



LPS-004

Dosage du bisphénol A dans une préparation liquide pour nourrissons

*par extraction en phase solide avec une dérivation à
l'anhydride acétique suivie d'une chromatographie en phase
gazeuse couplée à une spectrométrie de masse*

Bureau d'innocuité des produits chimiques
Direction des aliments
Direction générale des produits de santé et des aliments

Un centre de collaboration de l'OMS pour la
surveillance de la contamination alimentaire



Organisation Mondiale
de la Santé



Santé Canada est le ministère fédéral qui aide les Canadiennes et les Canadiens à maintenir et à améliorer leur état de santé. Nous évaluons l'innocuité des médicaments et de nombreux produits de consommation, aidons à améliorer la salubrité des aliments et offrons de l'information aux Canadiennes et aux Canadiens afin de les aider à prendre de saines décisions. Nous offrons des services de santé aux peuples des Premières nations et aux communautés inuites. Nous travaillons de pair avec les provinces pour nous assurer que notre système de santé répond aux besoins de la population canadienne.

Publication autorisée par le ministre de la Santé.

LPS-004 Dosage de bisphénol A dans une préparation liquide pour nourrissons par extraction en phase solide avec une dérivation à l'anhydride acétique suivie d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse est disponible sur Internet à l'adresse suivante :

http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/chem/lps_004_f.html

Also available in English under the title:

LPS-004 Determination of Bisphenol A in Liquid Infant Formula by Solid Phase Extraction with Acetic Anhydride Derivatization and Gas Chromatography-Mass Spectrometry.

La présente publication est également disponible sur demande sur disquette, en gros caractères, sur bande sonore ou en braille.

Pour obtenir plus de renseignements ou des copies supplémentaires, veuillez communiquer avec :

Publications
Santé Canada
Ottawa (Ontario) K1A 0K9
Tél. : 613-954-5995
Télec. : 613-941-5366
Courriel : info@hc-sc.gc.ca

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par le ministre de Santé Canada, 2008.

Cat. : H164-80/2008F-PDF
ISBN : 978-0-662-08960-5

TABLE DES MATIÈRES

1.0	PRINCIPE ET PORTÉE	4
2.0	DÉFINITIONS.....	4
3.0	CARACTÉRISTIQUES DE RENDEMENT	4
4.0	APPAREILLAGE ET FOURNITURES.....	4
4.1	Appareillage	4
4.2	Substances chimiques	5
4.3	Matériel.....	5
5.0	SANTÉ ET SÉCURITÉ	6
6.0	PROCÉDURES	6
6.1	Préparation de solutions étalons	6
6.2	Extraction des échantillons	7
6.3	Dérivatisation.....	8
6.4	Réglage des instruments.....	9
6.5	Analyse des données et calculs	10
7.0	CONTRÔLE DE LA QUALITÉ ET ASSURANCE QUALITÉ.....	10
8.0	DOCUMENTS CONNEXES	10

1.0 Principe et portée

Cette méthode vise à doser le bisphénol A dans les préparations liquides pour nourrissons à des taux de 0,3 à 25 ppb.

Le BPA-d16 marqué est utilisé comme étalon interne. Les protéines de lait sont dénaturées et séparées en ayant recours à l'acétonitrile. Les lipides, les glucides et certains des acides gras ajoutés sont éliminés par EPS. Le BPA est dérivatisé en diester en utilisant de l'anhydride acétique dans une solution aqueuse de base. Le dérivé de BPA est extrait en faisant appel à un solvant non polaire et mesuré par CG-SM en mode de détection d'ions sélectionnés, et ce, en employant quatre ions (un ion cible et trois ions qualifiants). Les solutions étalons sont préparées selon la même méthode que les échantillons (en suivant les étapes de dérivatisation).

