

## *Liste des Abréviations utilisées*

OPPs	Organophosphorés
OCP	Organochlorés
LMR	Limites maximales de résidus
BPA	Bonnes pratiques agricoles
STEP	Les traitements des eaux usées
DAD	Détecteur par diode-array
LC	Chromatographie liquide
MS	Spectrométrie de masse.
SM <sup>2</sup>	Spectrométrie de masse en tandem
SPE	L'extraction sur phase solide.
MWCNTs	Multi-walled Carbone nanotubes.
CNT	Nanotubes de carbone.
ESI	Electrospray d'Ionisation.
SIM	Single Ion Monitoring
MRM	Mutiple Reaction Monitoring
PP	Produit pharmaceutique.
Ace	Acétaminophène
Bet	Bétaxolol
Bis	Bisoprolol
Ket	Kétoprofène
Me	Métoprolol
Nad	Nadolol
Dic	Diclofénac
Flu	Acide flufénamique
Mec	Acide mécofénamique
Tol	Acide tolfénamique
Ibu	Ibuprofène
AINS	Anti inflammatoire non stéroïdien.
IDA	Information dependent acquisition
SRM	Selected reaction monitoring
NCR	Nacimiento (rivière)
ANX	Andarax (rivière)

BNT	Benta (barrage)
GUA	Guapa (barrage)
ACN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
DCM	Dichlorométhane
HA	Substances humiques
ME	Effet matrice
IFW	L'eau de station dépuration (entré)
EFW	L'eau de station dépuration (sortie)
MET	Méthomyl
CYM	Cymoxanyl
MED	Méthidathion
MAL	Malathion
PEN	Penconazole
PMT	Parathion Méthyl
DIA	Diazinon
PHO	Phosalone

*Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont.*

*Aristote in La Métaphysique*

*La science ? Après tout, qu'est elle, sinon une longue et systématique curiosité ?*

*André Maurois in La Terre Promise*

## Résumé

La pollution de l'eau est une altération qui rend son utilisation dangereuse et perturbe l'écosystème aquatique. Elle peut concerner les eaux superficielles (rivières, plans d'eau) ou les eaux souterraines. L'activité humaine produit de nombreux composés organiques qui sont rejetés dans l'environnement par l'intermédiaire des eaux usées. ce dégagement représente une source majeure de pollution pour le système aquatique. Une grande variété de contaminants sont aussi présents dans les rejets des usines de traitement des eaux usées, et peuvent avoir un impact sur la faune et les humains en raison de leur effet biologique, en particulier sur les systèmes hormonaux.

Ce mémoire propose donc la mise au point des méthodes d'analyse multi résidus de pesticides et produits pharmaceutiques dans l'eau par couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse, une technologie plus répandue à la problématique au vue de la bibliographie. Après avoir mis en évidence les performances du nouveau mode d'acquisition SRM, disponible sur le spectromètre de masse 5500 Qtrap, pour la détection et la quantification de 20 micropolluants organiques dont douze médicaments et huit produits phytosanitaires dans un solvant déterminé, l'importance considérée à la nature de l'adsorbat utilisé lors de l'analyse de l'échantillon, a ensuite été établie en étudiant deux types de nano matériaux par l'intermédiaire de l'extraction en phase solide (SPE). Enfin les méthodes d'analyse multi résidus LC-MS/MS ont été appliquées à la recherche de ces produits organiques dans des échantillons réels. Ces méthodes ont montré leur capacité à détecter, quantifier et identifier les micropolluants organiques dans ces matrices en utilisant un mode d'acquisition couplé SRM/ESI.

**Mots clés :** produits pharmaceutiques, pesticides, nanomatériaux, SPE, LC-QqQ/LIT-MS<sup>2</sup>. MWCnts, MCM41, pré-concentration, L'eau, Rivière.

## Table des Matières

<i>Introduction Générale</i> .....	1
Introduction générale .....	2
<i>Chapitre I: Etude bibliographique</i> .....	6
I.1 La pollution de l'eau.....	7
II. Les pesticides.....	9
II.1 Historique et définitions.....	9
II.2 Classification.....	10
II.3 Effets des pesticides sur la santé et réglementation .....	12
II.3.1 Effets sur la santé .....	12
III. Les produits pharmaceutiques.....	16
III.1 Définition.....	19
III.2 Classification .....	19
III.4 Risques des médicaments pour l'environnement et pour l'homme .....	21
III.5 Réglementation.....	22
IV. L'analyse des contaminants dans l'environnement.....	23
IV.1 Le traitement d'échantillon .....	24
IV.3 .1 Sélection de l'adsorbant .....	28
VI.3.1.1 Les adsorbants conventionnels.....	29
IV.1.2.1.2 Adsorbants sélectives .....	35
b) Polymères mixtes .....	38
c) Nanotubes de carbone.....	40
IV.3.2 La capacité du l'adsorbant .....	46
IV.3.3 Le volume de fin de fixation.....	47
IV.4 Extraction en différé et extraction en ligne .....	48
IV.4.1. <i>Extraction en différé</i> .....	48
IV.4.2 Extraction en ligne.....	51
V. Chromatographie en phase liquide.....	56

VI.1 Détection par spectrométrie de masse .....	58
VI.1.1 principe de la spectrométrie de masse.....	58
VI.2 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	63
VI.3 CPL/SM2 de type « triple quadripôle » et « trappe ionique ».....	65
<i>Chapitre II: L'extraction des produits pharmaceutiques à l'aide de MWCnts.....</i>	<i>71</i>
Article 1: Determination of drugs in river and wastewaters using solid-phase extraction by packed multi-walled carbon nanotubes and liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry..	72
ABSTRACT.....	72
I. Introduction.....	74
II.Définition.....	76
<i>II. 1 Les anti-inflammatoires non stéroïdien.....</i>	<i>76</i>
III.2 L'optimisation de la méthode d'analyse des PP par HPLC/DAD.....	79
III.2.1 Préparation des standards.....	79
III. Validation et optimisation de la méthode par LC-QqQLIT-MS/MS.....	89
IV.1 LC-QqLIT-MS/MS procédure .....	89
IV.1.1 Conditions.....	89
IV.2 Validation de la méthode .....	96
<i>VI.2.1 effet de matrice.....</i>	<i>96</i>
<i>VI.2.2 la limite de quantification et de détection. ....</i>	<i>97</i>
<i>VI.2.3 Linéarité .....</i>	<i>98</i>
<i>VI.2.4 Précision et exactitude .....</i>	<i>99</i>
<i>VI.2.5 Application aux échantillons de la rivière et des eaux usées .....</i>	<i>100</i>
<i>VI.2.6 Etude Comparative de MWCNTs avec les cartouches SPE commerciales.....</i>	<i>103</i>
Conclusion.....	104
<i>Chapitre III: L'extraction des pesticides à l'aide de MWCnts.....</i>	<i>106</i>
Article 2: Determination of eight pesticides of varying polarity; in surface waters using solid phase extraction with multiwalled carbon nanotubes and liquid chromatography linear ion trap mass spectrometry.....	107

I.Introduction .....	108
II.Définition.....	109
II.1 Les insecticides.....	110
III. Développement de la méthode d'analyse de produits pharmaceutiques dans les eaux par SPE/CPL/SM <sup>2</sup> .....	111
III.2 L'optimisation de la méthode d'analyse des pesticides par HPLC/DAD. ....	113
III.2.1 Préparation des standards.....	113
I. Validation et optimisation de la méthode par LC-QqQLIT-MS/MS.....	122
IV.1 LC-QqQLIT-MS/MS procédure .....	122
IV.1.1 Conditions.....	122
IV.1.2 Optimisation .....	124
IV.2 Validation de la méthode.....	129
VI.2.1 la limite de quantification et de détection. ....	129
VI.2.2 Linéarité .....	130
VI.2.3 effet de matrice.....	130
VI.2.4 Précision et exactitude .....	131
Conclusion.....	133
<i>Chapitre IV: L'extraction des pesticides à l'aide de MCM41.....</i>	135
I. Introduction.....	135
II. Développement de la méthode d'analyse de pesticides dans les eaux par SPE/CPL/SM <sup>2</sup> .....	137
II.1 Les spécifications des composés étudiés .....	137
II.2 L'optimisation de la méthode d'analyse des pesticides par HPLC/DAD. ....	138
II.3 Synthèse de MCM41 .....	138
II.4 Caractérisation de MCM41 .....	138
II.5 Extraction sur phase solide : évaluation et optimisation.....	140
II.5.1 La préparation des cartouches de SPE.....	140
II.5.3 Le choix de l'éluant et son volume .....	141
II.5.4 L'étude de pH, l'effet des sels et du solvant organique.....	142

<i>II.5.6. La quantité de MCM41</i> .....	144
<i>II.5.7. Effet du volume d'échantillon</i> .....	145
<i>II.5.8. Effet des acides humiques</i> .....	146
<b>I. Validation et optimisation de la méthode par LC-QqQLIT-MS/MS</b> .....	147
<b>III.1 LC-QqLIT-MS/MS procédure</b> .....	147
<b>III.1.1 Conditions</b> .....	147
<b>IV.2 Validation de la méthode</b> .....	148
<i>IV.2.1. Linéarité.</i> .....	148
<i>VI.2.2 Précision et récupération</i> .....	149
<i>VI.2.3 effet de matrice</i> .....	150
<i>VI.2.4 la limite de quantification et de détection.</i> .....	152
<i>VI.2.5 Application aux échantillons de la rivière et des eaux usées</i> .....	154
<i>Conclusion Générale</i> .....	155
<i>La partie expérimentale</i> .....	159
<i>Références Bibliographiques</i> .....	182
<i>Annexe.</i> .....	207

---

*Introduction Générale*

---

## **Introduction générale**

Cette thèse de doctorat s'est effectuée en coopération avec l'université d'Almeria Espagne et l'université d'Oran Es-senia Algérie, dans le cadre de la formation et la recherche scientifique de la qualité environnementale (eau et sols) de Nord-Ouest d'Algérie.

L'activité humaine produit de nombreux composés organiques qui sont rejetés dans l'environnement par l'intermédiaire des eaux usées. Pour les grandes villes, ce dégagement représente une source majeure de pollution pour le système aquatique. Une grande variété de contaminants sont aussi présents dans les rejets des usines de traitement des eaux usées, et peuvent avoir un impact sur la faune et les humains en raison de leur effet biologique, en particulier sur les systèmes hormonaux.

L'eau est le principal constituant des êtres vivants et l'élément indispensable à toute forme de vie. Sa disponibilité ainsi que son abondance jouent un rôle fondamental dans le développement et l'évolution des sociétés. Bien que l'eau soit la substance la plus présente de la Terre, elle n'est constituée qu'à hauteur de 2,53% d'eau douce, le reste étant de l'eau de mer. Les 2/3 de cette eau douce sont en outre immobilisés dans les glaciers et les neiges.

Cependant, la diminution de cette ressource, la dégradation sans cesse accrue des écosystèmes aquatiques a pris, au cours des dernières décennies, une ampleur catastrophique et constitue une des dimensions environnementales les plus préoccupantes du XXI<sup>ème</sup> siècle. Une dégradation fortement liée, non seulement aux pathogènes biologiques, mais également aux produits chimiques fabriqués par l'homme. Leur présence dans l'environnement, et plus particulièrement dans l'eau, est un phénomène sans précédent dans l'histoire de l'humanité par leur quantité et leur diversité. Ils sont responsables de cas de pollution de plus en plus importants et récurrents rendant très difficile voire impossible la préservation de la qualité des écosystèmes.

Les effets des contaminants émergents sur l'environnement ont été reconnus récemment. Ceci implique que la plupart d'entre eux sont présents dans l'environnement depuis longtemps, mais leur présence a été élucidée il n'y a pas si longtemps et, par conséquent, leur contrôle échappe encore pour la grande majorité d'entre eux aux réglementations environnementales<sup>1,2</sup>. Pour le moment, il n'existe pas un accord clair pour dire quels composés doivent être considérés comme contaminants émergents. Ils peuvent être classifiés par famille chimique (produits chimiques de structure totalement nouvelle), par type d'application (nouvelles applications de type industriel ou domestique), par type d'effet toxique qu'ils génèrent (nouveaux effets découverts), par type de source (comme les nouvelles sources précédemment inconnues pour les produits chimiques existants) et par type d'exposition (voies qui n'avaient pas été prévues ou avaient été précédemment jugées négligeables)<sup>3</sup>. Tenant compte de ces critères, les produits pharmaceutiques, les produits à usage personnel et les pesticides doivent être considérés comme des contaminants émergents en raison des possibles effets toxiques qu'ils peuvent générer. Les produits pharmaceutiques suscitent un intérêt particulier en raison de leur grand volume de consommation et de leur forte activité biologique (comme par exemple les perturbateurs endocriniens) mais aussi en raison de leur qualité d'agents causatifs de résistance bactérienne (comme les antibiotiques)<sup>4</sup>.

Grâce aux progrès de l'analyse physico-chimique, la présence de traces de substances micropolluantes et de leurs dérivés ou métabolites a été largement établie à l'échelle mondiale en particulier dans les eaux superficielles et souterraines, dans les eaux résiduaires, dans les boues des stations d'épuration utilisées en épandage agricole et dans les sols.

Pour la plupart des classes émergentes de contaminants, il n'existe que quelques données environnementales, car pour la plupart, ils ne sont pas réglementés. Une autre raison pour le

---

<sup>1</sup> J. L. Barreriro, *In Focus on Water Resource Research, First ed.*; Heikkinen, E., Ed.; Nova Science Publishers: New York (2008) pp 3-14.

<sup>2</sup> S. Glassmeyer, *In Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems, First ed.*; Aga, D. S., Ed.; Taylor & Francis Group: Boca Raton, London, New York (2008) pp 3-52

<sup>3</sup> C. G. Daughton, *Environmental Impact Assessment Review*, 24 (2004) 711-732.

<sup>4</sup> M. J. L. de Alda, S. Diaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barcelo, *J. Chrom A*, 1000 (2003) 503-526.

peu d'information disponible est le manque de méthodes analytiques pour éventuellement permettre une évaluation appropriée des risques, pour la surveillance de la qualité des eaux de surface et souterraines. En dépit du manque de telles directives, il est important de développer des procédures analytiques pour surveiller certains problèmes environnementaux spécifiques qui permettront d'obtenir des mesures fiables. Seules de telles mesures peuvent nous fournir les bases scientifiques nécessaires pour estimer l'occurrence et la persistance des résidus dans l'environnement.

Dans ce contexte privilégié, nous avons proposé trois méthodes analytiques, optimisées et validées au sein de notre laboratoire. L'extraction phase solide est la reine de ces méthodes où deux nanomatériaux ont été testés avec succès sur douze composés pharmaceutiques et huit pesticides.

Les travaux de thèse sont présentés à travers quatre chapitres, dans un premier temps, une étude bibliographique présente la pollution de l'eau et les composés cibles de manière générale ainsi que les techniques analytiques employées pour ces composés.

Le second chapitre de la thèse expose le développement d'une méthode d'analyse de douze produits pharmaceutiques. Premièrement une identification et optimisation des conditions chromatographiques faite par HPLC/DAD. Ensuite une optimisation de l'extraction phase solide par les nanotubes de carbones. Afin de valider la méthode analytique par la chromatographie couplée à une spectrométrie de masse ultra trace et liée à un triple quadripôle hybride à une trappe ionique (LC-QqQ-LIT/MS<sup>2</sup>) suivie par une véritable application sur les eaux environnementales. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Chromatography A* et peut être trouvée sous la référence « **Determination of drugs in river and wastewaters using solid phase extraction by packed multi-walled carbon nanotubes and liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry** ».

Vu la grande efficacité de l'extraction phase solide par les nanotubes de carbone sur les composées pharmaceutiques, il était éventuel de tester ces nanomatériaux sur un groupe de huit pesticides. Une identification et optimisation des conditions chromatographiques a été faite au sein de notre laboratoire par HPLC/DAD, ensuite une optimisation de la technique SPE-MWCnts, afin de valider la méthode analytique par LC-QqQ-LIT/MS<sup>2</sup>. Et à la fin une application de la méthode sur des échantillons d'eaux d'Almeria Espagne. Cette étude est publiée récemment dans le *Journal of Microchimica Acta* sous la référence « **Determination of eight pesticides of varying polarity; in surface waters using solid phase extraction with multiwalled carbon nanotubes and liquid chromatography linear ion trap mass spectrometry.** »

Les résultats obtenus lors de ces deux derniers, nous ont permis de tester d'autres adsorbants connus sur l'échelle des nanomatériaux, où une méthode analytique a été proposée pour les produits phytosanitaires du chapitre 3.

Le mésopore MCM41 synthétisé est utilisé comme adsorbant d'extraction phase solide. L'optimisation et la validation ont été faites par LC-QqQ-LIT/MS<sup>2</sup>. L'adéquation de cette technique a été confirmée par une application réelle.

---

*Chapitre I*

*Etude Bibliographique*

---

## I. La pollution de l'eau

La pollution de l'eau est une altération qui rend son utilisation dangereuse et/ou perturbe la vie aquatique. Elle peut concerner les eaux superficielles, les eaux souterraines et l'eau de mer. Les origines de la pollution des eaux sont variées et intimement liées aux activités humaines: pollutions domestiques, urbaines, industrielles et agricoles. Les principales manifestations de la pollution des eaux sont de nature chimique ou biologique et peuvent être pathogènes pour l'homme.

La pollution chimique des eaux peut être chronique, accidentelle ou diffuse. Le risque chimique est lié à la présence de constituants géologiques ou de contaminants issus des activités humaines (aménagement, industrie, agriculture).

L'utilisation excessive d'engrais pour l'agriculture et l'élevage apporte une présence d'azote et de phosphore en quantité excessive dans les cours d'eau. Les algues de surface prolifèrent rapidement entraînant une diminution de la luminosité et surtout une consommation importante d'oxygène dissous dans l'eau; c'est le phénomène d'eutrophisation. L'oxygène n'est alors plus en quantité suffisante pour les organismes supérieurs.

Les pesticides constituent un problème majeur pour l'environnement. On inclut dans les pesticides toutes les substances avec lesquelles on combat les animaux et végétaux nuisibles à l'homme et aux êtres vivants supérieurs. Sur le plan chimique, on distingue plusieurs groupes de pesticides qui sont caractérisés par des persistances différentes. Les plus persistants sont les hydrocarbures chlorés (*e.g.* le DDT, 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4 chlorophényl)-éthane) qui s'accumulent dans les tissus graisseux <sup>5</sup>.



**Figure 1.** *Persistance de quelques familles de pesticides*<sup>6</sup>

Ces dernières années, plusieurs chercheurs ont montré un grand intérêt lié à la présence de médicaments dans les eaux. Ainsi que leurs précurseurs de synthèse et de transformation sont libérés continuellement en quantités énormes dans l'environnement. L'utilisation domestique résulte une libération des produits soit par voie urinaire, ou par expiration de produit dans les

<sup>5</sup> H. Karlsson, D. Muir, C.F. Teixeira, D.A. Burniston, W. M. J. Strachan, R.E. Hecky, J. M. Harve, A. Bootsma, N. P. Grift, K. A. Kidd, B. Rosenberg, *Environ. Sci. Technol.* 34. 21(2000) 4490–4495.

<sup>6</sup> C. Bliefert, R. Perraud, *Chimie de l'Environnement* (2008).

eaux usées domestiques et cela peut causer une pénétration de ces derniers dans les eaux environnementales ainsi résultent des effets indésirables dans le biote ce qui était largement souligné dans la littérature<sup>7</sup>. Le rejet en continu de médicaments et de leurs métabolites dans le milieu aquatique confère à ces molécules un caractère de pseudo-persistance<sup>8</sup>.

Leur présence dans les milieux aquatiques dépend de leurs propriétés physico-chimiques et en particulier de leur hydrosolubilité, de la stabilité des molécules, de leur demi-vie. Ces demi-vies ont été calculées en laboratoire ou en conditions naturelles, mais les données sont très parcellaires: elles varient de plusieurs mois pour l'acide clofibrigue et la carbamazépine à quelques heures ou quelques jours pour le diclofénac, le sulfaméthoxazole, l'ofloxacine ou l'ibuprofène<sup>9</sup>. Par contre, les données sont très limitées pour les processus de dégradation dans les eaux de surface continentale, voire inexistantes pour les milieux côtiers et estuariens ainsi que pour l'adsorption sur les particules en suspension et les sédiments<sup>10</sup>.

L'évolution des connaissances toxicologiques et l'abaissement des seuils de détection des méthodes analytiques amènent de nouvelles questions quant à la présence de polluants, tels que les médicaments ou les perturbateurs endocriniens. Cependant, ces substances n'étant souvent pas recherchées dans les analyses de routine, les connaissances relatives à leur présence dans l'eau, leur aptitude à persister dans l'environnement, à migrer dans les ressources en eau ou à traverser les filières de potabilisation restent limitées.

Par ailleurs, les effets de ces substances et ceux de leurs produits de décomposition, aux doses retrouvées dans l'eau, sont souvent mal connus. Les données épidémiologiques et toxicologiques les concernant restent souvent insuffisantes<sup>11</sup>. L'évaluation des risques liés à la présence de ces substances est donc l'un des enjeux majeurs pour l'amélioration de la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine. Conscientes de cet état de fait, les instances européennes ont établi une liste prioritaire de molécules qui doivent faire l'objet d'évaluation<sup>12</sup>.

Les polluants radioactifs comprennent les décharges d'eau d'égout des usines, hôpitaux et mines d'uranium. Ces polluants peuvent également provenir des isotopes naturels, comme le

---

<sup>7</sup> a) M. Petrovic, S González, D. Barceló, TrAC, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 685-696

b) M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 549-562

c) T. Smital, T. Luckenbach, R. Sauerborn, A.M. Hamdoun, R.L. Vega, D. Epel, *Mutation Research* 552 (2004) 101-117.

d) P.K. Jjemba, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 63 (2006) 113-130.

<sup>8</sup> Fenet H, Gomez E, Leclerc M, Casellas C, *Environ. Risques Santé*, 5 (2006)243-247

<sup>9</sup> Andreozzi R, MarottaR, Praéxus NA, *Chemosphere*, 50 (2003)1319-1330

<sup>10</sup> Garric J et Ferrari B, comportement et impact, TSM, 99 (2004) 47-58

<sup>11</sup> J. Hospitalier-Rivillon, R. Poirier, *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 69, 3 (2008) 496-505.

<sup>12</sup> Décision n° 2455/2001/CE du Parlement européen et du Conseil du 20 novembre 2001 établissant la liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau et modifiant la «Directive 2000/60/CE».

radon. Les polluants radioactifs peuvent être dangereux, et ils prennent plusieurs années avant que les substances radioactives ne soient plus considérées dangereuses.

## **II. Les pesticides**

### **II.1 Historique et définitions**

La première utilisation des pesticides en agriculture date de l'antiquité. Leur développement a ensuite suivi celui de la chimie minérale. Les composés alors employés étaient des dérivés de composés minéraux ou de plantes comme par exemple, ceux à base d'arsenic, de cuivre de zinc, de manganèse ou de sulfate de nicotine. Puis, à partir de la seconde guerre mondiale, les pesticides ont bénéficié du développement de la chimie organique. Les composés synthétiques majoritaires ont d'ailleurs été à l'origine de l'expansion rapide des produits phytosanitaires à partir de 1940 (Tableau 1)<sup>13</sup>.

Les pesticides ou les produits phytosanitaires, sont définis comme des substances dont les propriétés chimiques contribuent à la protection des plantes cultivées et des produits récoltés. Ce sont des formulations contenant une ou plusieurs substances chimiques minérales ou organiques, synthétiques ou naturelles. La plupart de celles utilisées aujourd'hui sont de nature organique dont un petit nombre est extrait ou dérivé des plantes<sup>14</sup>.

