

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

C'est une méthode qui est rapide, elle est récente et constitue une des meilleures méthodes de partage en raison de son pouvoir élevé de séparation, de sa spécificité et de sa très grande sensibilité. Cette méthode peut aussi être employée pour les solvants, seul ou en mélange avec d'autres solvants comme phase mobile pour obtenir la séparation et la résolution.

Actuellement la HPLC est surtout employée avec des systèmes de détection dans l'ultra violet permettant de choisir certaines longueurs d'onde spécifique pour obtenir une absorbance maximale (Bontoyan W.R; 1985).

La confirmation des résidus détectés après séparation par HPLC pose généralement de problèmes. Ainsi, si la détection se fait par absorption de rayons UV, la production d'un spectre complet peut fournir une bonne preuve de l'identité. Toute fois les spectres UV de certains pesticides ne sont pas très utiles pour le diagnostic étant semblables à ceux produits par de nombreux autres composés possédant des groupes ou structures fonctionnels semblables (Renaudeau P. et al ; 2004).

III.1.3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation dont les principes généraux sont les mêmes que ceux énoncés pour la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser au travers d'un substrat choisi (Tranchant J; 2005)

Son emploi s'est généralisé grâce au perfectionnement de détections qui ont permis d'atteindre des seuils de sensibilité que seules les mesures de radioactivité pouvaient atteindre. Plusieurs systèmes de détection sont disponibles à nos jours

et différents dans leur principe, leur sensibilité leur limite de détection leur linéarité et leur sélection. La particularité du procédé est d'opérer en totalité sur des produits volatilisés ; ce qui implique de maintenir une température minimale convenable, mais sans qu'il y ait volatilisation du substrat, et de travailler en circuit étanche au gaz (Tranchant J ; 2005)

III.2 Méthodes spectrophotométrique

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière. Ces méthodes sont simples et rapides et se fondent sur le principe que les liaisons chimiques spécifiques absorbant des longueurs d'onde spécifiques dans l'infrarouge. Le degré d'absorbance dépend directement de la concentration du produit chimique contenant la liaison spécifique (Bontoyan W.R. 1985).

Cependant seuls les produits chimiques dont l'absorbance est linéaire dans un intervalle pratiquement utilisable de concentration se prêtent à cette méthode d'analyse (Ruemker R.V et Kelso G.L, 1975).

Ces méthodes présentent aussi un défaut de sensibilité et nécessitent une purification délicate et une séparation des différents composants à analyser (Dourough et al, 1975).

III.3 Méthodes enzymatiques

Ces méthodes vont permettre une analyse simultanée de plusieurs pesticides lorsqu'elles sont combinées avec la CCM. Elles consistent à utiliser l'action inhibitrice des organophosphorés et des carbamates sur l'acétylcholinestérase (Dourough et al, 1975).

Elles permettent aussi la séparation rapide des pesticides, l'isolement possible des résidus des anticholinestérasiques. Cependant leur combinaison avec la CCM est

limitée par divers facteurs tels que le pH du solvant, la température, l'humidité, les interférences dues à d'autres substances (Some Noya, 1979).

III.4 Méthodes colorimétriques

Selon Sow, (1987) repris par O. Coly (2000), les méthodes colorimétriques sont basées sur des possibilités réactionnelles de certains groupements chimiques, et manifestent une sensibilité aux divers pesticides d'une même famille. Les difficultés souvent rencontrées sont la stabilité de la couleur et l'interférence entre les composés co-extraits (Dourough et al, 1975).

Selon (Ramassamy, 1974), cette méthode est applicable aux carbamates pour lesquels, la procédure d'hydrolyse des phénols ayant des positions para libres se fait par couplage avec un réactif diazoïque.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

I.1 Matériels biologiques

Nous avons utilisé différents produits végétaux dont des cultures céréalières et des cultures maraîchères.

I.1.1 Les produits céréaliers utilisés (BERHAUT J, 1967)

-du riz : *Oryza brachyantha* (A. Chev) prélevé sur le marché

-du mil : *Pennisetum gambiense* (Lam) prélevé sur le marché

-de l'arachide : *Arachis hypogea* prélevé sur le marché

I.1.2 Les produits maraîchers utilisés (BERHAUT J, 1967)

Tous les produits maraîchers cités ci-dessous ont été prélevés au marché de Grand Dakar :