2.0 Définitions

BPA : Bisphénol A

BPA-d16 : Bisphénol A-d16 marqué avec un isotope

ACN : Acétonitrile

3.0 Caractéristiques de rendement

Intra-analyse

Taux de BPA (ng/g)	Récupération (%)	ÉTR (%)
2,5 (n = 8)	94	2,8
20,0 (n = 5)	94	3,9
8,0 (n = 8)	85	2,7

Données de validation inter-analyse

	n	BPA		
		ng/g	Récupération (%)	ÉTR (%)
Substance de référence à haute concentration	6	10,4	-----	2,8
Substance de référence à faible concentration	6	0,54	-----	5,0
Blancs de méthode	6	0,13	-----	-----
Blancs dopés	6	-----	100	1,4
Doubles	5			1,9

4.0 Appareillage et fournitures

4.1 Appareillage

4.1.1 Chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 (CPG) avec détecteur sélectif de masse 5975 (DSM)

4.1.2 Four

4.1.3 Balances

4.1.4 Plaque d'agitation à 50 emplacements pour des flacons de 22 ml (n° PS80037A de Barnstead)

- 4.1.5 Bain à ultrasons
- 4.1.6 pH-mètre et solutions d'étalonnage
- 4.1.7 Évaporateur à N₂ à 12 ou à 24 emplacements
- 4.1.8 Vortex, simple et à tubes multiples
- 4.1.9 Système d'évaporation Speedvac

4.2 Substances chimiques

- 4.2.1 Acétonitrile (qualité HPLC) de J.T. Baker (Phillipsburg, N.J.).
- 4.2.2 Méthanol (qualité HPLC) de J.T. Baker (Phillipsburg, N.J.).
- 4.2.3 Toluène (distillé sous verre) de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario).
- 4.2.4 Carbonate de potassium (qualité ACS) de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario).
- 4.2.5 Bisphénol A (99 %) de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario).
- 4.2.6 Bisphénol A-d16 (98 %) de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario).
- 4.2.7 Isooctane (qualité résidus de pesticides) de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario).
- 4.2.8 MTBE (méthyl-tert-butyléther 99,9 %) de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario).
- 4.2.9 K₂HPO₄ (qualité ACS) de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario).
- 4.2.10 Na₂SO₄ (anhydre, qualité ACS) de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario).
- 4.2.11 1-pentanol (99 %), dodécane (99 %) de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario).
- 4.2.12 Anhydride acétique (qualité ACS) de Fisher (Ottawa, Ontario).
- 4.2.13 H₃PO₄ (85 %, qualité HPLC) de Fisher (Ottawa, Ontario).
- 4.2.14 Eau déionisée d'un système milli-Q.

4.3 Matériel

- 4.3.1 Tubes centrifuges en polypropylène de 15 ml.
- 4.3.2 Fioles jaugées de 10, 25, 50 et 100 ml.
- 4.3.3 Tubes de verre jetables de 13 x 100 mm, de 16 x 100 mm et de 20 x 150 mm.
- 4.3.4 Flacons ambrés de 2 ml pour autoéchantillonneur.
- 4.3.5 Barres d'agitation, 12,5 x 5 mm.
- 4.3.6 Flacons de 22 ml avec bouchons avec septum enduits de téflon.
- 4.3.7 Pipettes Eppendorf, de 100 à 1000 µl, de 10 à 100 µl et de 20 à 250 µl.

- 4.3.8 Bandes indicatrices de pH, de 1 à 14.
- 4.3.9 Cartouches d'extraction en phase solide C18, 500 mg/6 cc, de Varian (Mississauga, Ontario).
- 4.3.10 Réservoirs de 80 ml pour extraction en phase solide avec adaptateurs.
- 4.3.11 Collecteur à vide pour extraction en phase solide à 20 emplacements.
- 4.3.12 Distributeur pour flacons de 10 à 150 ml.
- 4.3.13 Tubes de verre de 70 ml avec bouchon vissé et septum enduit de Téflon.
- 4.3.14 Colonne vide avec verre fritté.

5.0 Santé et sécurité

6.0 Procédures

6.1 Préparation de solutions étalons

- 6.1.1 Solutions mères de BPA (400 ppm) : Préparer dans des fioles jaugées de 25 ml, en utilisant de l'acétonitrile comme solvant. Entreposer à 4 °C.
- 6.1.2 Solution intermédiaire et de dopage de BPA (10,0 ppm) : Dans une fiole jaugée de 25 ml, pipetter le volume requis de la solution mère de BPA pour obtenir une concentration de 10,0 µg/ml. Remplir avec de l'acétonitrile.
- 6.1.3 Solution de dopage de BPA (1 ppm) : Pipetter 5,0 ml d'une solution de 10 ppm dans une fiole jaugée de 50 ml. Remplir avec de l'acétonitrile.
- 6.1.4 Solution étalon interne de BPA-d16 (1,0 ppm) : Dans une fiole jaugée de 25 ml, pipetter le volume requis de la solution mère de BPA-d16 pour obtenir une concentration de 1,0 µg/ml. Compléter le volume avec de l'acétonitrile.