---

<sup>13</sup> Miquel la qualité de l'eau et l'assainissement en France <http://www.senat.fr/rap/102-215-2/102-215-21.pdf>

<sup>14</sup> Index phytosanitaire ACTA, Association De Coordination Technique Agricole, 2006.

Evolution des produits			
	Herbicides	Fongicides	Insecticides
Avant 1900	Sulfate de cuivre Sulfate de fer	Soufre Sels de cuivre	Nicotine
1900-1920	Acide sulfurique		Sels d'arsenic
1920-1940	Colorants nitrés		
1940-1950	Phytohormones...		Organo-chlorés Organo-phosphorés
1950-1960	Triazines, urées Substituées	Carbamates Phtalimides	Carbamates
1960-1970	Dipyriyles, Toluidines...	Benzimidazole	
1970-1980	Amino-phosphonates. Propionates..	Traizoles Dicarboximides Amides, phosphites Morholines	Pyréthrinoides Benzoyl-urées (Régulateurs de croissance)
1980-1990	Sulfonyl urées..		
1990-2000		Phénylpyrroles Strobilurines	

**Tableau 1.** L'évolution des trois plus grandes classes de pesticides des années 1900 à 2000.

## II.2 Classification

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activités que leur classification est complexe.

D'une manière générale, les substances actives peuvent être classées soit en fonction de la nature de l'espèce à combattre (1<sup>er</sup> système de classification), soit en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les composent (2<sup>ème</sup> système de classification).

### II.2.1 Première système de classification

Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles d'activités que sont les herbicides, les fongicides et les insecticides.

### **a. Les herbicides**

Représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde, toutes cultures confondues. Ils sont destinés à éliminer les végétaux rentrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance. C'est pourquoi, ils sont aussi bien utilisés pour l'entretien des voiries que pour le jardinage des particuliers. Les herbicides possèdent différents modes d'actions sur les plantes, ils peuvent être des perturbateurs de la régulation d'une hormone, « l'auxine » (principale hormone agissant sur l'augmentation de la taille des cellules), de la photosynthèse ou encore des inhibiteurs de la division cellulaire, de la synthèse des lipides, de cellulose ou des acides aminés.

### **b. Fongicides**

Ils permettent quant à eux de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons ou encore des bactéries. Ils peuvent agir différemment sur les plantes soit en inhibant le système respiratoire ou la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des acides aminés, des protéines ou le métabolisme des glucides.

### **c. Les insecticides**

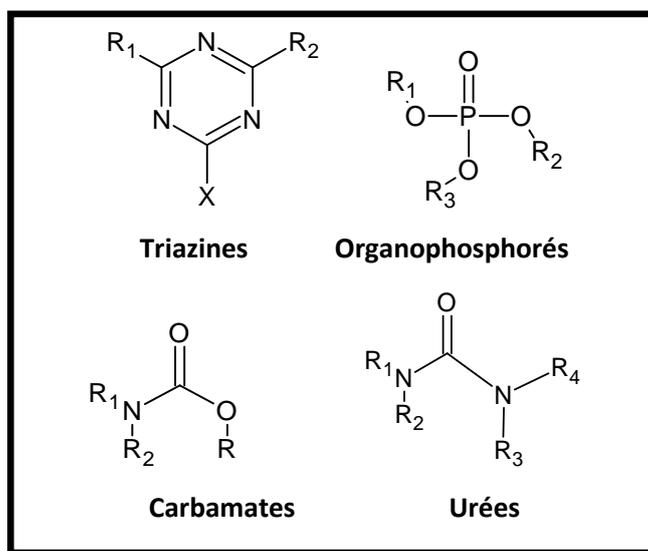
Ils sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction, différents types existent: les neurotoxiques, les régulateurs de croissance et ceux agissant sur la respiration cellulaire.

Outre, ces trois grandes familles mentionnées ci-dessus d'autres peuvent être citées en exemple. Les acaricides, contre les acariens, les némantocides, contre les vers du groupe des nématodes, les rodenticides, contre les rongeurs, les taupicides, contre les taupes, les molluscicides, contre les limaces et escargots ou encore les corvidés et les corvifuges, respectivement contre les corbeaux et les autres oiseaux ravageurs de culture.

## **II.2.2 Deuxième système de classification**

Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de la substance active qui compose majoritairement les produits phytosanitaires. Compte tenu de la variété des propriétés physico-chimiques des pesticides disponibles sur marché, il existe un très grand nombre de familles chimiques. Les plus anciens (Tableau1) et principaux groupes chimiques sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les triazines et les urées

substituées. Les structures chimiques caractéristiques de certaines de ces familles sont présentées en *Figure 2*.



**Figure 2.** Structures chimiques des principales familles de pesticides.

Ce deuxième système de classification ne permet pas de définir de manière systématique un composé. Certains pesticides peuvent en effet être composés de plusieurs fonctionnalités chimiques. Ils peuvent alors être classés une ou plusieurs familles chimiques.

## II.3 Effets des pesticides sur la santé et réglementation

### II.3.1 Effets sur la santé

La contamination de l'homme par les pesticides peut se faire par différentes voies. Il peut les absorber via les aliments, l'eau, par contact avec la peau ou encore par inhalation. De plus, les pesticides regroupent un grand nombre de molécules dont les effets sur l'homme sont différents. Certains produits qui présentent une toxicité aiguë importante peuvent être éliminés facilement par l'organisme. A l'inverse, d'autres substances de toxicité moindre sont susceptibles de s'accumuler dans l'organisme et d'induire des effets à plus long terme qui sont difficilement quantifiables. Par ailleurs, ces produits sont transformés parallèlement en différents métabolites susceptibles d'engendrer d'autres répercussions sur l'organisme humain. Néanmoins, les effets indirects des pesticides sur les organismes vivants sont probablement plus importants que leur toxicité directe. Ils peuvent être divisés en deux catégories : d'une part les effets chroniques sur la santé et d'autre part les effets écologiques. Ceux traités ici concernent la santé humaine, la croissance, la physiologie et la reproduction. Certains pesticides sont par ailleurs reconnus

aujourd'hui comme étant des polluants organiques persistants (POPs), tels que l'endrine, l'aldrine, le dieldrine, le chlordécone, le lindane ou encore le chlorane. Leurs principales caractéristiques de POPs sont la persistance dans l'environnement, l'accumulation dans les graisses, la dispersion dans l'environnement via les courants atmosphériques et marins mais aussi la nocivité pour la santé.

De manière générale, dans la littérature scientifique, il a été montré que les résidus de pesticides peuvent entraîner des désagréments pour la santé comme des troubles de la reproduction, du développement et du système nerveux<sup>15</sup>. Une toxicité neurologique aiguë, l'affaiblissement du développement neurologique chronique, un dysfonctionnement des systèmes immunitaire, de reproduction et endocrinien ont également été rapportés.

L'exposition aux pesticides peut aussi être la cause du développement de cancer<sup>16</sup>. Les risques modérés liés à une mauvaise application incluent les maux de tête, des éruptions cutanées ou encore des troubles de la vision<sup>17</sup>. Les résultats issus de différentes études illustrent certains des effets néfastes pouvant être observés. Il a été effectivement mis en évidence qu'une exposition à certaines substances pouvait entraîner un dérèglement du système immunitaire<sup>8</sup>. Certains pesticides sont aussi considérés comme étant des perturbateurs endocriniens, c'est à dire qu'ils interfèrent avec les hormones en simulant leur action. Par ailleurs, il a été montré que chez les agriculteurs, les cancers de la prostate et de l'estomac étaient plus fréquents<sup>18</sup>. Ce comportement a été confirmé par l'équipe de Quintanilla-Vega qui a identifié certains pesticides et leurs produits de dégradation comme des agents susceptibles de nuire à la fertilité masculine en particulier via une toxicité testiculaire<sup>19</sup>. Par ailleurs, une étude conduite aux Etats Unis a mis en évidence la présence de résidus de pesticides dans différentes matrices: urine, sang, tissus adipeux et lait maternel<sup>5</sup>. Le lien éventuel entre la présence de ces molécules dans le lait maternel et le développement anormal du fœtus et des malformations congénitales a été également souligné<sup>20</sup>.

Des composés de la famille des organophosphorés (OPPs) ont fait également l'objet de différents travaux de recherche. Une étude anthropologique a été réalisée par l'équipe de Garcia sur deux groupes semblables d'enfants mexicains âgés de quatre à cinq ans. Ceux qui ont été

---

<sup>15</sup> Ministère de la santé et de la Solidarité, Les pesticides dans l'eau potable.

<sup>16</sup> A. Hercegoà, M. Dömötöravà, E. Motisová, *J. Chrom. A*, 1153 (2007) 54-73.

<sup>17</sup> Rekha, S. N. Naik, R. Prasad, *J. Chrom. Health Saf* 13 (2006) 12-19.

<sup>18</sup> A. Meyer, J. Chrisman, J. Costa Moreira, S. Koifman, *Environ. Res* 93 (2003) 264-271.

<sup>19</sup> L. C. Sánchez-peña, B. E. Reyes, L. López Carrillo, R. Recio, J. Morán Martínez, M. E. Cebrián, B. Quintanilla Vega, *Toxicol. Appl. Pharmacol* 196 (2004) 108-113.

<sup>20</sup> M. Levario Carrillo, D. Amato, P. Ostrosky-Wegman, C. González Horta, Y. Corona, L. H. Sanin, *Chemosphere* 55 (2004) 1421-1427.

exposés à une dose importante d'un mélange de pesticides incluant des organophosphorés ont montré une diminution de la mémoire à court terme, une mauvaise coordination des yeux et des mains ainsi qu'une diminution de leur capacité à dessiner. En revanche, les enfants non exposés ont montré un développement normal<sup>21</sup>. De plus, il a été confirmé l'existence d'un lien entre l'exposition d'enfants américains à un pesticide organophosphoré, le méthyl parathion. Des problèmes persistants de mémoire à court terme et d'attention ont été également observés<sup>22</sup>. En outre, d'autres études épidémiologiques menées sur des nourrissons ayant été exposés à un autre pesticide organophosphoré le chlorpyrifos, ont montré une diminution significative de la circonférence de la tête, de leur poids à la naissance et d'un ralentissement des principaux réflexes<sup>23,24, 25</sup>.

Les pesticides ont été présents dans les échantillons réels à faibles concentrations<sup>26</sup>. Parmi eux ; les organochlorés (OCP) sont très toxiques et persistants dans l'environnement qui ont une tendance de s'accumuler dans les organismes vivants. Bien que la plupart de ces pesticides ont été interdits d'utiliser ; et jusqu'à maintenant sont détectés dans les écosystèmes<sup>27</sup>. Les OPPs et les herbicides triazines sont les plus couramment utilisées et détectés dans les cours d'eaux mondialement<sup>28</sup>.

Des recherches récentes ont montré que les dérivés de chlorpyrifos et de malathion sont au moins 100 fois plus toxiques que leurs formes parents, ainsi les dérivés de diazinon sont 10 fois plus toxiques. Cela présente un grave problème car, la chloration est toujours l'un des moyens les plus courants de désinfection de l'eau dans les stations de traitement. Un effet similaire a été trouvé dans le brouillard où s'accumule les (OPP) d'une façon importante. Enfin, on estime que 200.000 personnes meurent chaque année empoisonnées par OPPs, dans les zones rurales et agricoles des pays en voie de développement<sup>29,30,31, 32</sup>.

---

<sup>21</sup> E. A. Guillette, M. M. Meza, M. . Aquilar, A. D. Soto, I. E. Garcia, *Environ.Health.Perspect*, 106 (1998) 347-353.

<sup>22</sup> P. Z. Ruckart, K. Kakolewski, F. J. Bove, W.E. Kaye, , *Environ.Health.Perspect* 112 (2004) 46-51.

<sup>23</sup> J. G. Young, B. Eskenazi, E. A. Gladstone, A. Bradman, L. Pedersen, C. Johnson, D. B. Barr, C. E. Furlong, N. T. Holland, *NeuroToxicology* 26 (2005)199-209.

<sup>24</sup> G. S. Berkowitz, J. G. Wetmur, E. B. Deych, J. Obel, R. H. Lainski, J. H. Godbold, I. R. Holzman, M. S. Wolff, *Environ.Health.Perspect* 112 (2004) 388-391.

<sup>25</sup> R. M. Whyatt, V. Raud, D. B. Barr, D. E. Camann, H. F. Andrews, R. Garfinkel, L. A. Hoepner, D. Díaz, J. Dietrich, A. Reyes, D. Tang, P. L. Kinney, F. P. Perera, , *Environ.Health.Perspect* 112 (2004) 1125-1132.

<sup>26</sup> A. G. Frenich, J. L. Martinez Vidal, M. C. Pablos Espada, M. D. Gil Garcia, F. J. Arrebola, *J. Chromatography*. 52 (2000) 614-620.

<sup>27</sup> C. Dong, Z. Zeng, *Talanta*. 66 (2005)721-727.

<sup>28</sup> M. Tankiewicz, J. Fenik, M. Biziuk, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010)1050-1063.

<sup>29</sup> J. Namieśnik, J. Jaśkowski (Editors), *Zarys Ekotoksykologii, Eko-Pharma, Gdańsk, Poland, 1995*

<sup>30</sup> A. Kamel, C. Byrne, C. Vigo, J. Ferrario, C. Stafford, G. Verdin, F. Siegelman, S. Knizner, J. Hetrick, *Water Res.* 43 (2009) 522

<sup>31</sup> M. Jokanović, *Toxicol. Lett.* 190 (2009) 107

<sup>32</sup> M. Jokanović, *Toxicology* 166 (2001) 139.

A travers ces différentes études, il semble clair que les pesticides constituent un danger sanitaire réel et peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine. La protection du consommateur constitue donc un enjeu majeur de santé publique, c'est pourquoi, des réglementations portant sur les pesticides ont été mises en place par les différentes autorités gouvernementales.

### **II.3.2 Réglementations**

L'intérêt public concernant les résidus de pesticides dans les produits de consommation n'a cessé d'augmenter ces vingt-cinq dernières années<sup>33</sup> et a conduit les autorités législatives à mettre en place des réglementations strictes ainsi que de suivis de la qualité des produits de consommation. Ces actions sont menées dans le but d'éviter les risques pour le consommateur mais aussi pour réguler le marché international<sup>4, 34</sup>. Il existe des normes sur les taux de résidus de pesticides autorisés dans l'eau ou les aliments d'origines diverses. Ils relèvent en particulier de directive du conseil de l'Union Européenne 91/414/CE<sup>2</sup>. Le principale objectif de la législation phytosanitaire de l'Union Européenne consiste à causer la sécurité des denrées alimentaires produites à partir des végétaux et à garantir la santé des consommateurs et la qualité des cultures dans tous les états membres<sup>5</sup>. Des limites maximales de résidus (LMR) de pesticides dans différents produits de consommation ont donc été mises en place (eau, fruits, légumes....). Les LMR de pesticides correspondent aux quantités maximales attendues, établies à partir des bonnes pratiques agricoles (BPA) fixées lors de l'autorisation de mises

Sur le marché du produit phytosanitaire, ils reflètent l'utilisation des quantités minimales nécessaires pour protéger efficacement les cultures et qui aboutissent à des niveaux de résidus acceptables, c'est à dire sans effet sur la santé. Quand les pesticides sont appliqués suivant les BPA, les LMR ne sont en général pas dépassées. Au contraire, des écarts aux BPA peuvent entraîner la présence de résidus nocifs entraînant des risques sanitaires<sup>35</sup>. Les LMR pour une substance active et une culture donnés sont établies à partir des études toxicologiques, écotoxicologiques, agronomiques, biologique et différent d'un composé à l'autre. La persistance des résidus sur et dans les denrées agricoles varie avec la nature du pesticide et celle du substrat, la composition des formulations utilisées et les conditions climatiques qui ont suivi le traitement. Les LMR sont définies au niveau international. Toutefois au sein de l'Union Européenne, la primauté des LMR européenne peut conduire un état membre à publié des LMR pour une substance active contenue dans une spécialité non homologuée sur son territoire.

---

<sup>33</sup> J. Haib, I. Hofer, J. M. Renaud, *J. Chrom. A*, 1020 (2003) 173-187.

<sup>34</sup> O. Núñez, E. Moyano, M. T. Galceran, *Trends in Anal. Chem* 24 (2005) 683-703.

<sup>35</sup> J. Wang, W. Cheung, D. Grant, *J. Agric, Food Chem* 53 (2005) 528-537.

Des LMR sont ainsi fixées pour l'eau, les fruits, les légumes,...et ce pour chaque pesticide individuellement ou par groupe de pesticides. Le marché industriel des produits phytosanitaires est en constante évolution en particulier dans le domaine du développement de nouvelles molécules. Celles-ci sont, en général, efficaces à de très faibles doses, rendant leur estimation dans les différents produits complexes du fait des faibles valeurs de LMR autorisées. Ainsi, 17000 LMR ont été définies au sein de l'Union Européenne pour différents produits et pour 133 substances actives de pesticides<sup>36</sup>.

D'autres réglementations limitent la présence des substances chimiques minérales (nitrates, plomb, cyanures...), organiques (pesticides, aromatiques polycycliques...), ou encore les substances liées aux produits de désinfection (hypochlorite, bromates...) et à la radioactivité. Les nouvelles normes européennes fixent pour objectif de diviser par 5 la quantité de plomb dans l'eau d'ici 2013<sup>37</sup>. La norme fixe à 0,1 µg/L la concentration pour chaque type de pesticide et 0,5 µg/L la concentration totale en pesticides, dans les eaux de consommation humaine.

### **III. Les produits pharmaceutiques**

Les produits pharmaceutiques sont un groupe important de contaminants environnementaux émergents qui a été un problème de plus en plus intéressant dans la communauté scientifique internationale. Dans l'UE, près de 3000 différentes de produits pharmaceutiques actifs sont utilisés en médecine.

Les produits pharmaceutiques font partie intégrante, dans bien des cas, d'une vie saine et libre de tout souci. Il est cependant prouvé que la large utilisation de médicaments est à double tranchant de par leur influence sur l'environnement. Des résultats de recherche confirment, depuis le début des années 90, la présence d'un large spectre de médicaments destinés aux humains et aux animaux dans les eaux de surface, eau souterraine, et même sporadiquement dans l'eau potable.

Leur présence dans l'environnement est connue depuis plusieurs années bien qu'ils n'ont pas considérées comme des vrais contaminants. Alors que réellement leurs présences posent beaucoup d'inquiétude sur l'environnement<sup>38</sup>, car il est clair qu'ils provoquent une menace

---

<sup>36</sup> Introduction to EC Pesticides residues legislation. [http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/intro\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/intro_en.pdf)

<sup>37</sup> <http://www.ecologie.gouv.fr/>

<sup>38</sup> Petrovic M., Barceló D. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2006) 385, 422-424.

réelle ou potentiel sur l'être humain ainsi l'environnement dont les effets ne sont pas encore suffisamment étudié. De plus en plus de données ont également montré que certaines substances déterminées pouvaient avoir des effets négatifs sur la faune et la flore.

Plus les médicaments, il existe d'autres substances qui sont considérées comme des contaminants émergents pertinents, tels que certains agents tensio-actifs, les produits d'hygiène personnelle, les pesticides et les additifs de l'essence. Bien qu'il n'existe aucune classification pour ces composés en raison de leur diversité, le Tableau 2 montre les plus importants groupes de contaminants émergents avec quelques exemples.

Groupe des contaminants émergents	Commentaires
<b>Produit pharmaceutique</b> <sup>39,40, 41</sup>	
Sulfaméthoxazole (antibiotique)	A), résistance bactérienne
Diclofénac (antirhumatismal)	B)
Carbamazépine (antiépileptique)	A), B)
Acide clofibrigue (métabolite, régulateur de lipides)	A)
Iopamidol (un moyen de contraste aux rayons X)	A), B)
Estoroides et les contraceptifs orales Diéthylstilbestrol <sup>40</sup>	C)
<b>Produit de soin personnel</b> <sup>42,43</sup>	
Fragrance nitro (parfum)	E)
Benzophénone (agent de protection solaire)	
N, N-diéthyl-(insectifuge)	
<b>Antiseptiques</b> <sup>44</sup>	E), Photodégradation en dioxines
Triclosan, Bifenilol	
<b>Détergents et leurs métabolites</b> <sup>45,46</sup>	
LAS (tensioactif anionique)	Il s'accumule dans les boues
Nonylphénol (alkylphénols)	C), E), F)
APEO (alkylphénols ethoxylate tensioactif non ionique)	Il se décompose en métabolites plus toxiques et des perturbateurs endocriniens

<sup>39</sup> T.A. Ternes , A. Joss, *IWA Publishing, London, England (2006)*.

<sup>40</sup> A. Göbel, C.S. McARDell, A. Joss, H. Siegrist, W. Giger, *Sci. Tot. Environ.* 372 (2007) 361-371.

<sup>41</sup> T. A. Ternes, R. Hirsh, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2741-2748.

<sup>42</sup> B. M. Braune, P. M. Outridge, A. T. Fisk, D. C. G. Muir, P.A. Helm, K. Hobbs, P. F. Hoekstra, Z. A. Kuzyk, M. Kwan, R. J. Ketcher, W. L. Lockhart, R. J. Norstrom, G. A. Stern, I. Stirling, "Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: An overview of spatial and temporal trends" 351-352 (2005) 4-56.

<sup>43</sup> P. Cuderman, E. Heath, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1343-1350.

<sup>44</sup> A. Agüera, A. R. Fernandez-Alba, L. Piedra, M. Mezcuca, M. J. Gómez, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 193-205.

<sup>45</sup> T. P. Knepper, P. Eichhorn, "Surfactant metabolites in Organic Pollutants in the Water Cycle" Reemtsma T., Jekel M. (eds), Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2006)211-250.

<sup>46</sup> M. Ahel, E. Molnar, S. Ibric, W. Giger, *Wat. Sci. Techn.* 42 (2000) 15-22.

<b>Les retardateurs de flamme<sup>47</sup></b> Polybromodiphényléthers (PBDE)	E)
<b>Plastifiants<sup>47</sup></b> Le bisphénol A Les phtalates	B), C) C), F)
<b>Les inhibiteurs de corrosion et le givrage<sup>48</sup></b> benzotriazole	A)
<b>Revêtements antiadhésifs<sup>47</sup></b> PFOA, PFOS (composés perfluorés)	B), D), E)
<b>Additifs et acteurs industriels<sup>49</sup></b> EDTA (agent chélateur) Naphtalène-1,5-disulfonate (sulfonate aromatique)	A), B) B)
<b>Additifs essence<sup>50</sup></b> Méthyl tertio butyl éther (MTBE),	A), B)
<b>Les sous-produits de désinfection<sup>51</sup></b> Acides haloacétiques AHA NDMA	A) A)
<b>Algues et cyanobactéries toxines<sup>52</sup></b> Anatoxine-a (cyanobactéries neurotoxine) Saxitoxine (toxine des algues)	
<b>Pesticides polaires et de leurs produits de transformation<sup>53</sup></b> Métolachlore , Metolacloro-oxa, -esa, Glyphosate	B)

**Tableau2 :** La présence de différents groupes de Contaminant émergent dans l'environnement.

- A) Présence observée dans l'eau potable et les aquifères
- B) Proposée comme substance dangereuse prioritaire dans l'Union européenne.
- C) Perturbateurs endocriniens.
- D) Inclus dans les règlements sur l'eau potable en Allemagne et aux États-Unis.
- E) Ils s'accumulent dans les mammifères, les sédiments, les poissons ou les légumes.
- F) Les substances prioritaires normes environnementales de qualité basée sur la directive cadre sur l'eau dans les eaux de surface de l'UE.

