix A® (neutralisant)</p> <p>Eau 30°C</p> <p>Eau 30°C</p> <p>Coralon OT® (dispersant pour colorant)</p>	<p>300%</p> <p>0,2%</p> <p>300%</p> <p>150%</p> <p>1,50%</p> <p>500% x 2</p> <p>50%</p> <p>2%</p>

	Brun Sella Fast H® (colorant métallifère base Chrome et Cobalt)	3%
	Quebracho (tannin végétal) ou Dolatan FHN® (tanin synthétique phénol naphthalène sulfonique) ou Actan RDC® (résine dicyandiamide)	5%
	Eau 60°C	150%
	Pellastol ET® (nourriture synthétique)	4%
	Pelgrassol MB® (nourriture synthétique)	4%
	Trupotan R83® (résine acrylique)	5%
	Acide formique	1,5% x2
	Eau 30°C	300%
	Eau 30°C	150%
Corroyage cuirs CTC 5, CTC 6, CTC 7 et CTC 8	Eau 40°C	300%
	Supralan 67® (savon)	0,20%
	Eau 30°C	300%
	Eau 30°C	150%
	Neutralix A® (neutralisant)	1,5%
	Eau 30°C	500% x 2
	Eau 30°C	50%
	Coralon OT® (dispersant pour colorant)	2%

	Rouge JRSN® (colorant acide) ou rouge Sellaset H® (rouge métallifère à base de chrome) ou noir Sella Fast BC® (noir métallifère à base de chrome) ou bleu Sellaset HN® (bleu métallifère à base de chrome)	3%
	Eau 60°C	150%
	Pellastol ET® (nourriture synthétique)	4%
	Pelgrassol MB® (nourriture synthétique)	4%
	Acide formique	1,5% x 2
	Eau 30°C	300%
	Eau 30°C	150%

Annexe 5 : chromatogramme obtenu en SIM d'une impureté présente dans le méthanol

L'impureté a un m/z de 198.

Le gradient commence par un pallier de 2 min à 100% de méthanol pour LC-MS puis à 12 min atteint 100% du méthanol qui n'est pas de qualité LC-MS.