6.1.5 Solutions étalons de BPA dérivatisé

À préparer seulement avant la dérivatisation des extraits d'échantillon.

Ajouter les solutions étalons à une série de flacons de 22 ml qui contiennent 12 ml d'une solution de K₂CO₃ 1,0 M.

Passer à l'étape de dérivatisation. Les concentrations (en ng/ml) ci-dessous font référence à un volume final de 150 µl.

Total de ng	ng/ml injecté	µl de 1,0 ppm de BPA-d16	µl de 1,0 ppm de solution de BPA	µl de 0,1 ppm de solution de BPA
0	0	0	-----	0
1,5	10	30	-----	15
3	20	30	-----	30
9	60	30	-----	90
24	160	30	-----	240
72	480	30	72	-----

- 6.1.6 Tampon de phosphate 0,1 M à pH de 7,0 : Peser 28,6 g de Na_2HPO_4 dans un erlenmeyer de 2 l. Ajouter une barre d'agitation et environ 1950 ml d'eau. Dissoudre et ajouter du H_3PO_4 concentré jusqu'à l'obtention d'un pH de $7,0 \pm 0,1$. Compléter le volume à 2,0 l et entreposer à 4 °C; préparer hebdomadairement.
- 6.1.7 Solution 50 % d'ACN/ H_2O : Mélanger 250 ml d'acétonitrile et 250 ml d'eau dans une bouteille de verre.
- 6.1.8 Solution 30 % de méthanol/eau : Mélanger 150 ml de méthanol et 350 ml d'eau dans une bouteille de verre. Conserver à la température ambiante pour un mois au maximum.
- 6.1.9 Solution de K_2CO_3 1,0 M : Dans une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre 69 g de K_2CO_3 anhydre et compléter le volume avec de l'eau.
- 6.1.10 Solution de conservation 1-pentanol/dodécane : Mélanger 4 ml de 1-pentanol et 4 ml de dodécane dans un tube de verre avec bouchon rodé.

6.2 Extraction des échantillons

- 6.2.1 Avant de commencer, conditionner la verrerie de laboratoire suivante dans un four à 260 °C pendant au moins deux heures : une série de tubes de verre de 70 ml, une série de 16 x 150 mm et deux séries de 16 x 100 mm de tubes de verre jetables, et ce, afin d'éliminer le BPA environnemental qui pourrait s'y trouver.
- 6.2.2 Chaque lot d'extraction contenait les échantillons témoins suivants : (1) un blanc de méthode (6 ml d'eau), (2) un blanc de méthode dopé au BPA à 20 ng/g, (3) une ou deux substances internes de référence et (4) un échantillon inconnu dopé au BPA à 20 ng/g.
- 6.2.3 Peser environ 6,0 g de la préparation liquide de lait dans un tube à centrifuger en PP de 15 ml. À partir d'une formule concentrée, utiliser 3,0 g et ajouter 3,0 ml d'eau.
- 6.2.4 Ajouter 30 μl de la solution étalon interne de 1,0 ppm de BPA-d16 à chaque échantillon (à l'exception du blanc) et mélanger.
- 6.2.5 Ajouter 6,0 ml d'acétonitrile.
- 6.2.6 Agiter pendant 30 secondes et mélanger par vortex pendant 30 secondes.
- 6.2.7 Centrifuger à 4000 tr/minute à 4 °C pendant douze minutes.
- 6.2.8 Décanter le liquide dans un tube de verre de 70 ml.
- 6.2.9 Ajouter 55 ml du tampon à pH de 7 à chaque tube, fermer et mélanger.