<sup>47</sup> H. Fromme, T. Küchler, T. Otto, K. Pilz, J. Müller, A. Wenzel, *Water Research* 36 (2002) 1429-1438.

<sup>48</sup> W. Giger, C. Schaffner, H. P. E. Kohler, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7186-7192.

<sup>49</sup> C. K. Schmidt, H. J. Brauch, *Wiley-VCH, Weinheim* (2006) 155-180.

<sup>50</sup> M. J. Moran, J. S. Zogorski, P. J. Squillace, *Ground Water* 43 (2005) 615-627.

<sup>51</sup> C. Zwiener, Reemtsma T., Jekel M. (eds), *Wiley-VCH, Weinheim* (2006) 251-286.

<sup>52</sup> C. Svrcek, D. W. Smith, *J. Environ. Eng. Sci.* 3 (2004) 155-185.

<sup>53</sup> R. Fobbe, B. Kuhmann, N. Jürge, G. Preuss, C. Skark, N. Zullei-Seibert, "Reemtsma T., Jekel M. (eds), *Wiley-VCH, Weinheim*, (2006) 121-154

### III.1 Définition

Un médicament est une substance ou une composition présentée comme possédant des propriétés curatives, préventives ou administrée en vue d'établir un diagnostic. Un médicament est le plus souvent destiné à guérir, à favoriser la guérison, à soulager ou à prévenir des maladies humaines ou animales<sup>54</sup>.

La notion de médicament est précisément définie en France par l'article L5111-1 du code de la santé publique :

On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.

### III.2 Classification

Selon l'Académie nationale de Pharmacie<sup>55</sup>, on peut classer les médicaments en :

- Médicaments à usage humain
- Médicaments à usage vétérinaire
- Médicaments non utilisés MNU.

### III.3 Sources de contamination environnementale

Ces dernières années, plusieurs recherches sont réalisées dans le domaine environnemental qu'ils ont prouvé la présence des produits pharmaceutiques quel que soit dans l'usage humain ou vétérinaire à différentes concentrations.

Les produits pharmaceutiques peuvent exister dans l'environnement par plusieurs voies :

#### a) Les sources ponctuelles

- **L'industrie chimique fine:** Il s'agit des entreprises qui synthétisent les molécules médicamenteuses. Malgré le contrôle des autorités et les normes soumises à ces entreprises, leurs rejets (substances chimiques) restent toujours un facteur très perturbant, et aussi dangereux pour l'environnement.

---

<sup>54</sup> [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

<sup>55</sup> Rapport de l'Académie nationale de Pharmacie, juin 2008.



Nombreuses études ont montré que la principale voie d'entrée des médicaments dans l'environnement à travers des eaux usées urbaines non traitées et des effluents des usines de traitement des eaux usées (STEP). Les concentrations en médicament observées dans les effluents des STEP de plusieurs pays<sup>56</sup> dans le monde sont dans la gamme de concentrations de nano-gramme par litre à milligramme par litre, ce qui confirme que la plupart de ces contaminants ne sont pas complètement éliminée pendant le traitement secondaire généralement appliqué dans le traitement des eaux usées, ce qui dévoile la persistance de ces composés.

### III.4 Risques des médicaments pour l'environnement et pour l'homme

De plus en plus, l'usage de produits pharmaceutiques est très fréquent dans le monde développé, ce qui a porté le bien être à la population. En outre, il est attendu que la contamination par les médicaments va augmenter de plus en plus, en raison du développement rapide de l'industrie pharmaceutique et la croissance soutenue de la population, qui est à son tour une population plus âgée. Par conséquent, à chaque fois la présence de ces contaminants augmente, le risque pour l'homme et l'environnement augmente.

En général la littérature montre que la majorité des produits pharmaceutiques sont détectés entre nano-gramme par litre et microgramme par litre. Bien que ces concentrations puissent ne pas représenter un risque écologique, car la sensibilité de l'organisme en vers ces composés reste inconnue. Il est également courant, que la présence de faibles

- 
- <sup>56</sup> a) M.J. Gómez, M. J. M. Bueno, S. Lacorte, A. R. Fernández-Alba, A. Agüera, *Chemosphere* 66 (2007) 993-1002.  
b) J. L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, M. Callejón, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 116-122.  
c) M. J. M. Bueno, A. Agüera, M. J. Gómez, M. D. Hernando, J. F. García, A. R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 79 (2007) 9372-9384  
d) M. Farré, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, L. Tirepu, M. Vilanova, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 187-197.  
e) T. A. Ternes, M. Bonerz, T. Schmidt, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 175-185.  
f) T. A. Ternes, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 419-434.  
g) S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zuccato, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 206-215.  
h) M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, *Talanta* 70 (2006) 678-690.  
i) D. L. Sedlak, K. Pinkston, C. H. Huang, *Denver, CO: Awwa Research Foundation* (2005)  
j) J. T. Yu, E. J. Bouwer, M. Coelhan, *Agric. Water Manage.* 86 (2006) 72-80.  
k) L. Lishman, S. A. Smyth, K. Sarafin, S. Kleywegt, J. Toito, T. Peart, B. Lee, M. Servos, M. Beland, P. Seto, *Sci. Total Environ.* 367 (2006) 544-558.  
l) C. D. Metcalfe, X. S. Miao, W. H. R. L., *Springer* (2004) pp. 67-90.  
m) S.D. Kim, J. Cho, I.S. Kim, B. J. Vanderford, S. A. Snyder, *Water Res.* 41 (2007) 1013-1021.



concentrations de médicament individuel, la combinaison dont l'action thérapeutique commune pourrait induire des effets additifs ou synergiques.

Dans ce prétexte, les demandes d'informations sont importantes sur la toxicité potentielle des résidus de médicaments. Cependant, il y a très peu de données sur leurs effets sur l'environnement et particulièrement sur la faune aquatique ou terrestre. En bref, il y a beaucoup d'ignorance sur l'évolution de médicament dans l'environnement et leurs conséquences à long terme. La préoccupation majeure a été principalement axée sur les antibiotiques et les hormones, et pour la plupart des médicaments, il n'y a pas suffisamment d'informations sur les risques portés à l'environnement.

### III.5 Réglementation

Aucune réglementation propre aux rejets contenant des produits pharmaceutiques n'existe à proprement parler. La loi du 3 janvier 1992, dite "deuxième loi sur l'eau", fixe les conditions dans lesquelles doivent s'effectuer les rejets dans le milieu naturel, sans préciser le cas des substances médicamenteuses<sup>57</sup>. La loi du 19 juillet 1976 relative aux Installations

De même, l'arrêté du 2 novembre 1994 du code de la santé publique, relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale donne les règles auxquelles doivent se conformer les laboratoires. Mais, rien n'est prévu pour les résidus pharmaceutiques.

Depuis 1993 la directive européenne 93/39/CE impose une Étude d'Impact Environnemental (EIE) pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) d'un nouveau médicament à usage humain. Cette réglementation a en outre été étendue aux médicaments génériques en 2004 (directive 2004/27/CE modifiant la directive 2001/83/CE). En revanche pour les médicaments mis sur le marché avant l'application de la directive aucune étude a posteriori n'est exigée pour le moment. Il existe pourtant depuis le 1er janvier 2006 un standard technique unique pour l'EIE que doivent réaliser les laboratoires pharmaceutiques: l'Agence Européenne des Médicaments ou EMEA (European Medicines Agency) a publié un guide à ce sujet qui est valable aussi bien pour l'autorisation européenne centralisée de mise sur le marché que pour les autorisations nationales. En Allemagne il incombe à l'Agence fédérale de l'environnement<sup>58</sup> («Umweltbundesamt») de contrôler l'exécution de l'EIE en concertation

---

<sup>57</sup> N. Corvaisier, synthèse bibliographique, Février (2000).

<sup>58</sup> Umweltbundesamt (Hg.): Arzneimittel in der Umwelt – Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt. Texte des Umweltbundesamtes UBA Texte, Nr. 29. Berlin 2005 (abrufbar unter [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de))

avec l'Agence fédérale d'autorisation de mise sur le marché<sup>59</sup> (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte).

Seul un très petit nombre de ce groupe de polluants, commencent à être contrôlée par la fixation de limites d'émissions pour les industries et les programmes de surveillance. Le bromure diphenyle éther, le C-10-C13, chloroalcane, le di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), l'octal phénol sont des exemples de nouvelles substances à surveiller l'environnement (décision 2455/2001/CE, du Parlement européen et du Conseil le 20 Novembre 2001 établissant la liste des substances prioritaires dans les milieux aquatiques et modifiant la directive 2000/60/CE. Official Journal L 331, 15/12/2001).

En ce qui concerne l'eau potable, il y a au plan européen (dans le cadre de la directive sur l'eau potable, 98/83/CE) jusqu'à présent, aucun seuil limite concernant les principes actifs de médicaments (ceci vaut tant pour les médicaments à usage humain que pour ceux à usage animal). De même qu'aucun seuil limite n'est imposé pour les principes actifs de médicaments, dans le cadre du règlement allemand sur la qualité de l'eau pour la consommation humaine<sup>60</sup> («Trinkwasserverordnung»). Pour ceux-ci et d'autres substances non évaluées, il existe uniquement un seuil limite préventif, recommandé, sans importance toxicologique et non impératif, émis par la commission allemande pour l'eau potable, et qui s'élève à 0,1 microgramme par litre.

#### **IV. L'analyse des contaminants dans l'environnement**

La détection des micropolluants organiques dans l'environnement exige l'identification et la quantification dans des échantillons complexes à très faibles niveaux à ultra trace. De ce fait, les techniques d'analyse doivent être spécifiques et ultra sensibles pour détecter et quantifier les analytes parmi les impuretés à très basses concentrations<sup>61,62,63,64, 65, 66</sup>. Analyser ces contaminants n'est pas évident car beaucoup d'entre eux sont polaires, sensibles à la température et même aux poids moléculaires. Par conséquent, pour la quantification adéquate des matrices environnementales aqueuses nécessite des techniques analytiques avancées telles

---

<sup>59</sup> Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC): Arzneimittel in der Umwelt. Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Berlin **2003** (abrufbar unter [www.blac.de](http://www.blac.de))

<sup>60</sup> Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall (Hg.): Anthropogene Spurenstoffe im Wasserkreislauf – Arzneistoffe. Henny **2008**

<sup>61</sup> L. B. Liu, Y. Hashi, P. Y. Qin, H. X. Zhou, M. J. Lin, *J. Chrom. B.* **845** (**2007**) 61-68.

<sup>62</sup> E. Lacassie, M. F. Dreyfuss, J. L. Daguët, M. Vignaud, P. Marquet, G. Lachâtre, *J. Chrom. A.* **830** (**1999**) 135-143.

<sup>63</sup> C. Soler, Y. Pícol, *Trends in Anal Chem.* **26** (**2007**) 103-115.

<sup>64</sup> B. Alberto, C. S. Brunete, J. L. Tadeo, *Talanta*, **66** (**2005**) 917-924.

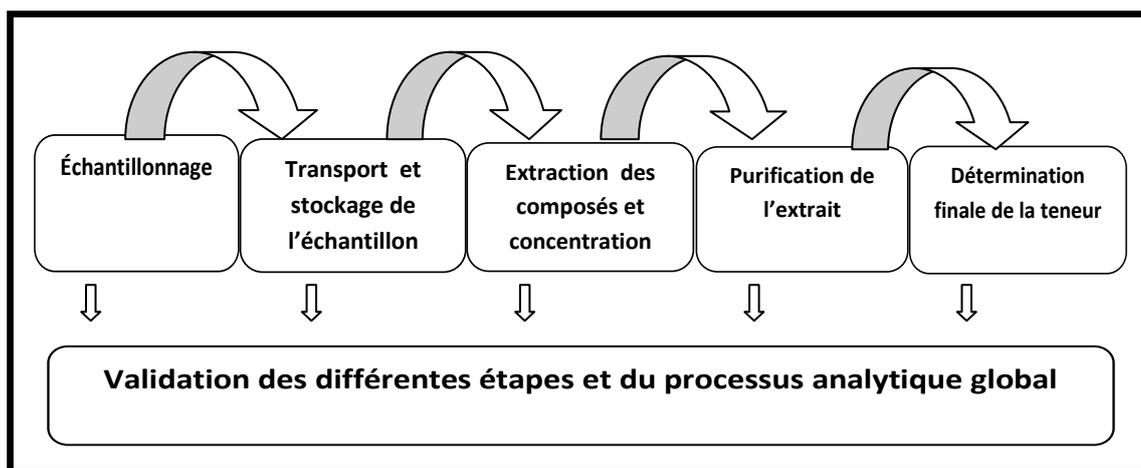
<sup>65</sup> C. M. Torres, Y. Pico, J. Manes, *J. Chrom. A.* **754** (**1996**) 301-331.

<sup>66</sup> C. G. Zambonin, M. Quinto, N. D. Vierito, F. Palmisano, *Food Chem.* **86** (**2004**) 269-274.

que la chromatographie gaz ou liquide et la spectrométrie de masse. Le développement de ces techniques a permis de détecter les contaminants au-dessous de nano-gramme par litre, ce qui a permis de déterminer la présence et la distribution de ces composés dans différents milieux.

#### IV.1 Le traitement d'échantillon

Malgré l'avancée des techniques analytiques, les échantillons sont trop complexes pour être analysés sans étape préalable de traitement de l'échantillon. Cette dernière permet à la fois de fournir un extrait enrichi en composés mais aussi de minimiser au minimum la présence d'interférents lors de la détection finale. Leur présence peut rendre en effet plus difficile l'analyse des composés d'intérêt. La préparation de l'échantillon comprend en général l'extraction, la concentration et éventuelle purification. Le processus analytique global d'analyse de résidus de polluants est schématisé sur la *Figure 4*.



**Figure 4.** Principales étapes d'une procédure analytique utilisée pour la détermination de polluants dans des échantillons alimentaires<sup>67</sup>.

L'extraction doit être menée avec précaution lors de l'analyse de matrices complexes pouvant contenir des interférents. Leur élimination représente une étape primordiale du processus analytique global. Par ailleurs, il a été montré, lors d'une étude menée au début des années 1990, que le traitement de l'échantillon avant l'analyse chromatographique constituait deux tiers du temps total et représentait une des principales sources d'erreurs sur les résultats de mesure. Ces procédures occupent donc une majeure partie de la durée globale de l'analyse et

<sup>67</sup> A. Beyer, M. Biziuk, *Food Chem*, 108 (2008) 669-680.

contribuent fortement des résultats<sup>68, 69</sup>, ce qui se traduit par la nécessité de contrôler le processus analytique global.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la détermination de différents pesticides<sup>70,71, 72, 73, 74, 75</sup> et produits pharmaceutiques<sup>76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83</sup> dans l'eau. Avec une très grande variété d'équipement : chromatographie phase gazeuse avec détection par électron capture (ECD), par détection azote phosphore (NPD), par détection flamme photométrique (FPD) et aussi par la spectrométrie de masse (MS). Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détection par diode-array (DAD), par fluorescence (FD) ou par la masse MS sont les plus fréquemment utilisées.

Avant de déterminer les résidus des échantillons est nécessaire de passer par une extraction et purification des échantillons. Différents types d'extraction ont été utilisés : l'extraction sur phase solide (SPE)<sup>84, 85, 86, 87, 88</sup>, l'extraction liquide-liquide (LLE)<sup>89</sup> et la micro-extraction sur phase solide (SPME)<sup>90</sup>.

#### **IV.2 L'extraction liquide-liquide (LLE)**

L'extraction liquide-liquide (*Liquid-Liquid Extraction, LLE*), basée sur la distribution d'un soluté entre deux phases immiscibles. L'efficacité de l'extraction dépend de l'affinité du soluté, du solvant organique utilisé, du rapport volumique des phases, et aux nombres d'étapes d'extraction. Tous ces facteurs doivent être optimisés pour obtenir un rendement quantitatif.

---

<sup>68</sup> F.E. Ahmed, *Trends in Anal. Chem.*, 20 (2001) 649-661.

<sup>69</sup> J. Namiesnik, T. Gorecki, *J. Polish, of Environ Studies*, 10 (2001) 77-84.

<sup>70</sup> J.M.F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 996 (2003) 133.

<sup>71</sup> H.P. Li, G.C. Li, J.F. Len, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 129.

<sup>72</sup> X. Guardino, J. Obiols, M.G. Rosell, A. Farran, C. Serra, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 91.

<sup>73</sup> H. Sabik, R. Jeannot, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 197

<sup>74</sup> M. Schellin, B. Hauser, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 251.

<sup>75</sup> C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 239.

<sup>76</sup> M.J. Martínez Buena, S. Uclésa, M.D. Hernandez, A.R. Fernández-Alba, *Talanta* 85 (2011) 157-166

<sup>77</sup> I. Rodríguez, J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr. A*, 985 (2003) 265-274

<sup>78</sup> J. Carpinteiro, J.B. Quintana, E. Martínez, I. Rodríguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Anal Chimica Acta* 524 (2004) 63-71.

<sup>79</sup> L. Tong, P. Li, Y. Wang, K. Zhu, *Chemosphere* 74 (2009) 1090-1097

<sup>80</sup> J. Wu, X. Qian, Z. Yang, L. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1471-1475.

<sup>81</sup> M. J. García-Galána, M. S. Díaz-Cruza, D. Barceló, *Talanta* 81 (2010) 355-366.

<sup>82</sup> L. Bijlsma, R. Serrano, C. Ferrer, I. Tormos, F. Hernández, *Sci Total Environment* 487 (2014) 703-709.

<sup>83</sup> A. Mendoza, J.L. Rodríguez-Gil, S. González-Alonso, N. Mastroianni, M. López de Alda, D. Barceló, Y. Valcárcel, *Envir Inter* 70 (2014) 76-87.

<sup>84</sup> J. Hernández-Borges, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, M.Á. Rodríguez-Delgado, *J. Chromatogr. A* 1070 (2005) 171.

<sup>85</sup> J. Hernández-Borges, M. Á. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 948.

<sup>86</sup> K. Jino, Y. Han, H. Sawada, M. Taniguchi, *Chromatogra* 46 (1997) 309.

<sup>87</sup> L. Hou, X. Wen, C. Tu, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 163.

<sup>88</sup> L. Zhu, H.K. Lee, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3065.

<sup>89</sup> D. Figeys, Y. Zhang, R. Aebbersold, *Electrophoresis* 19 (1998) 2338.

<sup>90</sup> C.Z. Dong, Z.R. Zeng, M. Yang, *Water Res.* 39 (2005) 4204.

Plus le rapport en volume des phases est important plus le rendement d'extraction est important et, par conséquent, le rendement d'extraction augmente en réalisant des extractions multiples avec un petit volume du solvant. Le choix du solvant et la phase aqueuse est essentiel, ainsi le pH, l'effet de sel et la présence de réactifs comme paires d'ions sont très importantes dans la distribution de l'équilibre.

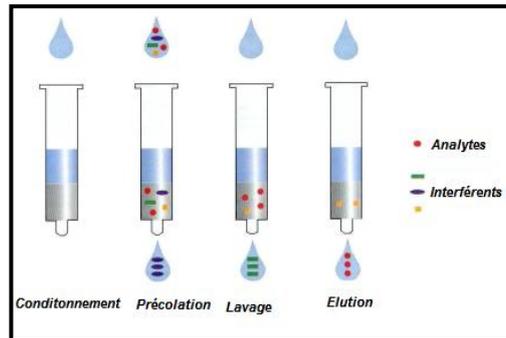
La LLE a longtemps été la méthode la plus utilisée au laboratoire, pour l'extraction des analytes quelques soient semi-polaires ou apolaires dans les échantillons aqueuses car elle est simple et moins coûteuse. Les solvants les plus utilisés sont le n-hexane, le cyclohexane et le dichlorométhane, mais leurs utilisation reste non sélective car lors d'une extraction pourrait extraire d'autre composés qui interfèrent l'analyse.

Les réglementations sur la réduction de l'usage des solvants organiques ainsi que le développement de nouvelles phases stationnaires ont participé à l'émergence de l'extraction sur phase solide (*Solid-Phase Extraction, SPE*), la technique la plus répandue aujourd'hui.

#### ***IV.3 L'extraction sur phase solide (SPE)***

L'extraction sur phase solide (SPE) est fondée sur le transfert des composés à extraire d'une phase liquide, l'échantillon, vers une phase solide, l'adsorbant. Les analytes doivent présenter une forte affinité pour la phase solide afin d'être retenus pendant l'étape de percolation de l'échantillon. Ils pourront ensuite être désorbés par un solvant de forte force éluante. A l'image de ceux mis en jeu en chromatographie en phase liquide, les mécanismes de rétention ou d'élution sont basés sur les différences d'interactions moléculaires entre l'analyte, le site actif de l'adsorbant et la phase liquide.

Le format le plus couramment rencontré consiste à placer l'adsorbant entre deux frittés dans une cartouche, les différentes solutions sont percolées par simple gravité, pression positive à l'entrée de la cartouche, vide en sortie de la cartouche, ou par centrifugation. Un protocole d'extraction sur phase solide est généralement constitué de quatre étapes, comme illustré sur la Figure 5.



**Figure 5** : Protocole d'extraction sur phase solide<sup>91</sup>.

La première étape, appelée *conditionnement*, a pour objectif de mouiller et d'activer l'adsorbant afin de le préparer au passage de l'échantillon contenant les solutés à extraire. Elle doit idéalement s'achever par le passage d'une solution de composition, et donc de force éluante, très similaire à celle de l'échantillon pour éviter tout risque d'éluion anticipée des analytes ciblés.

Lors de la seconde étape, on procède à la *percolation* de l'échantillon sur le support. Les analytes, ayant une grande affinité pour l'adsorbant choisi, sont fortement retenus contrairement à certains composés interférents pouvant déjà être éliminés lors de cette étape.

Cependant, certaines substances interférentes peuvent également être adsorbées sur le support et, ainsi une étape de *lavage* est nécessaire. Elle consiste à utiliser une solution peu éluante vis-à-vis des analytes d'intérêt afin de ne pas les perdre tout en éliminant un maximum des composés interférents plus faiblement retenus.

Enfin, les analytes sont désorbés avec un faible volume d'une solution de forte force éluante. Une grande partie des interférents ayant été éliminée lors des étapes de percolation et de lavage, la fraction ainsi obtenue a donc été purifiée. Le rendement d'extraction peut ensuite être déterminé en calculant le rapport entre la quantité de soluté retrouvée dans la fraction d'éluion et la quantité percolée. En plus de la purification, cette étape d'extraction permet de concentrer les analytes d'un facteur (appelé facteur d'enrichissement) défini selon l'équation suivante:

$$\text{Facteur d'enrichissement} = \frac{\text{Volume percolé}}{\text{Volume d'éluion}} \times \text{Rendement d'extraction}$$

Plusieurs paramètres sont responsables de mettre une méthode de pré-concentration en vigueur :

<sup>91</sup> Gilson, *The Gilson Guide for SPE automation*.

- a) Type et quantité de l'adsorbant.
- b) Le type et le volume du solvant d'éluion.
- c) Le pH et la teneur en sel de l'échantillon
- d) Le volume d'échantillon et son débit d'écoulement à travers la phase solide.

### **IV.3 .1 Sélection de l'adsorbant**

Le choix de l'adsorbant à utiliser pour l'étape de SPE dépend en premier lieu de la nature de l'échantillon (aqueux ou organique), et ensuite de la nature du ou des analytes à extraire (polarité, propriétés acido-basiques, taille, groupes fonctionnels).