-oignon : *Allium cepa* (L) de la famille des Liliaceae

-aubergine : *Solanum aethiopicum* (L) de la famille des Solanaceae

-chou pomme : *Brassicole oleraceae* (L) de la famille des Cruciferaeae

-patate : *Ipomeae batatas* (L) de la famille des Convolvulaeae

-pomme de terre : *Solanum tuberculine* (L) de la famille des Solanaceae

I.2 Matériels de laboratoire

Pour réaliser l'extraction des résidus de pesticides dans les produits biologiques cités ci-dessus, on a utilisé le matériel de laboratoire suivant :

I.2.1 Matériels d'extraction

-scalpels

-balance de précision (SARTORIUS)

-mortier et pilon en porcelaine (AVIGNON)

-entonnoir en pyrex

-papier filtre blanc (PROLABO)

-éprouvette graduée de 25ml en pyrex

-bêcher de 100ml en pyrex

-erlenmeyer de 100ml en verre

I.2.2 Matériels de purification

- évaporateur équipé d'un refroidisseur de type HUBER MINISTAT et d'un système de chauffage de type KOWEL.
- une centrifugeuse de marque SIGMA 1K 15 équipé d'un rotor de 24 tubes de marque SIGMA
- 12 micro tubes de 1.5ml
- pipette de 1ml munie d'une poire
- pipette Pasteur

I.2.3 Matériels et conditions d'analyse

- **Appareillage**

- un spectrophotomètre visible (NOVASPEC II)
- un chromatographe de type JASCO modèle 880-PU équipé des éléments suivants :
 - Un détecteur UV visible de type JASCO modèle 875-UV
 - Un système de contrôle associé à un clavier de type JASCO modèle 801-S
 - un mélangeur automatique de type JASCO modèle 880-02
 - Un intégrateur Spectra PHYSIC modèle 4270
 - une colonne LICHROSORB RP 18-10 (150 cm×0.4cm)

- **Conditions expérimentales**

Lors de l'analyse par HPLC des résidus de pesticides nous avons utilisé un système éluant acétonitrile/eau dans les proportions 80/20 dans les conditions suivantes :

-boucle d'injection	20µl
-débit	1ml/mn
-pression	300kg/cm ²
-température	ambiante
-range (sensibilité)	0.16
-CS (vitesse de déroulement du papier)	0.1cm/mn
-atténuation	2
-longueur d'onde d'absorption du pesticide analysé	
-une seringue de 25µl (unimétric corporation)	

I.3 Produits chimiques utilisés

Pour réaliser l'extraction, la purification et l'analyse des résidus de pesticides, on a utilisé les produits chimiques suivants :

- eau distillée
- dichlorométhane HPLC (PROLABO)
- éthanol HPLC (PROLABO)
- acétonitrile 90% T HPLC (PROLABO)
- méthanol 99.8% HPLC

II Méthodes d'extraction et de purification des extraits

II.1 Méthodes d'extraction des résidus de pesticides

II.1.1 A partir des céréales

Pour réaliser l'extraction des résidus de pesticides dans les céréales, nous avons procédé de la manière suivante :

- peser deux lots de 20g de riz : un lot non lavé et l'autre lavé;
- procéder de la même manière pour un échantillon de mil débarrassé du son
- moudre chacun de ces échantillons à l'aide d'un mortier et d'un pilon en porcelaine jusqu'à l'obtention d'une poudre;
- ajouter 20ml de dichlorométhane et procéder à une macération de l'échantillon moulu pendant 3mn;
- laisser agir le solvant pendant 15mn ;
- filtrer l'extrait obtenu;
- récupérer ensuite le filtrat dans un erlenmeyer de 300ml;
- rincer l'échantillon avec l'éthanol pendant quelques minutes puis filtrer l'extrait et le récupérer dans le même erlenmeyer.

De la même manière, on pèse 20g d'arachide moulu puis mélangé avec 20ml de dichlorométhane. L'extrait est filtré puis conservé dans un erlenmeyer de 300ml.

II.1.2 A partir des produits maraîchers

On a utilisé la méthode décrite (Ernest et al, 1975) reprises par (O. COLY, 2000).

Ainsi, nous avons commencé par :

- découper les échantillons prélevés en petits morceaux à l'aide d'un couteau ;
- peser 25 ou 50 ou 100g pour chaque échantillon au moyen d'une balance électronique ;
- broyer les échantillons obtenus dans un mortier en porcelaine;
- ajouter dans l'échantillon moulu 25 ou 50 ou 100ml d'éthanol puis procéder à une macération pendant 3mn;
- laisser le solvant agir pendant 15mn;
- filtrer l'extrait obtenu;
- recueillir le filtrat dans un erlenmeyer.