Purification par extraction en phase solide – EPS C-18 BondElut, 500 mg/6 cc, (n° 1210-2052 de Varian)

- 6.2.10 Conditionner avec deux volumes de réservoir (13 ml) de méthanol et deux volumes d'eau.
- 6.2.11 Identifier chaque cartouche avec le numéro de l'échantillon.
- 6.2.12 Utiliser un réservoir de 80 ml adapté avec un adaptateur.
- 6.2.13 Si une filtration préalable est requise, n'utiliser qu'un filtre à cartouche en fibre de verre de 2 μm (jamais une membrane en nylon ni organique qui absorbent toutes les substances à analyser d'intérêt), inséré entre le réservoir et l'adaptateur.

- 6.2.14 Verser l'extrait dans le réservoir et permettre une absorption par gravité (aucun vide à moins que le débit n'ait complètement cessé).
- 6.2.15 Rincer avec un volume (6,5 ml) d'eau et jeter.
- 6.2.16 Rincer avec deux volumes (13 ml) d'une solution de 30 % de méthanol dans de l'eau et jeter.
- 6.2.17 Identifier une série de tubes de verre de 16 x 100 mm avec le numéro d'échantillon. Placer les tubes dans le support et le support dans le collecteur à vide pour récupérer l'éluat.
- 6.2.18 Éluer le C18 avec 6,5 ml (un volume) d'acétonitrile 50 %. À la fin, appliquer un léger vide pour récupérer les dernières gouttes.
- 6.2.19 Mélanger l'éluat en utilisant un agitateur-mélangeur à vortex.
- 6.2.20 Concentrer à environ 3 ml en utilisant un évaporateur à N₂.

6.3 Dérivatisation

- 6.3.1 Transférer l'extrait aqueux concentré dans un flacon de 22 ml et ajouter une petite barre d'agitation.
- 6.3.2 Si ceci n'a pas été fait avant l'extraction, ajouter 30 µl de l'étalon interne de 1,0 ppm de BPA-d16 (dans de l'acétonitrile) à chaque échantillon, à l'exception des blancs des réactifs.
- 6.3.3 Ajouter 10 ml de la solution de K₂CO₃ 1,0 M.
- 6.3.4 Placer tous les flacons d'échantillons sur la plaque d'agitation à 50 emplacements et lancer l'agitation à faible vitesse.
- 6.3.5 Préparer également un ensemble de solutions étalons – voir la section 6.1.5.
- 6.3.6 Ajouter 200 µl d'anhydride acétique à chaque flacon.
- 6.3.7 Après cinq minutes, répéter l'ajout de 200 µl d'anhydride acétique et maintenir l'agitation pendant encore dix minutes.
- 6.3.8 Ajouter 5,0 ml d'isooctane au flacon.
- 6.3.9 À l'aide d'une bande indicatrice de pH et d'une pipette Pasteur, vérifier le pH de quelques échantillons. Il doit être supérieur à 10. Si nécessaire, ajouter 0,5 ml d'une solution concentrée de K₂CO₃ (3 M).
- 6.3.10 Ajouter 100 µl d'anhydride acétique de plus et mélanger pendant encore dix minutes.
- 6.3.11 Arrêter l'agitation et laisser les deux phases se séparer (dix minutes ou plus, si nécessaire).
- 6.3.12 Si une émulsion est présente, diviser l'échantillon dans deux flacons, diluer avec de l'eau, ajouter encore de l'isooctane et extraire de nouveau.

Pour la phase organique :

- 6.3.13 Remplir à la moitié une petite colonne de verre avec du Na₂SO₄ anhydre et la placer au dessus d'un tube de verre de 20 x 150 mm.