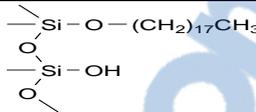
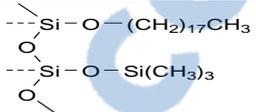
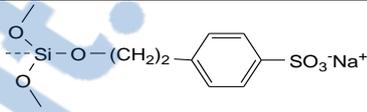
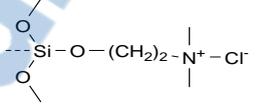
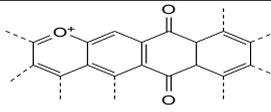
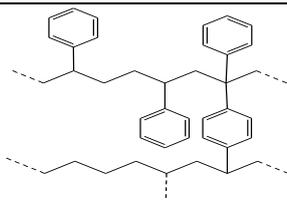
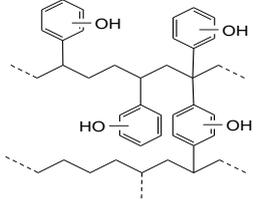
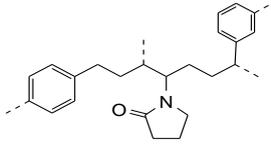
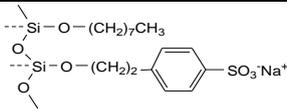
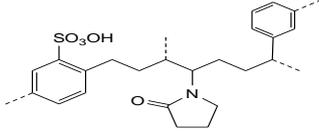
En effet, une réflexion préalable doit être menée sur la nature des interactions impliquées dans le mécanisme de rétention des analytes d'intérêt sur l'adsorbant afin de choisir l'adsorbant adéquat. Ainsi, les adsorbants peuvent être classés en fonction de la nature des interactions qu'ils développent avec les analytes.

L'adsorbant doit tout d'abord être choisi en fonction de la nature de l'échantillon, de sorte à développer une forte rétention des analytes. La force éluante du solvant constituant l'échantillon, devant être faible vis-à-vis de l'adsorbant choisi. Un exemple très fréquent est l'utilisation d'adsorbants hydrophobes pour l'extraction de composés dans des échantillons aqueux. La totalité des composés d'intérêts percolés doivent rester fixés sur le support durant les étapes de percolation et de lavage, ce qui implique de tenir compte du volume de fin de fixation et de la capacité du support.

#### **VI.3.1.1 Les adsorbants conventionnels**

Les dernières années, la technique SPE a connu beaucoup de progrès qui nous a permis d'avoir un large type d'adsorbants commerciaux. Les plus utilisés pour éliminer les différents contaminants organiques dans les matrices aqueuses sont les silices, également sont liées à des groupes n-alkyles (C-8, C-18), les copolymères apolaires et les adsorbants du carbone. Il y a aussi d'autres qui sont plus sélectifs tels que les échangeurs d'ions, immuno-adsorbants, adsorbants restreintes (MAR) et polymères moléculaires molecularly imprinted polymers (MIP).

Le mécanisme de rétention des analytes dépend des caractéristiques de l'adsorbant et peut être basé sur les interactions de type dipôle/dipôle, ion/dipôle, hydrophobes, dispersion ou échange d'ions. Le tableau 3, présente les principaux adsorbants utilisés dans SPE pour la pré-concentration des micropolluants organiques dans le système aquatique

L'adsorbant	Nom	Structure chimique
Silice greffée	phase inverse (ej. RP-C <sub>18</sub> )	
	phase inverse "endcapped" (exp. con trimetilclorosilano)	
	échange d'anions (SAX) (exp. l'acide benzènesulfonique)	
	Echange de cation (SCX) (exp triméthylammonium)	
Graphite de Carbone	Graphite de Carbone (exp. Carbopack B <sup>®</sup> )	
Copolymères	Polystyrène -divinylbenzene (exp. Lchrolut EN <sup>®</sup> )	
	Hydroxy polystyrène- di vinylbenzène (exp. ENV+ <sup>®</sup> )	
	Divinylbenzène-N- vinylpyrrolidone (exp. OASIS HLB <sup>®</sup> )	
Les supports mixtes	RP-C8 et SCX	
	Sulfonique divinylbenzène-N- vinylpyrrolidone (exp. OASIS MCX <sup>®</sup> )	

**Tableau 3** : les différents supports solides utilisés pour l'analyse des micropolluants organiques dans les matrices aqueuses.

### **a) Graphite de carbone**

Le graphite possède des structures aromatiques et, par conséquent, il est sélectif pour les composés aromatiques. En outre, la surface contient le groupe oxonium chargée positivement, qui agit comme échangeur d'anions faibles. Les composés sont retenus par des interactions hydrophobes et électrostatiques, et par conséquent, sont adaptés pour extraire les composés polaires et non polaires. Les composés avec des groupes aromatiques, tels que l'acide humique, sont fortement retenus, de telle sorte que ce matériau peut être utilisé comme un filtre nettoyant efficace de ces substances interférentes dans l'eau<sup>92</sup>. Le problème est que ces adsorbants peuvent souvent conduire à l'adsorption irréversible et donc une faible récupération.

Dans ce groupe des adsorbants les plus utilisés sont les graphites noirs de carbone (GCBs). Ce matériau a une structure très homogène, ordonnée, une surface spécifique de 120 m<sup>2</sup> / g et une grande efficacité pour piéger les composés polaires que la silice greffée. La principale limite de GCB est leur faible résistance à des pressions élevées.

### **b) Les échangeurs d'ions**

Ce type d'adsorbant est utilisé pour l'extraction des composés ioniques. Les échangeurs d'ions sont généralement constitués de silice ou de polymères greffés par des groupements fonctionnels tels que les acides carboxyliques ou les acides sulfoniques pour les échangeurs de cations, et les amines pour les échangeurs d'anions. Les échantillons sont tellement riches en composés ioniques cela peut limiter le volume de l'échantillon (breakthrough), ce qui réduit l'efficacité de l'extraction. De ce fait, la mesure de la conductivité de l'échantillon avant l'extraction est nécessaire<sup>93</sup> afin d'éviter les faibles taux de récupération. En outre, la cinétique lors de l'extraction est lente, cela nécessite un contrôle de vitesse d'écoulement<sup>94</sup>.

### **c) Les polymères**

Actuellement, les adsorbants polymères sont les plus couramment utilisés pour l'extraction de polluants organiques dans l'eau ; en raison de leur capacité de rétention des analytes (variété de polarité) et leur stabilité dans différents pH.

---

<sup>92</sup> C.S. McArdell, A.C. Alder, A. Göbel, D. Löffler, M. J. F. Suter, T. A. Ternes, A. Joss. *Analytical Methods*, 3 (2006) 55-105.

<sup>93</sup> E. M. Golet, A. C. Alder, A. Hartmann, T. A. Ternes, W. Giger. *J. Anal. Chem.* 73 (2001) 3632-3638

<sup>94</sup> E. M. Thurman, M. S. Mills. *Wiley-Interscience* (1998).

Durant les années 90, une nouvelle génération est connue à base de copolymères greffés (Isolute 101<sup>®</sup>, LiChrolut<sup>®</sup> EN, Isolute ENV+<sup>®</sup>, Oasis HLB<sup>®</sup>, StrataX<sup>®</sup>). Leur degré de reticulation élevé et leur structure ouverte, attribuent une très forte porosité et une spécifique surface, ce qui permet à des grandes interactions de type  $\pi$ - $\pi$  entre soluté et l'adsorbant ; qui permet d'augmenté les facteurs d'enrichissement de l'extraction des analytes.

Les adsorbants de type HLB<sup>®</sup> Oasis (Waters) sont largement utilisé pour l'élimination des (pesticides et de médicaments) à la fois polaire et non polaire. En réalité c'est un équilibre hydrophile-lipophile (HLB), constituant de monomères divinylbenzène et N-vinyl-pyrrolidone. Cette propriété lui permet de l'utiliser directement et sans étape de pré-conditionnement. Ainsi l'un des principaux avantages est la possibilité de travailler la méthode multi résidus à pH neutre<sup>95</sup> ce qui simplifie les étapes préliminaires de traitement d'échantillon.

#### **IV.3.1.1.1 Limitations des supports conventionnels**

Pour l'extraction des composés à l'état traces dans les matrices complexes, les supports présentés précédemment ne permettent pas toujours une purification suffisante de l'échantillon. Le risque d'extraction des composés interférents est élevé, ce qui peut engendrer des pics chromatographiques impurs, faussant ainsi la quantification des analytes d'intérêt. Une purification efficace est également nécessaire pour les analyses en chromatographie liquide couplée à des détecteurs spécifiques, tels que la spectrométrie de masse. En effet, il est parfois la cause principale de l'effet de matrice<sup>96</sup>, qui peut affecter sur la justesse et la précision de la méthode analytique<sup>97,98</sup>.

La présence et l'importance de ces effets de matrice sont mesurées en comparant les réponses obtenues lors de l'injection d'un standard et celle d'un échantillon dopé après traitement. Leur évaluation lors du développement d'une méthode analytique est indispensable au risque d'augmenter la probabilité d'obtenir des faux négatifs ou faux positifs<sup>99</sup>. Un exemple de la manifestation de ce phénomène est présenté en figure 6. Les auteurs ont dopé différents légumes par un pesticide, le triflumizol, à la même concentration et les réponses observées ont été comparées à celle obtenue en milieu pur

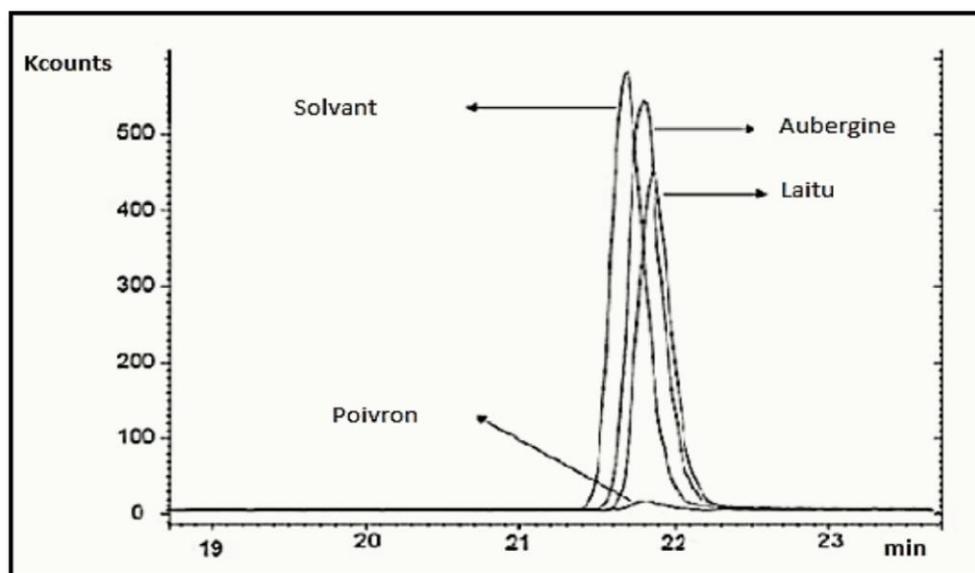
<sup>95</sup> M. J. Gómez, M. Mezcua, M. J. Martínez, A. R. Fernández-Alba, A. Agüera. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86 (2006) 3-13.

<sup>96</sup> W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2006) 881.

<sup>97</sup> B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 882.

<sup>98</sup> K.A. Mortier, K.E. Maudens, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem, A.P. De Leenheer, *Journal of Chromatography, B* 779 (2002) 321.

<sup>99</sup> B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3019.



**Figure 6:** Exemple d'effet de matrice en LC-MS<sup>2</sup>. Analyse du triflumizol dans différents légumes dopés à la même quantité<sup>100</sup>.

Une grande différence du signal a été observée indiquant la présence d'effets de matrice, en particulier pour le poivron, pour lequel une suppression quasi-totale du signal est observée. Plusieurs solutions existent pour réduire ou éliminer des effets de matrices. Le recours à des standards isotopiques peut être efficace, à condition qu'ils se comportent de la même manière que l'analyte face aux effets de matrice<sup>118</sup>. Toutefois, le nombre d'isotopes disponibles est limité et rester relativement chers. Une autre approche consiste à éliminer les co-élutions responsables des effets de matrice en améliorant la séparation chromatographique, menant en contrepartie à un allongement du temps d'analyse. Ces co-élutions peuvent également être éliminées lors d'une étape de traitement d'échantillon. Permettant sa purification, telle que l'extraction sélective sur phase solide.

#### IV.3.1.2 Adsorbants sélectives

Actuellement plusieurs matériaux sélectifs sont utilisés dans l'extraction des échantillons environnementaux<sup>101,102</sup>. Ou une apparition de nouvelles tendances de matériaux<sup>125</sup> : les tensioactifs modifiés, les polymères mixtes et les nanostructures.

<sup>100</sup> A. Agüera, S. López, A.R. Fernández-Alba, M. Contreras, J. Crespo, L. Piedra, *Journal of Chromatography A* 1045 (2004) 125.

<sup>101</sup> N. Gilart, F. Borrull, N. Fontanals, R.M. Marcé. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 1 (2014) e8–e18).

<sup>102</sup> F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollón, S.C.G.N. Braga. *Trends in Analytical Chemistry*, 43 (2013) 14-23).

### **a) Les tensioactifs modifiés**

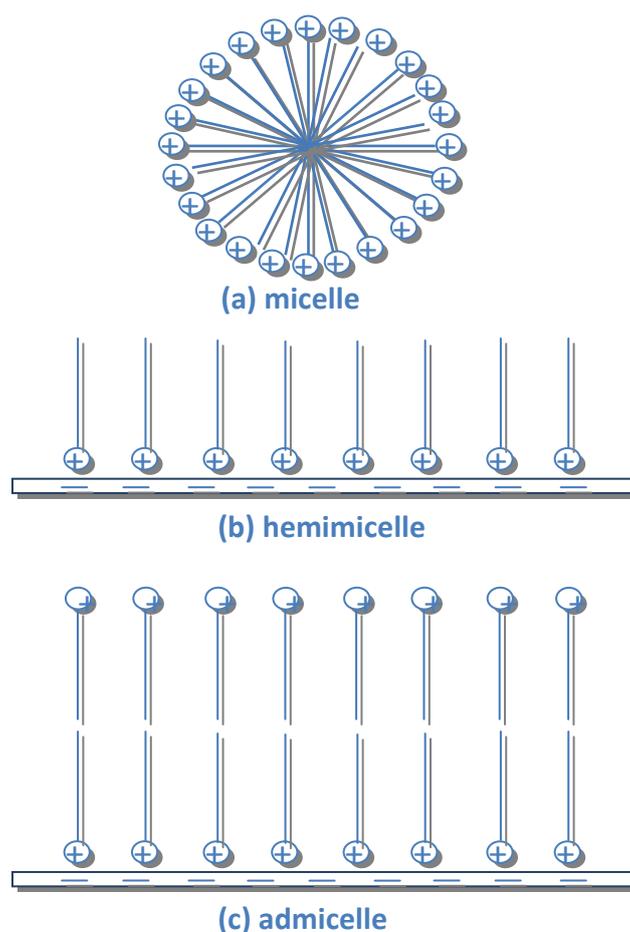
Ces matériaux sont obtenus par l'adsorption de différents matériaux (l'alumine, la silice ou l'oxyde de titane ou de fer) sur des micelles formant les tensio-actifs ioniques lorsque leur concentration est légèrement supérieure que la concentration micellaire critique (CMC). Deux structures peuvent être produites en fonction de la concentration de tensioactif, le pH et la force ionique du milieu: hemimicelles ou admicelles (figure 7).

Les adsorbants hemimicelles, montrent une grande affinité avec les analytes moins polaires car leur queue hydrophobe est en contact direct avec l'échantillon, tandis que les analytes polaires sont renforcés par l'interaction entre la partie ionique de tension-actif admicelle et l'échantillon<sup>125</sup>. L'avantage majeur de ce type d'adsorbant est la capacité d'extraire des analytes à large polarité. En conséquence, des travaux ont été réalisés pour l'extraction de 17 pesticides de différente nature, utilisant un adsorbant à base d'alumine dont une partie hemimicelle et l'autre admicelle<sup>103</sup>. Récemment, des alumines adsorbés par TBACl SDS dont la qualité admicelle, sont utilisés avec succès, pour l'élimination des pesticides dans l'eau de rivière et souterraine, avec une réduction du solvant<sup>104</sup>.

---

<sup>103</sup>A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 608 (2008) 61.

<sup>104</sup>N. Luque, S. Rubio, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 74.



**Figure 7.** : Présentation de trois types de tensioactif (a) Micelle, (b) Hemimicelle et (c) Admicelle.<sup>105</sup>

Un autre type d'absorbants qui peuvent être inclus dans ce groupe sont les silicates mésoporeux. Ils sont synthétisés en fonction de différents agents tensioactifs ioniques. Leur découverte était en 1992<sup>106</sup>. Ces excellentes propriétés : surface spécifique élevée à l'ordre de  $1600 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  et la taille de pores allant de 2 jusqu'au 50 nm, ont ouvert plusieurs intérêts dans l'adsorption des contaminants<sup>107</sup>.

Trois éléments nécessaires pour la synthèse de la silice mésoporeuse : une source de silice, un agent tensioactif ionique et un solvant (habituellement est l'eau). Une fois que le matériau est synthétisé, l'agent tensio-actif est éliminé par une calcination ou une extraction avec un solvant organique approprié.

<sup>105</sup> S. Gangula, S.Y. Suen, E.D. Conte. *J. Microchem.* 95 (2010) 2-4.

<sup>106</sup> C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, *Nature (London)* 359 (1992) 710.

<sup>107</sup> S. Rubio, D. Pérez-Bendito. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (7+8) (2003) 470-485.

Il existe différents types de matériaux mésoporeux tableau 4, en fonction de l'itinéraire qui est utilisé pour leur synthèse. En premier la silice de type M41S, elle regroupe notamment les phases MCM-41 de structure hexagonale, MCM-48 de structure cubique et MCM-50 de structure lamellaire (MCM : Mobil Composition of Matter). Cette famille de mésopore est utilisée en tant que modèle tensioactifs cationiques, comme il peut être synthétisé à la fois dans le milieu acide comme basique. En 1994 l'équipe de G. D. Stucky a ouvert une nouvelle voie de synthèse des matériaux mésoporeux organisés appelée famille des SBA-n (SBA: Santa Barbara Amorphous). Huo et al. rapportent la synthèse des premiers matériaux mésoporeux de type SBA-n préparés à partir de tensioactifs anioniques et cationiques<sup>108</sup>. Ces synthèses ont conduit à la formation des matériaux de type SBA-1, SBA-2 et SBA-3<sup>109</sup>. En 1995, Tanev et al.<sup>110</sup> proposent une nouvelle voie de synthèse en utilisant des tensioactifs neutres. La première famille de matériaux obtenue a été nommée HMS (Hexagonal Mesoporous Silica) synthétisée à partir d'amines primaires. Bagshaw et al, présentent par la suite, une deuxième famille de matériaux appelée MSU-X (MSU : Michigan State University) synthétisée à partir des oxydes polyéthoxylés<sup>111</sup>. En outre, Zhao et al. ont synthétisés à partir de tensioactif non ionique d'autres types de matériaux de la famille SBA-n comme les SBA-11 et SBA-12 en utilisant des tensioactifs polyoxyéthylés ou des SMO de type SBA-15 et SBA-16 à partir des copolymères à blocs<sup>112</sup>.

---

<sup>108</sup> Q. Huo, D. Margolese, U. Ciesla, J. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Petroff, F. Schüth, G. D. Stucky, *Nature* (1994) 368-317.

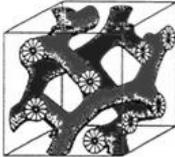
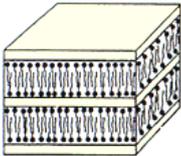
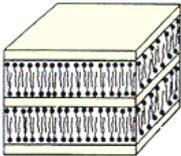
<sup>109</sup> Q. Huo, D. I. Margolese, G. D. Stucky, *Chem. Mater* 8 (1996) 1147.

<sup>110</sup> P. T. Tanev, T. J. Pinnavia, *Science* 267 (1995) 865.

<sup>111</sup> S. A. Bagshaw, T. J. Pinnavia, *Angew. Chem. Int. Ed* 35 (1996) 1102.

<sup>112</sup> a) D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky. *Science*. 279 (1998) 548.

b) D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998), 6024.

Surfactant	Type du matériau	Structures
Surfactant cationique	MCM-41 (Hexagonale)	<p><b>Hexagonale</b></p> 
	MCM-48 (Cube)	
	MCM-50 (Lamellaire)	
Surfactant non-ionique	MSU-X (Hexagonale)	<p><b>Cube</b></p> 
		<p><b>Lamellaire</b></p> 
Copolymère neutre	SBA-15 (Hexagonale)	
	SBA-12 (Hexagonale)	
	SBA-16 (Cube)	
	SBA-1 (Cube)	

**Tableau 4** : Les différents types de silices mésoporeuses obtenus<sup>107</sup>

Au début, les matériaux mésoporeux sont utilisés comme phases stationnaires de la chromatographie liquide pour la séparation des analytes de nature acides, basiques ou neutres<sup>113</sup> et même les macromolécules telles que les protéines<sup>114</sup>.

### b) Polymères mixtes

Les adsorbants mixtes où de double phase sont très spécifiques pour une grande variété d'analytes, dont ils combinent deux types d'interaction. Les premiers sont de silice greffée par échangeurs d'ions, mais maintenant ils sont remplacés par des polymères qui peuvent

<sup>113</sup> M. Grün, A.A. Kurganov, S. Schacht, F. Schüt, K.K. Unger, *J. Chromatogr. A.* 740 (1996) 1.

<sup>114</sup> a) K. Nakanishi, R. Takahashi, T. Nagakane, K. Kitayama, N. Koheiya, H. Shikata, N. Soga, *J. Sol.-Gel Sci. Technol* 17 (2000) 191.

b) K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, *J. Sol.-Gel Sci. Technol* 13 (1998) 163

fonctionner comme des échangeurs d'ions (rétention des analytes de nature acide-base) ou agir comme une phase inverse.

Les polymères mixtes sont classés en échangeurs cationiques et anioniques leur force dépend de groupement ionique lié à la résine. La plupart des fabricants ont commencé à produire leurs propres polymères en phase mixte avec différents matériaux, le premier adsorbant mixte commercial développé par Waters. Ces nouveaux adsorbants contiennent en commun le squelette Oasis HLB modifié ; greffé par des groupes sulfoniques (Oasis MCX), des acides carboxyliques (Oasis WCX), diméthylbutylamine (Oasis MAX) et la pipérazine (Oasis WAX) ont été utilisés principalement dans l'analyse environnementale pour l'élimination de médicaments dans l'eau<sup>115</sup>.

Autres sociétés ont commercialisé des adsorbants mixtes très similaires à ceux de Waters tels que Phenomenex, qui a développé un groupe appelé Strata-X sorbants, Agilent a développé Bond Elut Plexa et Biotage un groupe d'Evolute. Récemment, la société SiliCycle a commercialisé une nouvelle famille des adsorbants mixtes appelés SiliaPrepX.

En général, la principale utilisation des adsorbants mixtes a mis l'accent sur l'élimination sélective des contaminants de différents échantillons complexes (eaux usées, des échantillons biologiques et des aliments)<sup>116</sup>. Par exemple, les cartouches Oasis MAX sont utilisées pour l'isolement d'anthocyanines (pigments polyphénoliques considérable pour la santé) dans différents fruits et légumes<sup>117</sup>. Dans un travail récent<sup>118</sup> ou les cartouches de type Oasis Max sont utilisées pour l'extraction des médicaments dans l'eau de surface, les rejets industriels et les eaux usées, à très basses concentrations en nanogramme par litre. Un autre domaine d'application de ce type d'adsorbant est dans l'analyse de médicaments dans le plasma<sup>119</sup>.

Autres adsorbants de phase mixte sont d'utilisés en série (deux phases ou plus) pour extraire une variété d'analytes de différentes propriétés. Par exemple, les cartouches Oasis MCX et Oasis MAX sont utilisés avec succès ; pour extraire les médicaments de nature acides, basiques et neutres dans les eaux usées<sup>120</sup>.

---

<sup>115</sup> a) L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Pitarch, M. Ibáñez, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3078

b) N. Fontanals, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 1286 (2013) 16

c) M.A. Sousa, C. Gonçalves, E. Cunha, J. Hajslová, M.F. Alpendurada, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 807.

d) L.H.M.L.M. Santos, P. Paíga, A.N. Araújo, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, *J. Chromatogr. B* 930 (2013) 75).

<sup>116</sup> a) N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatography A*, 1152 (2007) 14–31

b) N. Gilart, F. Borrull, N. Fontanals, R.M. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 1 (2014) e8–e18).

<sup>117</sup> J. He, M.M. Giusti, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7914].

<sup>118</sup> I. Carpinteiro, B. Abuin, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2471.

<sup>119</sup> a) C. Emotte, O. Heudi, F. Deglave, A. Bonvie, L. Masson, F. Picard, A. Chaturvedi, T. Majumdar, A. Agarwal, R. Woessner, O. Kretz, *J. Chromatogr. B* 895 (2012) 1.

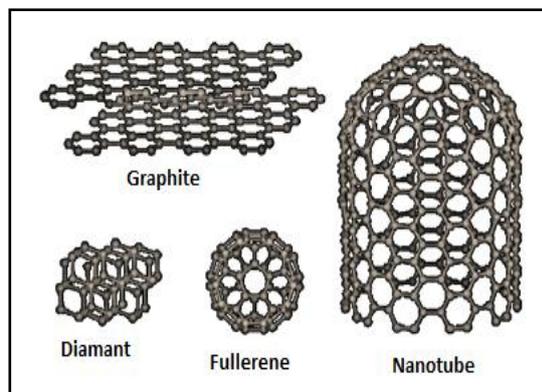
b) M.E. Lame, E.E. Chambers, M. Blatnik, *Anal. Bioanal. Chem.* 419 (2011) 133.

<sup>120</sup> M. Lavén, T. Alsberg, Y. Yu, M. Adolfsson-Erici, H. Sun, *J Chromatogr A* 1216 (2009) 49-62.

### c) Nanotubes de carbone

A l'état naturel, le carbone existe sous deux formes cristallines, le graphite et le diamant. En 1985 R.Curl et al<sup>121</sup> ont découvert une nouvelle forme d'organisation du carbone, la molécule C<sub>60</sub>, qui comprend 60 atomes de carbone disposés aux sommets d'un polyèdre régulier dont les faces sont des hexagones et des pentagones à l'image d'un ballon de football. Cette molécule, en forme de cage fermée, est la plus étudiée de la famille des fullerènes qui peuvent contenir de 28 plus de 100 atomes de carbone.

En 1991 S.Iijima<sup>122</sup> a observé en microscopie électronique un sous produit de la synthèse des fullerènes qui se présentait comme un dépôt noirâtre, dur et filamenteux. Ce dépôt s'est avéré être constitué de tubes creux, fermés à leurs extrémités et composés de carbone cristallisé. Ces structures particulières de diamètre nanométrique et de longueur micrométrique, seront nommées par la suite nanotube de carbone. Ils constitueront, avec les fullerènes, la troisième variété allotropique du carbone comme représenté sur la *figure 8*.



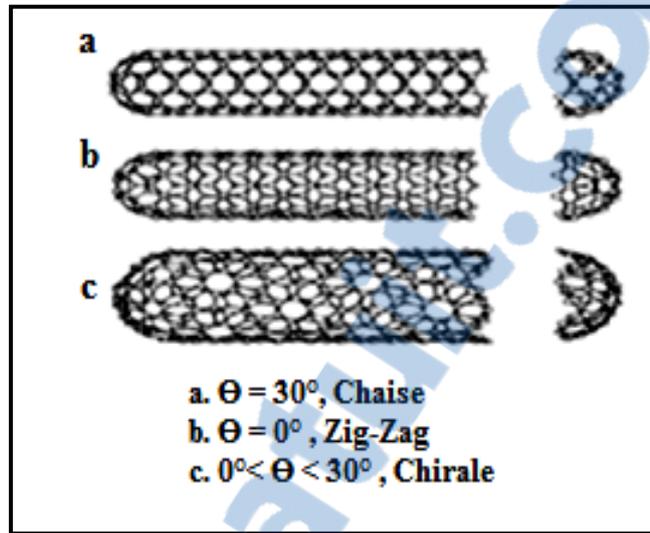
**Figure 8** : les différentes formes allotropiques du carbone.

Un nanotube de carbone est composé d'un ou plusieurs feuillets de graphène (un plan graphitique dans lequel les atomes de carbone sont organisés selon un réseau hexagonal à l'image d'un nid d'abeilles) enroulés, suivant un rayon de courbure nanométrique, de façon à former une structure cylindrique. L'angle d'enroulement du feuillet de graphène, appelé hélicité ( $\Theta$ ) fixe la structure du nanotube. Cet angle varie de 0 à 30° compte tenu de la symétrie

<sup>121</sup> R. Curl, H. Kroto, R. Smalley, *Nature* 318 (1985) 162.

<sup>122</sup> S. Iijima, *Nature* 354 (1991) 56.

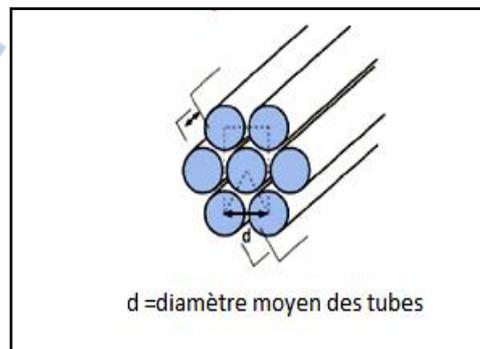
du réseau hexagonal et permet de classer toutes les configurations possibles en trois catégories appelées « chaise », « zig-zag » et « chirale ». *figure 9*



**Figure 9** : les différents modes d'enroulement des nanotubes de carbones.

Deux types de nanotubes de carbone sont connus<sup>123</sup>:

Les nanotubes de carbone mono feuillet nommés également mono-paroi ou monocouche (single-wall carbon nanotubes « SWCNTs ») sont constitués d'un feuillet de graphène enroulé sur lui-même et qui peut être fermé a ses deux extrémités par une demi molécule du fullerène (extrémités coniques, polygonales ou sphériques).les nanotubes de carbone mono feuillet se regroupent lors de leurs synthèse sous forme de fagots, aussi appelés faisceau, les tubes s'empilent de façon compacte et constituent un arrangement périodique de symétrie triangulaire comme schématisé sur la *figure 10*

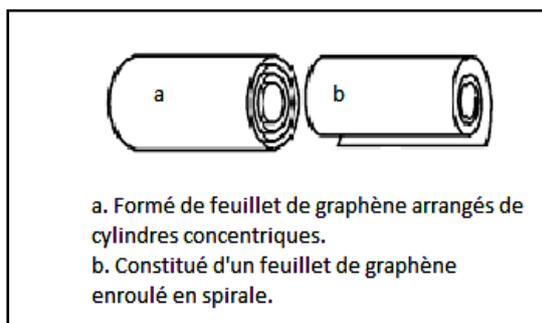


**Figure 10**: faisceau de nanotubes de carbone mono-feuillet(SWCNTs)

<sup>123</sup> a) S. Iijima, T. Ichihashi, *Nature* 363 (1993) 603.

b) D.S. Bethune, C.H. Klang, M.S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vasquez, R. Beyers, *Nature* 363 (1993) 605.

Leur nombre peut atteindre plusieurs dizaines dans un faisceau, les nanotubes de carbone multi-feuillets également appelés multi-paroi ou multi-couches (multi-wall carbon nanotubes « MWCNTs ») sont constitués de plusieurs feuillets de graphène (de 2 à 50) enroulés les uns autour des autres. Deux configurations différentes, basées soit sur un emboîtement de feuillets de graphène arrangés en cylindres concentriques dit en « poupée russe », soit sur l'enroulement d'un unique feuillet de graphène en spirale dit en « parchemin », peuvent être rencontrées *figure 11*



**Figure 11:** Nanotubes de carbone multi-feuillet (MWCNTs).

Dans les deux modes d'assemblage, la distance entre deux tubes adjacents est à peu près égale à la distance entre deux plans de graphite, signifiant ainsi que l'assemblage ne modifie pas la nature des liaisons chimiques qui restent identiques à ce qu'elles sont dans le graphite. Les deux types d'assemblage des nanotubes de carbone sont exclusifs et s'obtiennent par des conditions de synthèse radicalement différentes.

### Les propriétés des carbones nanotubes

Les nanotubes de carbone ont suscité un immense intérêt dans le monde de la recherche, car leurs propriétés sont exceptionnelles. Ils sont des matériaux qui possèdent une taille qui varie entre 1 à 100nm dans une ou plusieurs dimensions<sup>124</sup>. Distinctes propriétés thermiques, mécaniques, électroniques, chimiques et biologiques, ne figurent pas dans les matériaux conventionnels ainsi qu'ils rendent ce matériau unique<sup>125</sup>. Cette parfaite combinaison de

<sup>124</sup> a) Y.D. Tretyakov, E.A. Goodilin, *Russ. Chem. Rev.* 78 (2009) 801–820.

b) L. He, C-S. Toh, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 1–15.

<sup>125</sup> a) M-D.J. Cheng, *Environ. Sci. Health* 39 (2005) 2691–2705.

b) T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R.J. Bizios, *Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 475–483.

c) F.-Y. Cheng, S. P-H. Wang, C-H. Su, T-L. Tsai, P-C. Wu, D-B. Shieh, J-H. Chen, P.C-H. Hsieh, C-S. Yeh, *Biomaterials* 29 (2008) 2104–2112.

d) Y-C. Chung, I. H. Chen, C-J. Chen, *Biomaterials* 29 (2008) 1807–1816.

e) C. Deng, J. Chen, X. Chen, C. Xiao, L. Nie, S. Yao, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1272–1277.

propriétés et leurs capacités remarquables<sup>126</sup> ont donné lieu à des performances nettement améliorées<sup>127</sup> et à nouvelles applications dans la physique, la chimie, la biologie, l'ingénierie et l'informatique<sup>128</sup>. En plus de la résistance mécanique élevée et le faible poids, la plupart de caractéristiques exceptionnelles des nanomatériaux sont liés à leurs propriétés de surface (surface, énergétique et la distribution électronique)<sup>129</sup>, qui permettent amélioration des interactions avec de nombreuses entités biologiques<sup>130</sup>. Ces interactions ne dépendent pas seulement au procédé de fabrication mais aussi à la taille et à la géométrie spécifique des nanoparticules<sup>131</sup>. Ainsi ces caractéristiques combinées ont la capacité de former des liaisons hydrogène, interaction  $\pi$ - $\pi$ , forces de dispersion, liaisons datives, et des interactions hydrophobes peuvent affecter la stabilité et la sélectivité de nanomatériaux<sup>132</sup>. Par conséquent, les propriétés distinctives des nanomatériaux ont suscité un grand intérêt en chimie analytique et ont été utilisés pour développer des applications innovantes dans la préparation des échantillons<sup>133,134,135,136</sup>, la séparation<sup>137,138,139,140</sup>, et la détection<sup>141</sup>.

Les nanoparticules à base de carbone ont été largement utilisées dans les applications analytiques. Bien que les raisons du choix dû à la forme allotropique particulière, une grande variété de matériaux à base de carbone sont disponibles et ont été appliquées à des procédures analytiques<sup>142</sup>. Plusieurs utilisations pour la construction et l'amélioration des détecteurs électrochimiques<sup>143</sup>, ainsi que leur emploi dans les membranes à des minces filtrations

<sup>126</sup> K. Yoshimatsu, L. Ye, J. Lindberg, I.S. Chronakis, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008)1208–1215.

<sup>127</sup> E. Engel, A. Michiardi, M. Navarro, D. Lacroix, J.A. Planell, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 39–47.

<sup>128</sup> R.W. Murray, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1723–11723.

<sup>129</sup> H. Liu, T.J. Webster, *Biomaterials* 28 (2007) 354–369.

<sup>130</sup> I. Willner, B. Willner, *Nano Lett.* 10 (2010) 3805–3815.

<sup>131</sup> R.W. Murray, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2688–2720

<sup>132</sup> M. Valcarcel, S. Cardenas, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martinez, R. Lucena, *TrAC Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 34–43.

<sup>133</sup> Y-q. Cai, Y-e. Cai, S-f. Mou, Y-q. Lu, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 245–247.

<sup>134</sup> C. Xiao, S. Han, Z. Wang, J. Xing, C. Wu, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 121–130.

<sup>135</sup> P-R. Sudhir, H-F. Wu, Z-C. Zhou, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7380–7385.

<sup>136</sup> A. Kabir, C. Hamlet, K. Soo Yoo, G.R. Newkome, A. Malik, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 1–11.

<sup>137</sup> J. Kiyokatsu, Y. Kunihiro, C.F. John, R.B. Wilton, *J. Microcolumn Sep.* 4 (1992)187–190.

<sup>138</sup> H. Ming-Feng, H. Chih-Ching, C. Huan-Tsung, *Electrophoresis* 24 (2003)2896–2902.

<sup>139</sup> T. Mari, Y. Katsuyama, K. Nogami, H. Nagata, K. Wakuda, M. Fujimoto, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba, *Lab Chip* 5 (2005) 199–204.

<sup>140</sup> D. Gomes, S.P. Nunes, K-V. Peinemann, *J. Membr. Sci* 246 (2005) 13–25.

<sup>141</sup> a) J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, M. Musameh, *Anal. Chem.* 76 (2004) 298–302.

b) S. Sotiropoulou, V. Gavalas, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 211–215.

c) K. Glynou, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos, V. Syriopoulou, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4155–4160.

d) J. Park, S. Kurosawa, J. Watanabe, K. Ishihara, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2649–2655.

e) V. Bavastrello, E. Stura, S. Carrara, V. Erokhin, C. Nicolini, *Sensor Actuators B* 98 (2004) 247–253.

f) H.J. Haick, *D. Phys. Appl. Phys.* 40 (2007) 7173–7186.

<sup>142</sup> a) M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4788.

b) A. Merkoci, *Microchim. Acta* 152 (2006) 157.

c) M. Valcárcel, B.M. Simonet, S. Cárdenas, B. Suárez, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1783.

d) M. Trojanowicz, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 480.

<sup>143</sup> a) W. Zhang, Y. Xie, X. Ai, F. Wan, J. Wang, L. Jin, J. Jin, *J. Chromatogr. B* 791 (2003) 217.

b) W. Zhang, F. Wan, Y. Xie, J. Gu, J. Wang, K. Yamamoto, L. Jin, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 207.

c) X.N. Cao, J.H. Li, H.H. Xu, J.R. Zhan, L. Lin, K. Yamamoto, L.T. Jin, *Chromatographia* 59 (2004) 167.

d) J. Xu, Y. Wang, Y. Xian, L. Jin, K. Tanaka, *Talanta* 60 (2003) 1123.

(membranes polymères)<sup>144,145</sup>, les CNTs sont utilisés comme des phases stationnaires en LC<sup>146</sup>, GC<sup>147</sup>, en CE utilisés en tant que pseudo phases stationnaires faisant partie du BGE<sup>148</sup> et également en tant que phases stationnaires en CEC<sup>149</sup>. Autre application intéressante est également leur utilisation comme matrices MALDI qui a été étudié à plusieurs reprises avec des intéressants résultats<sup>150</sup>.

L'utilisation de nanotubes de carbone comme adsorbants SPE pour l'extraction de composés organiques et inorganiques est également devenue important ces dernières années lorsque le nombre de travaux a grandement amélioré. Comme il est indiqué précédemment, les uniques propriétés de CNTs la grande surface, la capacité d'établir les interactions  $\pi$ - $\pi$ , l'excellente stabilité chimique, mécanique et thermique, les rendent très captivant comme matériaux de SPE soit pour les non-polaires ou les composés polaires. En général les nanotubes de carbones nos fonctionnalisés sont très conservés à l'extraction de non polaires, et cela demande beaucoup de volume d'éluant pour les interactions de type van der waals<sup>151</sup> entre les atomes de carbone dans les feuilles de graphène et les cycles aromatiques. Au contraire, la rétention des composés organiques polaires est mieux réalisée avec une fonctionnalisation de CNTs<sup>152,153,154</sup>.

- 
- e) J.M. Xu, Y.P. Wang, Y.Z. Xian, L.T. Jin, *Chem. Res. Chin. Univ.* 20 (2004) 529.
- <sup>144</sup> a) A. Srivastava, O.N. Srivastava, S. Talapatra, R. Vajtai, P.M. Ajayan, *Nat. Mater.* 3 (2004) 610.  
 b) M. Majumder, N. Chopra, R. Andrews, B.J. Hinds, *Nature* 438 (2005) 44.  
 c) P. Nednoor, N. Chopra, V. Gavalas, L.G. Bachas, B.J. Hinds, *Chem. Mater.* 17 (2005) 3595.  
 d) F. Peng, C. Hu, Z. Jiang, *J. Membr. Sci.* 297 (2007) 236.  
 e) O. Sae-Khow, S. Mitra, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 3713.
- <sup>145</sup> C. Basheer, A.A. Alnedhary, B.S.M. Rao, S. Valliyaveetil, H.K. Lee, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2853.
- <sup>146</sup> Y. Li, Y. Chen, R. Xiang, D. Ciuparu, L.D. Pfefferle, C. Horváth, J.A. Wilkins, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1398
- <sup>147</sup> a) Q.L. Li, D.X. Yuan, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 203.  
 b) M. Karwa, S. Mitra, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2064.  
 c) M. Stadermann, A.D. McBrady, B. Dick, V.R. Reid, A. Noy, R.E. Synovec, O. Bakajin, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5639.  
 d) L.M. Yuan, C.X. Ren, L. Li, P. Ai, Z.H. Yan, M. Zi, Z.Y. Li, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6384.
- <sup>148</sup> a) Z. Wang, G. Luo, J. Chen, S. Xiao, Y. Wang, *Electrophoresis* 24 (2003) 4181.  
 b) Y. Moliner-Martínez, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 28 (2007) 2573.  
 c) B. Suárez, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 28 (2007) 1714.  
 d) Y. Moliner, S. Cárdenas, B.M. Simonet, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 30 (2009) 169.  
 e) Y. Moliner-Martínez, M. Barrios, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 128.  
 f) X. Xiong, J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, J.R. Delanghe, X. Shen, Y. Yang, *Electrophoresis* 27 (2006) 3243.
- <sup>149</sup> L. Sombra, Y. Moliner-Martínez, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 29 (2008) 3850.
- <sup>150</sup> a) Y. Gholipour, H. Nonami, R. Erra-Balsells, *Anal. Biochem.* 383 (2008) 159.  
 b) M.V. Ugarov, T. Egan, D.V. Khabashesku, J.A. Schultz, H. Peng, V.N. Khabashesku, H. Furutani, K.S. Prather, H.W.J. Wang, S.N. Jackson, A.S. Woods, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6734.  
 c) S. Xu, Y. Li, H. Zhou, J. Qiu, Z. Guo, B. Guo, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6191.  
 d) W.T. Jia, H.X. Wu, H.J. Lu, R.F. Cai, P.Y. Yang, *Acta. Chim. Sin.* 66 (2008) 1681.  
 e) C.H. Wang, J. Li, S.J. Yao, Y.L. Guo, X.H. Xia, *Anal. Chim. Acta* 604 (2007) 158.  
 f) S. Ren, L. Zhang, Z. Cheng, Y. Guo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 333.
- <sup>151</sup> R.Q. Long, R.T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2058.
- <sup>152</sup> a) X. Liu, Y. Ji, Y. Zhang, H. Zhang, M. Liu, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 10.  
 b) M.A. Salam, R. Burk, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1060.  
 c) M. Jiménez-Soto, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5626.  
 d) S. Zhu, W. Niu, H. Li, S. Han, G. Xu, *Talanta* 79 (2009) 1441.  
 e) Q. Li, X. Wang, D. Yuan, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1305.  
 f) W. Du, F. Zhao, B. Zeng, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3751.  
 g) O. Sae-Khow, S. Mitra, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2270.  
 h) Q.L. Li, D.X. Yuan, Q.M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 283.  
 i) A.H. El-Sheikh, J.A. Sweileh, Y.S. Al-Degs, A.A. Insisi, N. Al-Rabady, *Talanta* 74 (2008) 1675.

Les CNT ont été utilisés avec succès en tant que adsorbants SPE pour l'extraction des différentes familles de pesticides<sup>155</sup>, les médicaments<sup>156</sup>, les esters de l'acide phtalique<sup>157</sup>, les composés phénoliques<sup>158</sup> et autres<sup>159,160,161,162</sup> avant leur détermination soit par GC<sup>163</sup>, HPLC<sup>164,165</sup> et par CE<sup>166,167</sup>. La plupart des publiés ont été réalisés sur des matrices aqueuses<sup>168</sup> et juste à plusieurs reprises d'autres matrices différentes que l'eau ont été étudiées. L'extraction directe de jus de fruits<sup>184</sup>, d'huile d'olive vierge<sup>169</sup>, de lait<sup>193</sup>, les boues d'épuration<sup>176</sup>, de l'air<sup>190</sup>, l'urine<sup>192,198,170</sup>, le sang<sup>171</sup>, et aussi l'extraction des sols<sup>185, 172</sup>, l'ail<sup>173</sup>, et les œufs<sup>196</sup>, pour lesquels une procédure d'extraction SPE préalablement est nécessaire.