- 6.3.14 À l'aide d'une pipette Pasteur, transférer la phase d'isooctane dans la colonne de Na_2SO_4 .
- 6.3.15 Extraire de nouveau la solution aqueuse (dans le flacon de 22 ml) en utilisant 5,0 ml de MTBE (méthyl-tert-butyléther).
- 6.3.16 Agiter à vitesse élevée pendant au moins dix minutes.
- 6.3.17 Arrêter l'agitation et laisser les phases se séparer.
- 6.3.18 Transférer la phase organique de MTBE dans la colonne de Na_2SO_4 .
- 6.3.19 Transférer l'extrait organique sec dans un tube de 13 x 100 mm. Il peut être nécessaire d'ajouter du Na_2SO_4 au gros tube et de soumettre à un mélange par vortex si de l'eau semble être présente (aspect trouble).
- 6.3.20 Ajouter 30 μl de la solution de 1-pentanol/dodécane au tube de 13 x 100 mm comme solution de conservation.
- 6.3.21 Rincer la colonne de Na_2SO_4 et le tube avec 1 ml d'isooctane et 1 ml de MTBE et combiner dans un tube de verre de 13 x 100 mm.
- 6.3.22 Évaporer le solvant en utilisant le Speedvac pendant environ 30 minutes à 35 °C. Seule une petite goutte de solution de conservation devrait rester au fond.
- 6.3.23 En présence d'un résidu d'eau, ajouter 1 ml d'acétone et évaporer le mélange de nouveau.
- 6.3.24 Reconstituer avec 120 μl de toluène.
- 6.3.25 Mélanger par vortex pendant 30 secondes.
- 6.3.26 Placer dans un bain aux ultrasons pendant cinq minutes.
- 6.3.27 Transférer l'extrait dans un flacon d'autoéchantillonnage pour CPG qui contient l'insert pour analyse (utiliser une pipette Eppendorf plutôt qu'une pipette Pasteur).

6.4 Réglage des instruments

- 6.4.1 Débit d'hélium à titre de gaz porteur : 1,1 ml/minute.
- 6.4.2 Température de l'injecteur : 280 °C.
- 6.4.3 Volume d'injection de l'échantillon : 1,0 μl en mode sans division de flux.
- 6.4.4 Colonne de CPG : colonne capillaire ZB-5 ms (5 % de diphényl-95 % de diméthyl-silicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).
- 6.4.5 Profil de température du four du CPG : 100 °C pendant une minute, élévation à 225 °C pendant cinq minutes à une vitesse de 20 °C/minute, puis élévation à 325 °C à une vitesse de 35 °C/minute et maintien pendant une minute.
- 6.4.6 Le DSM est utilisé avec une ionisation par impact électronique en mode de détection d'ions sélectionnés. L'étalonnage du spectre par *Standard Autotune* est utilisé. Écart EM à + 300 eV.
- 6.4.7 Les ions suivants sont sélectionnés pour le BPA : 213, 228, 270, 312, et pour le BPA-d16 : 224.

6.4.8 Le temps de séjour est de 35 ms pour chaque ion.

6.4.9 Température à l'interface CPG-DSM : 280 °C.

6.4.10 Température source pour le DSM : 230 °C.

Dans ces conditions, le temps de rétention du BPA devrait se situer à environ 13,4 minutes.

6.5 Analyse des données et calculs

6.5.1 Entrer le multiplicateur dans le tableau de séquences AVANT l'acquisition des données.

Multiplicateur : Volume final (ml) / poids de l'échantillon.

Pour un échantillon de 6,0 g, M = 0,025.

Utiliser le programme d'analyse des données incorporé ChemStation pour l'étalonnage en mode étalon interne avec une m/z de l'ion de 228 comme cible. Entrer la concentration de la solution étalon en ng/ml afin d'obtenir des résultats de concentration en ng/g de l'échantillon. La courbe d'étalonnage en utilisant 1/C2 en pesant sans forcer à zéro (le blanc donne un signal positif).

6.5.2 Quantifier chaque échantillon en utilisant *Calculate report* et *Generate detailed report*.

7.0 Contrôle de la qualité et assurance qualité

7.1 La confirmation de l'identité du BPA est fondée sur le temps de rétention et sur les rapports des ions.

7.2 Chaque lot d'extraction contenait les échantillons témoins suivants : (1) un blanc de méthode (6 ml d'eau), (2) un blanc de méthode dopé au BPA à 20 ng/g, (3) une ou deux substances internes de référence et (4) un échantillon inconnu dopé au BPA à 20 ng/g.

7.3 Linéarité : La valeur R2 pour la courbe d'étalonnage avec des surfaces de pics normalisées aux étalons internes par opposition aux concentrations doit être supérieure à 0,99. Au moins quatre des cinq solutions étalons doivent être utilisées. Les valeurs rétrocalculées de chaque solution étalon $\pm 15\%$ de leur valeur nominale ($\pm 20\%$ pour la solution étalon la plus faible).

7.4 La limite de quantification de la méthode a été établie à 0,5 ng/g, ce qui équivaut à la plus faible solution étalon de 10 ng/ml pour un échantillon de 3 g.

8.0 Documents connexes