### IV.3.2 La capacité du l'adsorbant

- 
- j) Y.S. Al-Degs, M.A. Al-Ghouti, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 88 (2008) 487.  
k) Q.X. Zhou, G.H. Xie, J.P. Xiao, W.D. Wang, Y.J. Ding, *Chin. Chem. Lett.* 19 (2008) 95.  
<sup>153</sup> L.M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 33.  
<sup>154</sup> G. Min, S. Wang, H. Zhu, G. Fang, Y. Zhang, *Sci. Total Environ.* 396 (2008) 79.  
<sup>155</sup> a) Yunhe Qu, Qian Sun, Fei Xiao, Guoyue Shi, Litong Jin, *Bioelectrochemistry* 77 (2010) 139-144  
b) D. Du, A. M. Asiri, J. Wang, Y. Lin, *Nanotechnology Applications for Clean Water* (2014) 47-62  
c) S. Li, Y. Gong, Y. Yang, C. He, L. Hu, L. Zhu, L. Sun, D. Shu, *Chemical Engineering Journal* 260 (2015) 231-239.  
d) X-Y. Song, Y-P. Shi, J. Chen, *Food Chemistry* 139 (2013) 246-252.  
e) Y-Y. Zhang, M. A. Arugula, M. Wales, J. Wild, A. L. Simonian, *Biosensors and Bioelectronics*, *In Press*, Available online 22 August 2014 DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.036  
<sup>156</sup> a) K. S. Hasheminasab, A. R. Fakhari, *Analytica Chimica Acta* 767 (2013) 75-80  
b) H. Karimi-Maleh, F. Tahernejad-Javazmi, A. A. Ensafi, R. Moradi, S. Mallakpour, H. Beitollahi, *Biosensors and Bioelectronics* 60 (2014) 1-7.  
c) U. Gianfranco Spizzirri, S. Hampel, G. Cirillo, F. P. Nicoletta, A. Hassan, O. Vittorio, N. Picci, F. Iemma, *International Journal of Pharmaceutics* 448 (2013) 115-122.  
d) M. Foldvari, M. Bagonluri, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 4(2008) 183-200  
e) A. O. Biying, K. T. Yuanting, N. S. Hosmane, Z. Yinghuai, *J. Organometallic Chemistry* 747 (2013) 184-188.  
<sup>157</sup> a) Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, Q. Zhou, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2517.  
c) H.Y. Niu, Y.Q. Cai, Y.L. Shi, F.S. Wei, J.M. Liu, G.B. Jiang, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 927  
<sup>158</sup> Y. Q. Cai, Y.E. Cai, S.F. Mou, Y.Q. Lu, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 245.  
<sup>159</sup> Q.L. Li, D.X. Yuan, Q.M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 283.  
<sup>160</sup> G. Liu, J. Wang, Y. Zhu, X. Zhang, *Anal. Lett.* 37 (2004) 3085.  
<sup>161</sup> C.S. Pan, S.Y. Xu, H.F. Zou, Z. Guo, Y. Zhang, B. Guo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 263.  
<sup>162</sup> J.X. Wang, D.Q. Jiang, Z.Y. Gu, X.P. Yan, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 8  
<sup>163</sup> a) W. Zhang, Y. Sun, C. Wu, J. Xing, J. Li, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2912.  
b) B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, M. Gallego, *Talanta* 79 (2009) 613.  
c) R. Jiang, F. Zhu, T. Luan, Y. Tong, H. Liu, G. Ouyang, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4641.  
<sup>164</sup> a) Z. Guan, Y. Huang, W. Wang, *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 225.  
b) X.Y. Liu, Y.S. Ji, H.X. Zhang, M.C. Liu, *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 10.  
<sup>165</sup> G.Z. Fang, J.X. He, S. Wang, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 12.  
<sup>166</sup> B. Suárez, B. Santos, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 127.  
<sup>167</sup> B. Suárez, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 203.  
<sup>168</sup> a) Q. Zhou, W. Wang, J. Xiao, J. Wang, G. Liu, Q. Shi, G. Guo, *Microchim. Acta* 152 (2006) 215.  
b) Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 152.  
c) M. Biesaga, K. Pyrzynska, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2241.  
d) A.H. El-Sheikh, A.A. Insisi, J.A. Sweileh, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 25.  
e) Q. Zhou, J. Xiao, Y. Ding, *Anal. Chim. Acta* 602 (2007) 223.  
f) Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, *Microchim. Acta* 157 (2007) 93.  
<sup>169</sup> S. López-Feria, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7346.  
<sup>170</sup> M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1139.  
<sup>171</sup> a) Z. Du, Y.L. Yu, X.W. Chen, J.H. Wang, *Chem-Eur. J.* 13 (2007) 9679.  
b) Z. Du, Y.L. Yu, J.H. Wang, *Macromol. Biosci.* 9 (2009) 55.  
<sup>172</sup> Q. Wu, C. Wang, Z. Liu, C. Wu, X. Zeng, J. Wen, Z. Wang, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5504.  
<sup>173</sup> D. Du, M. Wang, J. Zhang, J. Cai, H. Tu, A. Zhang, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 85.

Le deuxième paramètre important à prendre en compte pour le développement d'une procédure SPE est la capacité du support. Elle est dépassée lorsque la quantité d'analytes à extraire est supérieure au nombre de sites actifs à la surface de l'adsorbant. Ceci conduit à une élution anticipée de l'analyte, même pour des volumes inférieurs à  $V_f$ . Une solution simple pour contourner ce problème consiste à augmenter la quantité d'adsorbant. Ce dépassement de capacité reste cependant assez rare car dans la plupart des cas, la SPE s'applique à des composés présents à l'état de trace. La capacité d'une cartouche SPE conventionnelle (support à base de silice greffée, polymères...) est généralement comprise entre 1 et 5 % de la masse d'adsorbant<sup>174,175</sup>. Sa détermination peut s'effectuer après avoir optimisé une procédure d'extraction en mesurant les rendements d'extraction de solutions de concentrations croissantes. Ces rendements d'extraction seront constants puis chuteront, témoignant ainsi de la saturation du support. La capacité est donc identifiée comme étant la quantité maximale d'analyte percolée au-delà de laquelle le rendement d'extraction n'est plus constant.

#### IV.3.3 Le volume de fin de fixation

Si l'adsorbant est suffisamment rétentif, la quantité d'analyte fixée augmentera proportionnellement au volume d'échantillon percolé, améliorant ainsi, pour un même volume d'élution, le facteur d'enrichissement. Cependant, à partir d'un certain volume, les solutés finiront par être élués par le solvant qui constitue l'échantillon. Ce volume est appelé volume de fin de fixation  $V_f$  (ou volume de fuite) et est généralement défini au point où la concentration de l'analyte en sortie de cartouche représente 1% de la concentration percolée. Si les solutions de percolation et de lavage sont de même composition, la somme de ces deux volumes doit impérativement être inférieure au volume de fin de fixation pour obtenir un rendement d'extraction de 100%. Dans le cas d'utilisation d'une solution de lavage plus éluante que la solution de percolation, le volume de fin de fixation diminue. Il faudra alors s'assurer que les volumes choisis n'entraînent pas d'élution anticipée de l'analyte. Sa détermination s'effectue le plus souvent de façon expérimentale en augmentant progressivement les volumes des fractions, tout en maintenant la quantité percolée constante jusqu'à observer une élution de l'analyte.

Les choix respectifs des volumes de percolation et de lavage sont guidés par l'objectif de l'étape d'extraction sur phase solide. Si l'objectif premier est de pré-concentrer l'analyte présent en quantité très faible dans l'échantillon, on privilégiera un volume de percolation

---

<sup>174</sup> V. Pichon, *Techniques de l'ingénieur* P1420 (2006).

<sup>175</sup> C.F. Poole, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 362.

élevé, et donc un volume de lavage faible. En revanche, si l'analyte est présent dans une matrice complexe, on favorisera sa purification en choisissant un volume et/ou une force éluante de lavage élevé.

Il est également à noter qu'un rendement d'extraction de 100%, obtenu avec la somme des volumes de percolation et de lavage inférieure à  $V_f$ , ne signifie pas que la quantité d'analyte dans la fraction d'élution sera maximale. En effet, la quantité maximale d'analytes retenue par l'adsorbant sera obtenue pour un volume de percolation supérieur au  $V_f$ , lorsque la concentration en analyte en sortie de colonne tendra vers la concentration percolée. Le rendement d'extraction sera alors faible. Cela pourrait s'avérer utile lorsque le  $V_f$  est faible ou lorsqu'une grande sensibilité est exigée. Cependant, cette méthode n'est pas fréquemment utilisée, probablement à cause d'une grande variabilité du rendement d'extraction, et donc d'une quantification peu précise.

#### **IV.4 Extraction en différé et extraction en ligne**

##### **IV.4.1. Extraction en différé**

###### **a) Principe**

On parle d'extraction en différé lorsque l'étape de SPE est totalement dissociée de l'analyse chromatographique. En effet, l'éluant de l'extraction est recueilli dans un flacon et peut éventuellement être évaporé à des fins de concentration ou de changement de solvant. Après reprise dans une solution appropriée, une fraction de l'éluant est injectée dans le système chromatographique.

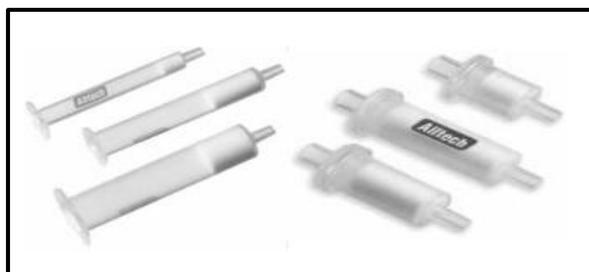
Le principal avantage de l'approche en différé est sa grande flexibilité. De nombreux paramètres peuvent être modifiés et optimisés : la quantité d'adsorbant, la nature et le volume de la solution d'élution ou le format du dispositif d'extraction. D'autre part, la simplicité de l'équipement requis en fait une méthode peu coûteuse. Des robots permettent l'automatisation de la procédure lorsque le nombre d'échantillons à manipuler est important. Cependant, les étapes manuelles d'évaporation, de reprise et d'injection peuvent constituer des sources de pertes, de pollutions et/ou d'incertitudes.

###### **b) Formats**

###### **1. Les cartouches**

La cartouche d'extraction en polypropylène avec ou sans réservoir (figure 12) est le format le plus utilisé. L'adsorbant est contenu entre deux frittés et sa granulométrie est généralement comprise entre 40 et 60  $\mu\text{m}$  afin de permettre un écoulement facile des échantillons et des différentes solutions de la procédure d'extraction sans perte de charge trop importante.

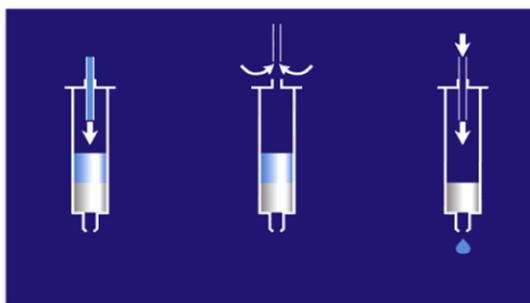
Les cartouches de 3 et 6 mL, contenant 500 mg de phase, sont les plus populaires. Cependant, l'amélioration de la sensibilité des systèmes analytiques permet de réduire les volumes d'échantillons nécessaires, donc les volumes d'adsorbant. Les cartouches de 1 mL, contenant moins de 100 mg d'adsorbant, sont donc de plus en plus répandues<sup>176</sup>.



**Figure 12 :** Cartouches pour l'extraction sur phase solide<sup>177, 178</sup>.

L'application des fluides peut se faire selon deux principes :

- par pression positive : il s'agit d'un système qui s'adapte sur le haut de la cartouche permettant de pousser les liquides par le biais d'une seringue facilitant le réglage débits (figure 13). Cependant, réalisé même pour des petites séries il devient rapidement fastidieux. Ce principe a été automatisé par des industriels autorisant l'extraction de séries.



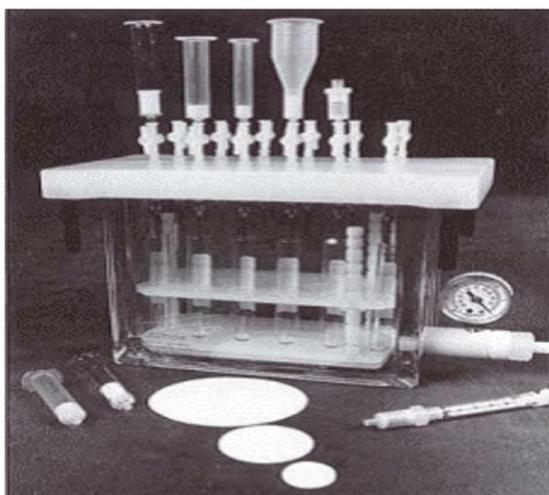
**Figure13 :** Principe schématique de l'extraction en phase solide réalisée en pression positive.

- par pression négative : c'est la méthode la plus répandue. Il s'agit le plus souvent d'un bac en verre possédant un couvercle adaptable percé de 6 à 24 orifices muni d'un robinet de réglage et d'une pompe ou tout autre système à vide permet de tirer le vide en créant une dépression (figure 14). L'extraction de grandes séries peut être réalisée selon le même principe sur des plaques plus adaptées à l'extraction de grands nombres d'échantillons composées de 96 puits (figure 15)

<sup>176</sup> R.E. Majors, *LCGC Europe* December (2001).

<sup>177</sup> [http://static.coleparmer.com/small\\_images/1093700.jpg](http://static.coleparmer.com/small_images/1093700.jpg),

<sup>178</sup> <http://www.restek.com/restek/images/standard/26207phsosp.jpg>,



**Figure 14 :** Cuve pour extraction en phase solide dite en pression négative.

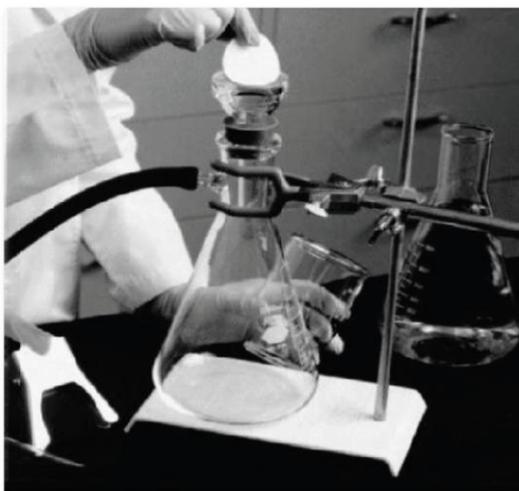


**Figure 15 :** Système d'extraction en phase solide pour plaque 96 puits.

## 2. Les disques

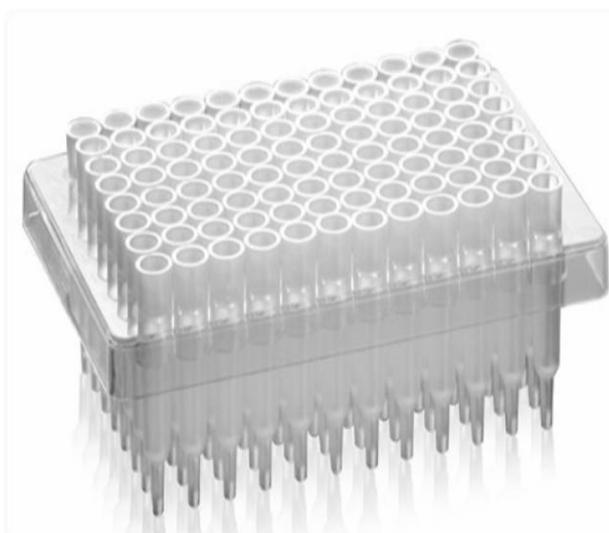
Les disques pour l'extraction sur phase solide sont constitués d'une membrane de PTFE d'environ 0,5 mm d'épaisseur dans laquelle des particules d'adsorbant sont incorporées. Ces particules représentent 90% de la masse du disque. L'importante surface de section permet l'emploi de particules de faible granulométrie (entre 8 et 12  $\mu\text{m}$ ) ainsi que l'utilisation de débits plus élevés que pour les cartouches (jusqu'à 200 mL/min). Ce format est particulièrement intéressant pour l'extraction de grands volumes d'échantillon en un temps court. Comme la montre la Figure 16, ils sont utilisés de la même manière qu'un papier filtre lors d'une filtration sous vide. Cependant, pour l'extraction de plus faibles volumes, un format miniaturisé est

disponible intégrés dans cartouche de polypropylène. Dans ce cas, le PTFE est souvent remplacé par de la fibre de verre<sup>179</sup>.



**Figure 16** : Disque pour l'extraction sur phase solide et son dispositif<sup>d80</sup>.

### 3. Les plaques SPE à 96 ou 384 puits



**Figure 17**: Plaque SPE de 96 cartouches<sup>181</sup>.

Le format de plaques à 96 puits est apparu pour répondre aux besoins du haut débit d'analyse d'échantillons par un processus automatisé. Sur chacun des 96 puits se trouve une cartouche SPE de 1 ou 2 mL contenant 5 à 100 mg d'adsorbant. Les plaques à 384 puits permettent

<sup>179</sup> E.M. Thurman, K. Snavely, *trends in analytical chemistry* 19 (2000) 18.

<sup>180</sup> <http://www.sigmaldrich.com/prodimages/p/p000100.jpg>,

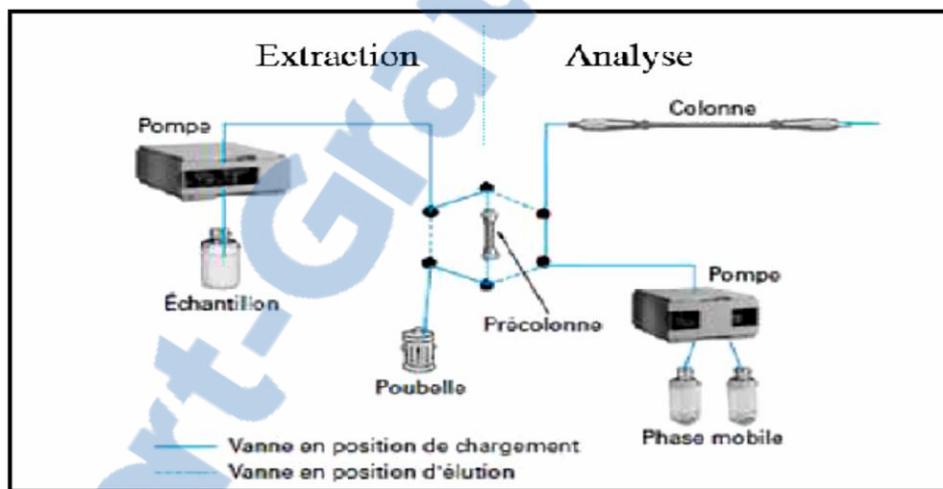
<sup>181</sup> <http://www.waters.com/webassets/other/catalogimages/sepplates.jpg>,

aujourd'hui de traiter plus d'échantillon par unité de temps, toutefois, des problèmes de contaminations de puits à puits ainsi que d'inhomogénéité de débit peuvent survenir<sup>123</sup>.

#### IV.4.2 Extraction en ligne

##### a) Principe

L'adsorbant peut aussi être placé dans une précolonne, installée sur une vanne de commutation à six voies, sur laquelle sont également connectées une pompe permettant la percolation de l'échantillon, une pompe analytique et la colonne analytique. La différence principale avec l'extraction en différé est que les analytes piégés lors de l'extraction sont transférés directement de l'adsorbant à la colonne analytique. Ce type de montage, dit d'extraction en ligne, est présenté en figure 18.



**Figure 18** : Couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la chromatographie en phase liquide<sup>107</sup>.

Les solutions de conditionnement, de percolation et de lavage sont passées à travers la précolonne via la pompe de préconcentration. L'étape d'élution est réalisée en commutant la vanne, ce qui provoque le passage de la phase mobile grâce à la pompe analytique, par la précolonne pour assurer la désorption des composés et leur transfert vers la colonne analytique. Généralement, on réalise le montage de sorte à effectuer une élution en mode rétro-balayage (back flush), c'est-à-dire en procédant à l'élution en sens contraire du sens de percolation. Ceci permet de limiter les phénomènes d'élargissement de bande mais aussi de transférer simultanément des solutés vers la colonne analytique quel que soit leur facteur de rétention sur la précolonne, facilitant ainsi la comparaison des temps de rétention avec une injection directe. Cependant, dans le cas d'extractions d'échantillons environnementaux ou biologiques, ce type de montage engendre la concentration des matières en suspension en tête de précolonne et donc

le transfert de ceux-ci vers la colonne analytique lors de l'élution, ce qui peut engendrer son colmatage.

Contrairement à la méthode en différé où seule une fraction de l'éluant est injectée, ici, la totalité des composés retenus par l'adsorbant est entraînée vers la colonne analytique. Ce gain en sensibilité permet de pouvoir réduire le volume percolé, surtout pour des échantillons pour lesquels de faibles volumes sont disponibles, tout en gardant une sensibilité suffisante. D'autre part, l'approche en ligne minimise le nombre d'interventions à effectuer pour préparer l'échantillon. Les risques de perte ou de contamination que l'on rencontre en mode différé sont donc largement réduits, faisant de l'approche en ligne une méthode plus juste et plus précise. De plus, cette méthode possède l'avantage de consommer moins de solvant organique, l'élution étant assurée par la phase mobile.

Le fait que la précolonne soit placée en série avec le système chromatographique implique quelques contraintes. Tout d'abord, la précolonne et l'adsorbant doivent pouvoir résister aux pressions générées par le système chromatographique.

#### **b) Formats**

Alors que les cartouches ou les disques utilisés pour l'extraction en différé ne sont pas restreints en taille, les dimensions des précolonnes employées pour l'extraction en ligne sont limitées par celles de la colonne analytique. Une longueur de précolonne inférieure à 15 millimètres est recommandée pour le couplage à des colonnes analytiques classiques de longueur comprise entre 15 et 25 cm<sup>182</sup>. Comme déjà évoqué, le diamètre interne de la précolonne doit être inférieur ou égal à celui de la colonne analytique.

Les dimensions des précolonnes utilisées par les automates sont comprises, selon les modèles, entre 5 et 10 mm de longueur pour 2 à 4 mm de diamètre interne<sup>183</sup>. Ces précolonnes sont généralement destinées à un usage unique, même si certaines d'entre elles peuvent être réutilisées.

### **IV.5 Application**

Les applications sont nombreuses et variées tant sur le plan de la matrice que du couplage analytique, allant des techniques de chromatographie en phase liquide et en phase gazeuse équipées de tout type de détecteurs, en passant également par l'électrophorèse capillaire. Pour

---

<sup>182</sup> M.-C. Hennion, *Journal of Chromatography*, A 856 (1999) 3.

<sup>183</sup> S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L.d. Alda, D. Barceló, *Journal of Chromatography*, A 1152 (2007) 97.

illustrer la multitude d'applications seules quelques publications récentes représentatives des différentes problématiques seront présentées.

Dans le domaine du suivi thérapeutique, de nombreuses méthodes publiées utilisent ce principe. Elles concernent aussi bien le dosage de 5 antibiotiques<sup>184</sup>, le dosage d'antirétroviraux par HPLC/DAD<sup>185</sup> que le dosage de neuf antiépileptiques sur 100 µL de plasma<sup>186</sup>, la cyclosporine sur 100 µL de plasma<sup>187</sup>, du budénoside avec une limite de quantification de 50 pg/mL par LC/MS<sup>188</sup>; le dosage de la simvastatine et de l'atorvastatine<sup>189</sup>, du fentanyl avec une limite de quantification de 50 pg/mL par le couplage LC/MS/MS<sup>190</sup>. Le dosage du vigabatrin a également pu être réalisé par électrophorèse capillaire équipée d'un détecteur fluorescent<sup>191</sup>.

La SPE apparaît plus sensible en termes de limite de détection pour un plus grand nombre de molécules mais aussi la seule capable d'extraire des composés plus polaires tels que la morphine ou la benzoylecgonine<sup>192</sup>. Le couplage LC/MS est très affecté par des phénomènes d'effets matrices qui engendrent pour certaines molécules de la suppression (ou de la majoration) d'ions. Une étude a évalué les différents modes de préparation d'échantillons: injection directe, dilution, précipitation des protéines et SPE pour trois liquides biologiques: plasma, urine et salive pour la recherche des stupéfiants. La SPE est apparue nécessaire pour une analyse sensible du plasma<sup>193</sup>. L'extraction SPE est aussi très utilisée dans les études métaboliques car elle permet une meilleure extraction des métabolites, composés plus polaires. Des études du métabolisme ont été faites sur la mitragynine (un des alcaloïdes constituant le Kratom) par LC/MS<sup>194</sup> sur des antirétroviraux<sup>195</sup> ou sur une nouvelle drogue de synthèse, la 4-méthylthioamphétamine (4-MTA)<sup>196</sup>. Elle permet aussi bien évidemment l'identification et la quantification des composés glucurono conjugués dans le plasma<sup>197</sup> ou l'urine<sup>198</sup>. Elle est également très employée pour des matrices alternatives. L'identification et la quantification de

<sup>184</sup> R. Denooz, C. Charlier. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 864 (2008) 161–167.

<sup>185</sup> D. Cattaneo, F. Maggiolo, D. Ripamonti, N. Perico. *J Chromatogr Sci.* 46 (2008) 485–489.

<sup>186</sup> M. Subramanian, AK. Birnbaum, RP. Rimmel. *Ther Drug Monit.* 30 (2008) 347–356.

<sup>187</sup> J. Dénes, M. Katona, A. Hosszú, N. Czuczy, Z. Takáts. *Anal Chem.* 81 (2009) 1669–1675.

<sup>188</sup> B. Streel, B. Cahay, R. Klinkenberg. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877 (2009) 2290–2300.

<sup>189</sup> L. Nováková, H. Vlcková, D. Satínský, P. Sadílek, D. Solichová, M. Bláha, V. Bláha, P. Solich. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877 (2009) 2093–2103.

<sup>190</sup> Y. Takashina, T. Naito, Y. Mino, Y. Kagawa, J. Kawakami. *J Clin Pharm Ther.* 34 (2009) 523–529.

<sup>191</sup> A. Musenga, R. Mandrioli, I. Comin, E. Kenndler, MA. Raggi. *Electrophoresis.* 28 (2007) 3535–3541.

<sup>192</sup> M. Juhascik, AJ Jenkins. *J Chromatogr Sci.* 47 (2009) 553–557.

<sup>193</sup> R. Dams, MA. Huestis, WE. Lambert, CM. Murphy. *J Am Soc Mass Spectrom.* 14 (2003) 1290–1294.

<sup>194</sup> AA. Philipp, DK. Wissenbach, SW. Zoerntlein, ON. Klein, J. Kanogsunthornrat, HH. Maurer. *J Mass Spectrom.* 44 (2009) 1249–1261.

<sup>195</sup> LD. Williams, LS. Von Tungeln, FA. Beland, DR. Doerge. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 798 (2003) 55–62.

<sup>196</sup> AH. Ewald, FT. Peters, M. Weise, HH. Maurer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 824 (2005) 123–131.

<sup>197</sup> FT. Musuamba, V. Di Fazio, R. Vanbinst, P. Wallemacq. *Ther Drug Monit.* 31 (2009) 110–115.

<sup>198</sup> JO. Svensson, M. Andersson, E. Gustavsson, O. Beck. *J Anal Toxicol.* 31 (2007) 81–86.

xénobiotiques dans les cheveux connaît depuis de nombreuses années un essor constant. Beaucoup d'auteurs proposent des méthodes l'utilisant pour la caractérisation de produits stupéfiants<sup>199,200,201</sup>, de substances dopantes<sup>202</sup>, de marqueurs de l'alcoolisme<sup>203</sup>, la recherche de GHB<sup>204</sup> ou encore pour la caractérisation d'une soumission chimique dans le cas où les faits supposés sont éloignés du moment des prélèvements<sup>205</sup>. La salive est aussi un milieu d'investigation toxicologique. Les organophosphorés ont été très répondus par l'extraction sur phase solide<sup>206,145,207</sup>, appliqués sur des échantillons réels. Les produits pharmaceutiques représentent un groupe polyvalent de composés que l'on trouve dans les eaux de surface et usées à des concentrations allant jusqu'à quelques µg/L<sup>208,209,210</sup>. Se présentent soit sous la forme parent, métabolite ou sous les deux formes. Plusieurs adsorbants solide ont été utilisés pour préconcentrer les AINS<sup>211,212,213</sup>.

- 
- <sup>199</sup> E. Cognard, S. Rudaz, S. Bouchonnet, C. Staub, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 826 (2005) 17–25.
- <sup>200</sup> YH. Wu, KL. Lin, SC. Chen, YZ. Chang, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 870 (2008) 192–202.
- <sup>201</sup> R. Cordero, S. Paterson, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 850 (2007) 423–431.
- <sup>202</sup> V. Cirimele, P. Kintz, V. Dumestre, JP. Goullé, B. Ludes, *Forensic Sci Int.* 107 (2000) 381–388.
- <sup>203</sup> (a) I. Tarcumnicu, AL. van Nuijs, K. Aerts, M. De Doncker, A. Covaci, H. Neels, *Forensic Sci Int.* 196 (2010) 121–127.  
(b) H. Kharbouche, F. Sporkert, S. Troxler, M. Augsburg, P. Mangin, C. Staub, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877 (2009) 2337–2343.  
(c) L. Morini, A. Zucchella, A. Poletini, L. Politi, A. Groppi, *Forensic Sci Int.* 198 (2009) 198: 23–27.  
(d) R. Paul, R. Kingston, L. Tsanaclis, A. Berry, A. Guwy, *Forensic Sci Int.* 21 (2008) 176: 82–86.
- <sup>204</sup> KS. Kalasinsky, MM. Dixon, GA. Schmunk, SJ. Kish, *J Forensic Sci.* 46 (2001) 728–730.
- <sup>205</sup> P. Kintz, J. Evans, M. Villain, C. Chatterton, V. Cirimele, *J Anal Toxicol.* 33 (2009) 553–556.
- <sup>206</sup> Q.L. Li, X.F. Wang, D.X. Yuan, *J. Environ. Monit.* 11 (2009) 439.
- <sup>207</sup> H. Katsumata, T. Matsumoto, S. Kaneco, T. Suzuki, K. Ohta, *J. Microchem.* 88 (2008) 82.
- <sup>208</sup> C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 907.
- <sup>209</sup> K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122.
- <sup>210</sup> (a) S.D. Richardson, T.A. Ternes, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3807.  
(b) D.W. Kolpin, M. Skopec, M.T. Meyer, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, *Sci. Total Environ.* 328 (2004) 119.  
(c) T. Herberer, *Toxicol. Lett.* 131 (2002) 5.  
(d) D. Calamari, E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1241.  
(e) S.T. Glassmeyer, E.T. Furlong, D.W. Kolpin, J.D. Cahill, S.D. Zaugg, S.L. Werner, M.T. Meyer, D.D. Kryak, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5157.  
(f) N.M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8220.  
(g) N.M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 101.  
(h) D. Ashton, M. Hilton, K.V. Thomas, *Sci. Total Environ.* 333 (2004) 167.  
(i) P. Roberts, K.V. Thomas, *Sci. Total Environ.* 356 (2006) 143.  
(j) M.D. Hernando, M. Mezcua, A.R. Fernandez-Alba, D. Barceló, *Talanta* 69 (2006) 334.  
(k) Review of the State of Knowledge of Municipal Effluent Science and Research, Report Prepared by Hydromantis Inc. Minnow Environmental Inc., University of Waterloo, Department of Civil Engineering, May 2005.
- <sup>211</sup> J. Radjenović, A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1685.
- <sup>212</sup> J. Martin, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1760.
- <sup>213</sup> (a) T.A. Ternes, M. Bonerz, N. Herrmann, D. Löffler, E. Keller, B.B. Lacida, A.C. Alder, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 213.  
(b) J. Dobor, M. Varga, J. Yao, H. Chen, G. Palko, G. Zaray, *J. Microchem.* 94 (2010) 36.  
(c) A. Jelic, M. Petrovic, D. Barcelo, *Talanta* 80 (2009) 363.  
(d) L. Barron, J. Tobin, B. Paull, *J. Environ. Monit.* 10 (2008) 353.

## V. Chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide (CPL) est une technique de séparation des constituants d'un mélange en solution basée sur le partage des composés entre une phase mobile dans laquelle ils sont solubles et une phase, dite fixe ou stationnaire, qui exerce sur eux un effet retardateur<sup>214</sup>. Ainsi, la séparation des composés repose sur les différences d'affinité et d'interactions d'un composé pour la phase stationnaire. La phase stationnaire peut varier en fonction des interactions requises. Ainsi, selon les phénomènes mis en jeu lors de la séparation, différents types de chromatographie existent : l'adsorption, le partage, l'échange d'ions, la paire d'ions, l'échange de ligands, le transfert de charge et l'exclusion stérique<sup>24</sup>

La CPL à polarité de phase inverse avec un gradient d'élution est la stratégie la plus communément utilisée pour l'analyse multi résidus de pesticides<sup>22,215</sup>.

La majorité des phases stationnaires sont à base de silice chimiquement modifiée par greffage d'une chaîne alkyle Octyl C18. De la silice avec des groupements aminopropyl, cyanopropyl ou phényle peut aussi être utilisée. D'autres phases stationnaires apolaires à base de polymère tel que le copolymère styrène divinylbenzène sont également citées<sup>216</sup>.

Par ailleurs, d'autres phases à base de carbone graphite poreux (PGC) existent. Cependant, ce type de phase est à réserver à l'analyse de composés polaires car les mécanismes mis en œuvre entraînant une trop forte rétention des substances apolaires. Ainsi, le PGC n'est pas préconisé lors du développement de méthodes d'analyse multi-résidus.

De sa large gamme d'application, sa stabilité à long terme, sa facilité d'utilisation, son faible coût et l'amélioration de la sélectivité grâce au détecteur à barrette d'iode (Diode Array Detector DAD), la détection UV a été longtemps la plus utilisée dans l'analyse de résidus de pesticides. Néanmoins, l'identification de pesticides dans des échantillons complexes peut être un problème pour la CPL couplée à des détecteurs conventionnels comme l'UV. Ces techniques ne sont en effet pas suffisamment spécifiques, manquent de sélectivité (grande ressemblance des spectres UV des pesticides d'une même famille chimique) et de sensibilité pour l'analyse de traces de composés présent dans des matrices complexes<sup>217, 218, 219, 220, 221, 222</sup>.

---

<sup>214</sup> R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Lavoisier*, (1991).

<sup>215</sup> T. Kovalczuk, M. Jech, J. Poustka, J. Hajslova, *Anal. Chim. Acta*, 577 (2006) 8-17.

<sup>216</sup> Y. Picó, C. Blasco, G. Font, *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 45-58.

<sup>217</sup> C. Hongenboom, M. P. Hofman, S. J. Kok, W. M. A. Niessen, U. A. Th. Brinkman, *J. Chrom. A*, 892 (2000) 379-390.

<sup>218</sup> J. Hajslová, J. Zrostkova, *J. Chrom. A*, 1000 (2003) 181-197.

<sup>219</sup> Y. picó, G. Front, J. C. Moltó, J. Mañes, *J. Chrom. A*, 882 (2000) 153-173.

<sup>220</sup> M. Careri, A. Mangia, M. Musci, *J. Chrom. A*, 727 (1996) 153-184.

<sup>221</sup> L. G. Freitas, C.W. Götz, M. Ruff, H.P. Singer, S. R. Müller, *J. Chrom. A*, 1028 (2004) 277-286.

<sup>222</sup> J. Sherma, *J. AOAC International*, 80 (1997) 283.

Plus sensible et sélective que l'absorption UV, la détection par fluorescence peut être une alternative intéressante lors de l'analyse de pesticides. Cependant, elle s'applique uniquement aux analytes qui possèdent des fluorophores<sup>41,223,224,225</sup>. Son domaine d'application est donc limité à moins de mettre en œuvre une étape de dérivation pré ou post colonne pour l'élargir<sup>41</sup>.

Le manque de détecteur performant et universel, applicable à une grande gamme de composés et associé à la CPL a été surmonté avec le couplage à la détection par MS grâce au développement d'interfaces adaptées. L'intérêt du couplage de la CPL à la MS réside dans la combinaison d'une part du pouvoir de séparation de la CPL et d'autre part du pouvoir d'identification et de confirmation de la MS<sup>19</sup>. De plus, l'un des atouts de la MS est sa capacité à confirmer l'existence de composés de familles chimiques différentes et qui n'ont pas de chromophores comme par exemple les acides phosphoniques, métabolites des organophosphorés<sup>25</sup>. De plus, la CPL/MS présente d'autres avantages comme la capacité à détecter des composés très polaires et leurs produits de dégradation sans étape préalable de dérivation<sup>226</sup>.

Le premier couplage fonctionnel de la CPL à la MS a été rapporté il y a plus de 25 ans, cependant les difficultés techniques ont été rencontrées pour combiner le volume de phase mobile issue de la CPL au vide nécessaire au fonctionnement du spectromètre de masse. Elles ont donc limité pendant de nombreuses années l'essor et l'utilisation en routine de la CPL/MS comme méthode d'analyse dans les laboratoires de contrôle de résidus de pesticides<sup>227</sup>. Ainsi, jusque dans les années 1990, la majorité des applications dans l'analyse par CPL/MS de résidus de pesticides impliquait l'utilisation d'interfaces de type «thermospray», (TSP) ou de type «particule-beam» (PB)<sup>228</sup>. Même si quelques applications ont été réussies, elles ne sont pas vraiment de sensibilité entre les composés d'une même famille chimique ou de familles chimiques différentes. Malgré les difficultés analytiques pouvant être rencontrées lors de l'utilisation de l'interface PB en CPL à polarité de phase inverses, elle présente l'avantage de fournir des spectres de masse comparables à ceux obtenus en CPG/MS. La situation a fondamentalement été améliorée avec l'introduction et la commercialisation d'interfaces robustes et fiables telles que les sources d'ionisation à pression atmosphérique.

---

<sup>223</sup> F. E. Ahmed, *Trends in Anal. Chem* 20 (2001) 649-661.

<sup>224</sup> E. Hogendoorn, P. van Zoonen, *J. Chrom. A*, 892 (2000) 435-453.

<sup>225</sup> I. R. Pizzutti, A. de Kok, R. Zanella, M. B. Adaime, M. Hiemstra, C. Wickert, O. D. Prestes, *J. Chrom. A* 1142 (2007) 123-136.

<sup>226</sup> C. Aguilar, F. Borrull, M. R. Marcé, *J. Chrom. A*, 805 (1998) 127-135.

<sup>227</sup> J. Slobodník, A. C. Hogenboom, J. J. Vreuls, J. A. Rontree, B. L. M. van Baar, W. M. A. Niessen, U. A. Th. Brinkman, *J. Chrom. A* 741 (1996) 59-74.

<sup>228</sup> J. Slobodník, B. L. M. van Baar, U. A. Th. Brinkman, *J. Chrom. A* 703 (1995) 81-121.

Ainsi, associées à la MS, la CPL et la CPG restent deux techniques séparatives très complémentaires dans le domaine de l'analyse de pesticides. Compte tenu du nombre important de molécules existantes, il n'existe pas de technique capable de toutes les analyser avec une sensibilité satisfaisante<sup>229</sup>. Le grand nombre d'études utilisant à la fois la CPG et la CPL<sup>230</sup> témoigne de cette nouvelle tendance qui trouve son origine dans la diversité des molécules présentant un intérêt à être déterminées et quantifiées.

## **VI.1 Détection par spectrométrie de masse**

### **VI.1.1 principe de la spectrométrie de masse**

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée, afin en particulier d'en déterminer le rapport masse/charge ( $m/z$ )<sup>231</sup>. Cette technique permet l'identification de molécules d'intérêt par transformation des molécules en ions. Un spectromètre de masse est composé de différents éléments : la source d'ionisation, l'analyseur, le détecteur et l'enregistreur. La source permet l'ionisation de l'échantillon à analyser le transfert des ions vers l'analyseur de l'instrument. Ce dernier trie ensuite les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ . enfin, le détecteur collecte les ions en sortie de l'analyseur en leur associant leur rapport  $m/z$  et une intensité. L'enregistreur de traiter le signal et de convertir les informations en spectres de masse et/ou en chromatogrammes lors d'un couplage avec une technique chromatographique<sup>232</sup>.

### **VI.1.2 Sources d'ionisation à pression atmosphérique**

Développées au milieu des années 1990, les sources d'ionisation à pression atmosphérique (Atmospheric pressure ionisation, API) ont permis de s'affranchir ou de limiter les différents problèmes existants lors de l'utilisation d'autres interfaces. Elles ont commencé à remplacer les

---

<sup>229</sup> A. Lutz, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, *Mass Spectrom. Rev* 25 (2006) 838-865.

<sup>230</sup> a) C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Food Control*, 19 (2008) 906-914.

b) G. F. Pang, Y. M. Liu, C. L. Fan, J. J. Zhang, Y. Z. Cao, M. Li X, Y. Li Z, P. Wu Y, T. Guo T, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1366-1408.

c) J. Fillion, F. Sauvé, J. Selwyn, *J. AOAC International* 83 (2000) 698.

d) A. Chaves, D. Shea, D. Danehower, *Chemosphere* 71 (2008) 629-638.

e) G. F. Pang, Y. Z. Cao, J. J. Zhang, C. L. Fan, M. Liu Y, M. Li X, Q. Jia G, Y. Li Z, Q. Shi Y, P. Wu Y, T. Guo T, *J. Chrom. A* 1125 (2006) 1-30.

f) C. Ferrer, M. J. Gómez, J. F. García-Reyes, I. Ferrer, E. M. Thurman, A. R. Fernández-Alba, *J. Chrom. A* 1069 (2005) 183-194.

<sup>231</sup> R. Botter, G. Bouchoux, *Techniques de l'ingénieur, Spectrométrie de masse*.

<sup>232</sup> E. D. Hoffmann, J. Charrette, V. Stroobant, *Spectrométrie de masse, Cours et exercices corrigés, Dunod. (1999)*.

sources de type TSP grâce à leur utilisation, la stabilité du processus d'ionisation<sup>233</sup>. Elles ont amélioré la possibilité d'identification et de confirmation de composés à des concentrations comparables à celles atteintes par CPG/SM<sup>234</sup>. La disponibilité de telles sources robustes qui permettent l'analyse de pesticides divers a contribué à la percée de la CPL couplée à la SM. Il existe actuellement de nombreuses méthodes d'ionisation, chacune étant adaptée à la nature de l'échantillon et au type d'analyse à effectuer, son choix est donc décisif. L'arrivée de sources API a révolutionné l'analyse par CPL/MS de micropolluants organiques tels que les pesticides. L'électrospray (ESI, Electrospray Ionisation) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) font partie de ces sources d'ionisation. Récemment une troisième source est apparue, la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI, Atmospheric Pressure Photo-Ionisation)<sup>235, 236</sup>. Cependant, peu de travaux ont été publiés pour pouvoir en évaluer l'efficacité pour l'analyse de pesticides dans les matrices alimentaires.

#### **IV.1.3 Source Electrospray**

L'ESI est un processus d'ionisation douce qui transforme les ions, majoritairement préformés en solution, en ions en phase gazeuse. Aujourd'hui, le mécanisme du processus d'ionisation par ESI n'est pas encore clairement défini. Cependant, il peut être décrit de la façon suivante : l'écoulement de l'échantillon provenant de la colonne chromatographique entre dans le capillaire de la source ESI. Ce dernier est porté à un potentiel électrique élevé positif ou négatif de 3 à 5 kV. Deux étapes ont lieu lors de la formation des ions par ESI. La première est la formation d'un nuage de gouttelettes (figure 19) au bout de l'aiguille sous l'action du champ électrique appliqué à la sortie du capillaire.

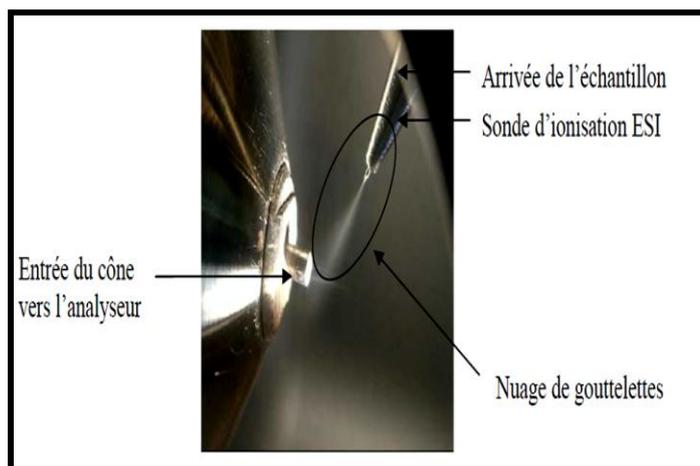
---

<sup>233</sup> P. G. M. Kienhuis, R. B. Geerdink, *Trends in Anal. Chem.* 19 (2000) 249-259

<sup>234</sup> M. Fernández, Y. Pico, J. Manes, *Chromatographia*, 54 (2001) 302-308.

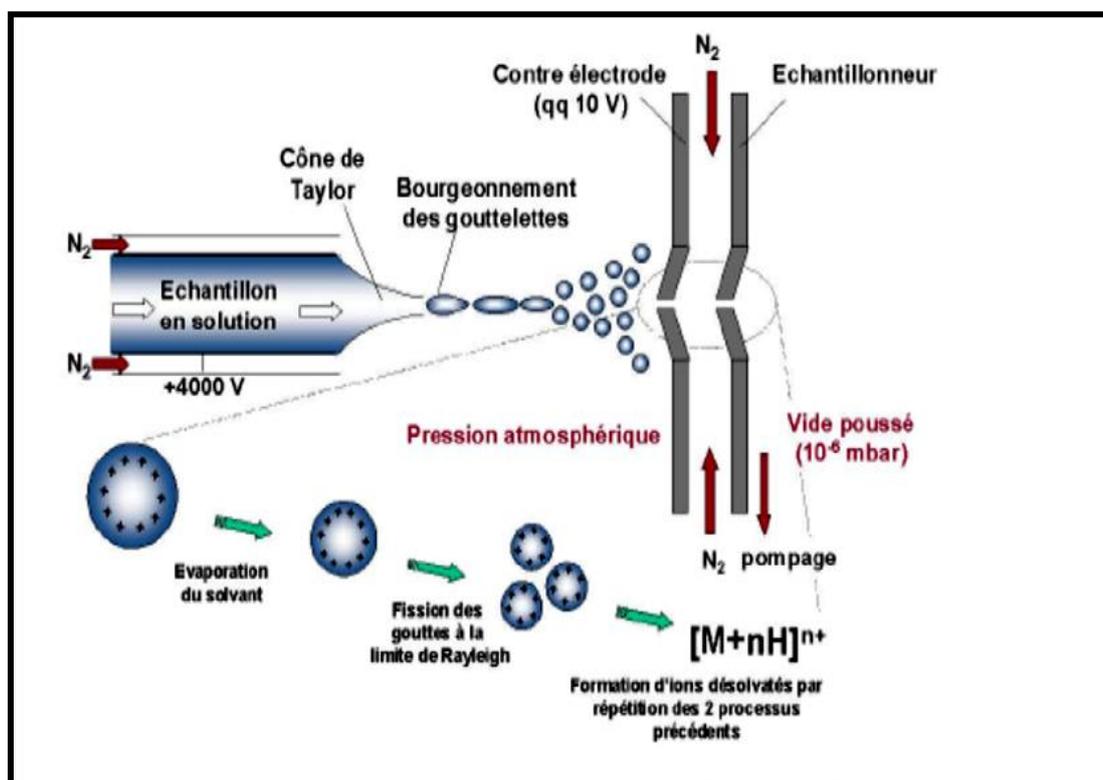
<sup>235</sup> J. P. Rauha, H. Vuorela, R. Kostianen, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 1269.

<sup>236</sup> T. I. Kauppila, T. Kuuranne, E. C. Meurer, M. N. Eberlin, T. Tiaho, R. Kostianen, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5470-5479.



**Figure 19 :** Photo de la source d'ionisation ESI.<sup>237</sup>

Un flux de gaz est conjointement pour aider à l'évaporation du solvant. La haute tension entraine les ions de même polarité vers la surface de la solution pour former «un cône de Taylor» figure 20. Il y a alors formation de gouttelettes chargées avec des ions positifs ou négatifs. Toutefois, les ions majoritairement formés sont de même polarité que la tension appliquée.



**Figure 20:** Processus d'ionisation par ESI<sup>238</sup>

<sup>237</sup> TSQ general court.

La seconde qui consiste à éliminer le solvant est sujette à controverse. Le processus exact de la formation des ions à partir des gouttelettes chargées est encore mal décrit<sup>239</sup>. Il existe principalement deux théories expliquant le processus d'ionisation. La première fait référence au modèle de charge résiduelle. Elle postule que de grandes gouttelettes chargées sont produites par nébulisation pneumatique. C'est à dire que, lors du passage de la solution travers le capillaire à l'extrémité duquel est appliquée une tension suffisamment élevée, la solution est dispersée en un spray très fin de gouttelettes chargées. L'évaporation du solvant entraîne le rétrécissement des gouttelettes et donc l'augmentation de leur charge surfacique figure 4. Par la suite, à la limite e «Rayleigh». La répulsion coulombienne dépasse la tension superficielle et induit l'éclatement des gouttelettes. Cette explosion coulombienne forme une série de petites gouttelettes faiblement chargées. Les processus de rétrécissement et d'explosion sont répétés jusqu'à l'obtention d'ions individuels<sup>240</sup>. La seconde théorie, proposée un peu plus tard est le modèle d'évaporation d'ions. Dans ce modèle, il est considéré que les gouttelettes d'un rayon inférieur à 10nm peuvent permettre l'émission directe d'ions gazeux. L'état de charge des ions dépendra du nombre de charges transférées à partir de la surface de la gouttelette de l'ion pendant la désorption.

Le procédé d'ionisation peut conduire à la formation d'ions mono-chargés de type  $[M+H]^+$  en mode positif ou  $[M-H]^-$  en mode négatif mais également à des ions de charges multiples appelés ions multichargés  $[M+nH]^{n+}$  ou  $[M-nH]^{n-}$ . Il arrive parfois que des ions majoritaires correspondant à des adduit soient formés par combinaison de l'ion moléculaire du composé d'intérêt avec une impureté de la phase mobile (ions sodium, potassium ou ammonium)<sup>40</sup>.

#### **VI.1.4 Source d'ionisation à pression atmosphérique**

A la différence de la source ESI, les réactions ions-molécules du processus d'ionisation par APCI se produisent essentiellement en phase gazeuse<sup>80</sup>. Le liquide est vaporisé par un tube de nébulisation chauffé à de hautes température (de 250 à 500°C). Ces températures élevées doivent être prises en considération lors de l'analyse de composés thermo-dégradables.

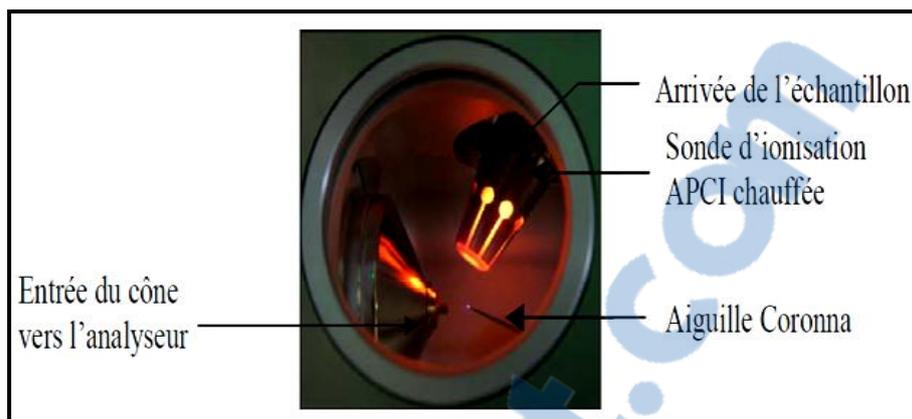
---

<sup>238</sup> S. J. Gaskell, *J. Mass Spectrom* 32 (1997) 677-688.

<sup>239</sup> a) M. S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 136 (1994) 167-180.

b) J. B. Fenn, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 4 (1993) 524-535.

<sup>240</sup> Manuel de cours dispensé par « Thermo Electron European Training Institute », *TSQ Quantum Operations, Course Manual*.

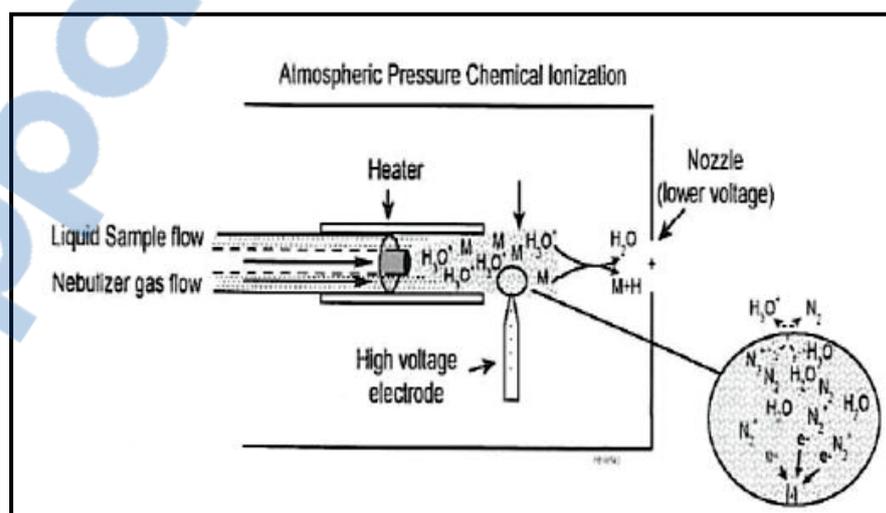


**Figure 21** : photo de la source d'ionisation APCI.

Le processus d'ionisation se déroule en trois étapes :

- 1) La charge corona (*figure 21* produit un jet d'électrons qui permet l'ionisation du gaz «nébulisant» par déplacement d'électrons. Des primaires de type  $N_2^+$  et  $O_2^+$  sont alors formés.
- 2) Les ions primaires réagissent alors immédiatement avec les molécules du solvant de la phase mobile pour former des ions réactifs de type  $H_3O^+$  en mode positif (*figure 22*).
- 3) Ces ions réactifs vont ensuite réagir principalement par transfert de proton avec les molécules caractéristiques des composés pour former des ions de type  $[M+H]^+$  en mode positif ou  $[M-H]^-$  en mode négatif.

Ce sont ces trois étapes qui font de l'APCI, une méthode d'ionisation chimique.



**Figure 22**: représentation schématique du processus d'ionisation par APCI en mode positif<sup>241</sup>.

<sup>241</sup> E. M. Thurman, I. Ferrer, A. Fernandez-Alba, *Comprehensive Analytical Chemistry, Volume XLIII, Chapter 8 : LC-MS. I : Basic principles and technical aspects of LC-MS for pesticide analysis*

En général, les ions formés par les sources APCI correspondent à des molécules protonées en mode d'ionisation positif ou déprotonées en mode négatif. De même que pour l'ESI, il se peut parfois que des ions supplémentaires correspondants à des adduits soient formés.

## VI. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

### ➤ *Principe et généralités*

La spectrométrie de masse en tandem ( $SM^2$ ) constitue un apport très important de la chimie analytique. Elle permet d'étudier les caractéristiques de fragmentations des molécules étudiées. Une première étape consiste à sélectionner un ion stable particulier issu de la source d'ionisation et appelé ion parent ou précurseur. Cet ion est ensuite excité pour mener à sa fragmentation. L'analyse des ions issus de la décomposition (ions fils, produits ou de fragmentation) est alors effectuée. L'analyse des composés par CPL/ $SM^2$  s'effectue donc à travers la détection de fragments provenant d'ions précurseurs précédemment sélectionnés.

Parmi les appareils qui permettent d'opérer en mode  $SM^2$ , Le triple et quadripôle et la trappe ionique sont les plus largement utilisés pour l'analyse de composés de faibles poids moléculaires<sup>39, 40, 242</sup>. Ainsi, ces appareils présentent une facilité d'utilisation, une plus grande robustesse et un coût plus faible en comparaison aux analyseurs à temps de vol (TOF, Time of Flight) ou à transformée de fourrier (FT-ICR, Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance). L'analyseur TOF est basé sur la mesure du temps écoulé depuis le départ des ions qui permet de calculer les rapports  $m/z$  et donc la masse des ions correspondants. Il a souvent été utilisé lors d'analyse de haute résolution, l'erreur de masse étant inférieure à 2mDa. Cette capacité permet une meilleure discrimination du bruit de fond<sup>243</sup>. Le principal avantage de ce type d'instrument est l'identification de pics inconnus dans un échantillon malgré l'absence d'étalons<sup>244</sup>. Mais, cet avantage n'est pas nécessaire lors des analyses de routine visant à vérifier la conformité (concentration du composé ciblé inférieure à la LMR).

Par ailleurs, ces dernières, des appareils hybrides sont apparus tels que le quadripôle couplé à un temps de vol (Q-TOF). Ces appareils dont le prix très élevé permettent de combiner les points forts des analyseurs quadripôles et des temps de vol. Ils sont constitués d'un double quadripôles (1<sup>er</sup> analyseur et cellule de collision) et d'un analyseur à temps de vol

<sup>242</sup> C. Soler, J. Mañes, Y. Picó, *J. Chrom. A*, 1067 (2005) 115-125.

<sup>243</sup> a) A. C. Hogenboom, W. M. A. Niessen, D. Little, U. A. T. Brinkman, *Rap. Comm. Mass Spec* 13 (1999) 125-133.

b) I. Ferrer, J. F. García-Reyes, M. Mezcuá, E. M. Thurman, A. R. Fernández-Alba, *J. Chrom. A* 1082 (2005) 81-90.

<sup>244</sup> a) J. F. García-Reyes, I. Ferrer, E. M. Thurman, A. Molina-Díaz, A. R. Fernández-Alba, *Rap. Comm. Mass Spec* 19 (2005) 2780-2788.

b) E. M. Thurman, I. Ferrer, A. R. Fernández-Alba, *J. Chrom. A* 1067 (2005) 127-134

comme second analyseur. L'utilisation d'instrument hybride comme Q-TOF permet un haut degré de confirmation basé sur la combinaison du temps de rétention, de la masse de l'ion quasi-moléculaire sélectionné par le quadripôle et du spectre de masse de fragmentation obtenu par l'analyseur à temps de vol<sup>245</sup>. Ainsi, bien que l'utilisation des Q-TOF puisse être une bonne alternative pour déterminer les masses avec exactitude, elle reste encore très peu répondue dans le domaine de l'analyse de pesticides<sup>40</sup>. De plus, la sensibilité des instruments hybrides tel que le Q-TOF est inférieure à celle des triples quadripôles<sup>246</sup>. En outre un autre des inconvénients majeurs est la gamme de linéarité très restreint des Q-TOF ce qui peut représenter une limitation lors de la quantification des résidus de pesticides en routine.

## VI.1 CPL/SM2 de type « triple quadripôle » et « trappe ionique »

### Triple quadripôle

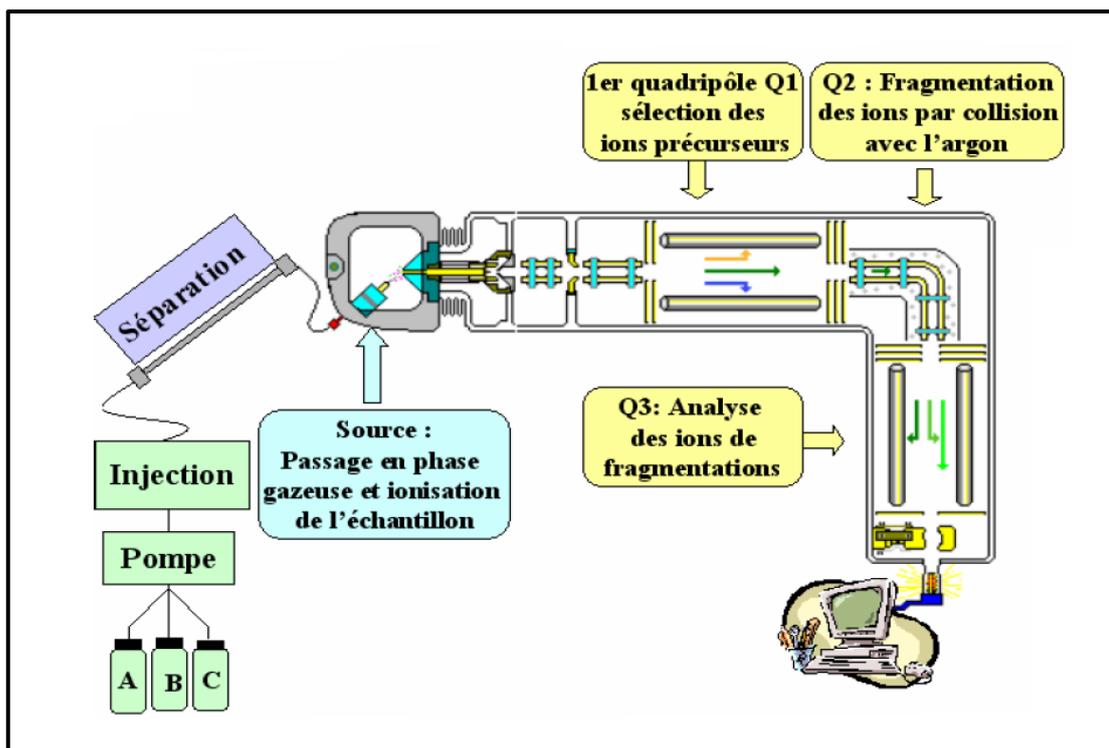
Le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem à analyseur de type triple quadripôle est schématisée sur la figure 23. La détection par spectrométrie de masse en tandem de type triple quadripôle repose sur la mise en série de trois quadripôles. Premier et troisièmes quadripôles fonctionnent comme des filtres de masse qui selon le mode de fonctionnement lissent passer tous les ions ou certains ions présélectionnés. Le second est une chambre de collision ou les ions isolés sont fragmentés ; ces fragments sont ensuite analysés par le troisième quadripôle, qui filtre les ions issus de la fragmentation<sup>247</sup>. L'avantage d'un tel couplage est l'augmentation de la sélectivité via l'utilisation de deux filtres de masse en série.

<sup>245</sup> F. Hernandez, M. Ibanez, J. V. Sancho, O. J. Pozo, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4349-4357.

<sup>246</sup> O. Núñez, E. Moyano, M. T. Galceran, *Anal. Chim. Acta* 525 (2004) 183-190.

<sup>247</sup> T. Goto, Y. Ito, S. Yamada, H. Matsumoto, H. Oka, H. Nagase, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 225-232.



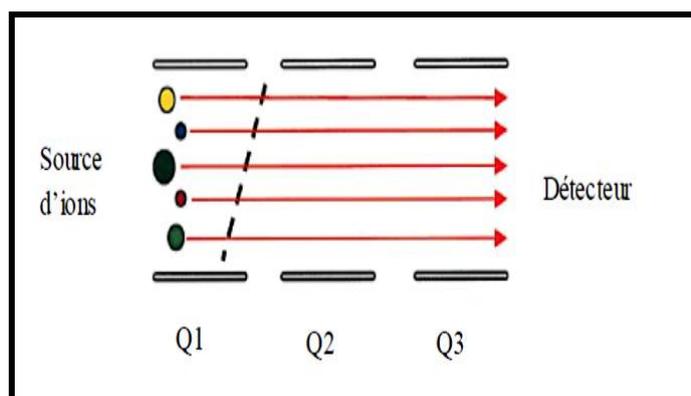


**Figure 23 :** Schéma du couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse en tandem

Différents modes d'acquisitions sont disponibles lors de la mise en œuvre de la CPL/MS de type triple quadripôle. En spectrométrie de masse, le mode balayage (« full scan ») et le mode acquisition d'un rapport  $m/z$  donné sont possibles. Par contre en mode spectrométrie de masse tandem, quatre modes d'acquisitions supplémentaires sont disponibles : le mode balayage des ions de fragmentation produits (« Product ion scan »), le mode balayage des ions précurseurs (« precursor ion »), le mode perte de neutre (« Neutral Loss ») et le mode balayage de plusieurs ions de fragmentation (« MRM, Multiple Reaction Monitoring »). Ces différents modes d'acquisition sont illustrés et explicités ci –après.

### Mode balayage ou « full scan »

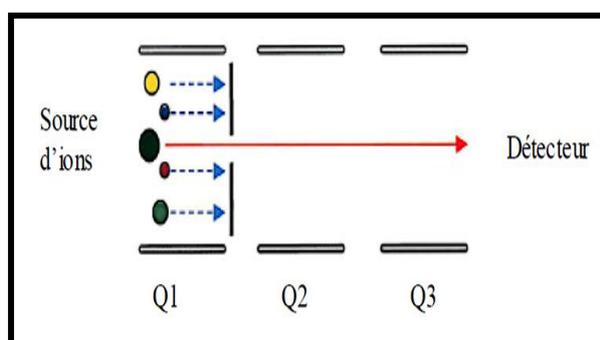
Lors d'une acquisition en mode de balayage « full scan », un intervalle de rapport  $m/z$  est balayé. Il en résulte la détection d'un grand nombre d'ions produits dans la source et ayant des rapports  $m/z$  différents (figure24). Ce mode d'acquisition peut être effectué avec le premier ou le troisième quadripôle. Les deux autres sont alors inactifs et ne servent qu'à focaliser les ions vers le détecteur.



**Figure 24 :** Représentation schématique du mode « full scan »

### Mode Single Ion Monitoring (SIM)

Le mode d'acquisition d'un rapport  $m/z$  donné « SIM, Mode Single Ion Monitoring » est en revanche plus sélectif car il permet le suivi d'un rapport  $m/z$  donné pendant un temps fixé (figure 25). Ce mode d'acquisition permet d'augmenter la sélectivité et par conséquent la sensibilité du signal. Il peut être effectué avec le premier quadripôle Q1 et le troisième quadripôle Q3 devient inactif comme la cellule de collision et joue le rôle de lentille ou vice-versa.

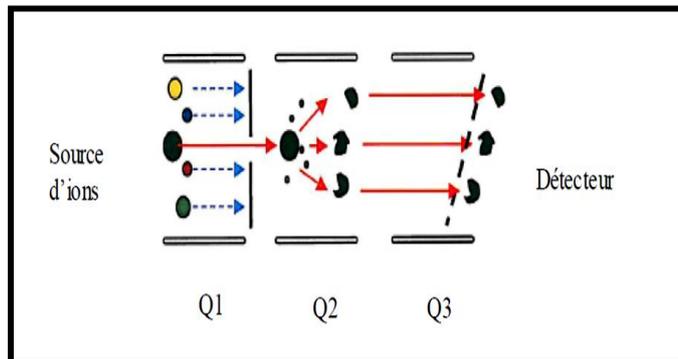


**Figure 25 :** Représentation schématique du mode «SIM».

### Mode d'acquisition des ions de fragmentation

Le mode d'acquisition des ions de fragmentation produits « Product Ion Scan » nécessite la mise en œuvre des trois quadripôles (figure 26). Dans un premier temps, la source va produire des ions précurseurs (ou ions parents) qui vont être sélectionnés par le premier quadripôle Q1. Ces ions sont ensuite fragmentés par collision avec un gaz inerte au sein du quadripôle Q2. Tous les ions de fragmentations ou ions fils obtenus sont alors focalisés vers le troisième quadripôle Q3 puis détectés. Ce mode de détection est très sélectif car deux ions précurseurs

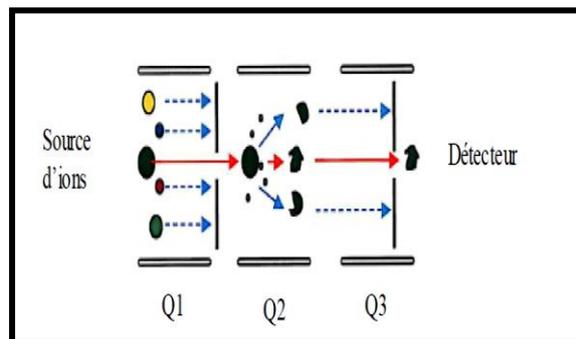
ayant le même rapport  $m/z$  ne se fragmentent pas de façon identique et conduisent à des ions fils différents qui permettent leur différenciation.



**Figure 26** : Représentation schématique du mode « Product Ion Scan ».

### Mode Multiple Reaction Monitoring (MRM)

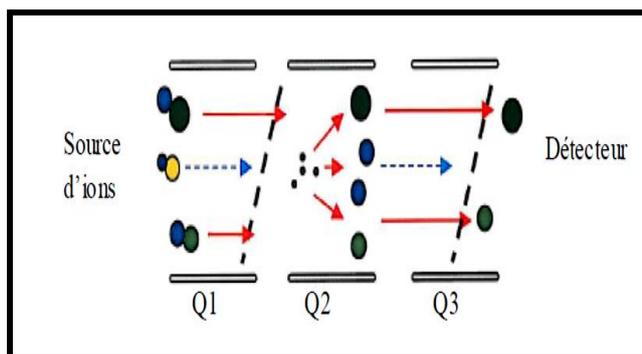
Le mode « MRM » permet le suivi des transitions particulières entre les ions parents et leurs ions de fragmentation (figure 27). Ce mode très sélectif est donc souvent utilisé en analyse multi résidus.



**Figure 27** : Représentation schématique du mode « MRM ».

### Mode perte de neutre

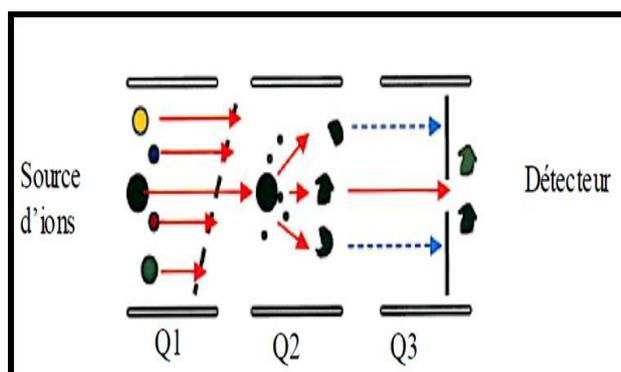
En mode perte de neutre dit « Neutral Loss » (figure 28), les deux analyseurs Q1 et Q3 balayent une gamme de masse simultanément et avec décalage de masse constant. Le spectre établi présentera alors tous les ions parents capables de se fragmenter en générant un neutre de masse égale au décalage imposé.



**Figure 28:** Représentation schématique du mode « Neutral Loss ».

### Mode parent

Enfin, le mode « Precursor Ion Scan » qui est aussi appelé le mode « parent » permet de rechercher les ions moléculaires parents capables de se fragmenter en un ion fils donné. Ce mode est illustré sur la figure 29.



**Figure 29 :** Représentation schématique du mode « Precursor Ion Scan ».

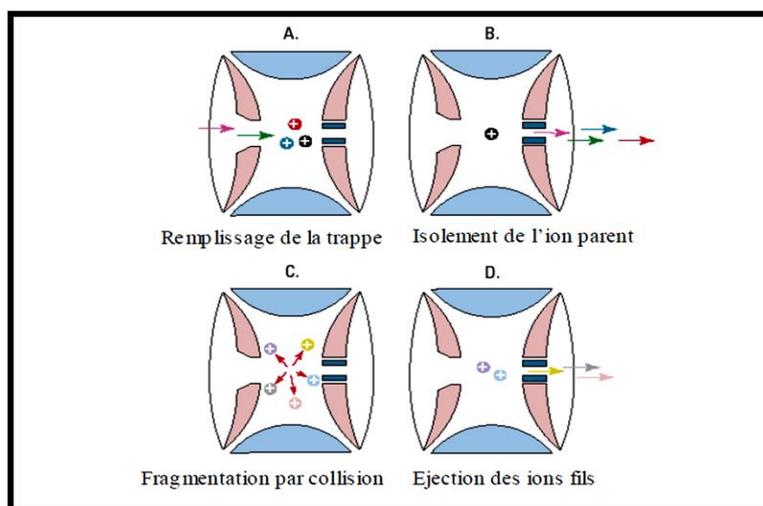
Ainsi, pour répondre à la problématique de la thèse, le mode le plus adapté est le mode « *MRM*, *Multiple Reaction Monitoring* ». Il assure une grande sélectivité des analyses effectuées et permet le suivi d'un grand nombre de composés.

### Trappe ionique

Comme déjà évoqué, la trappe ionique utilise un gaz tampon pour stabiliser les ions dans la trappe. Ce gaz va également jouer le rôle de gaz de collision.

La trappe est tout d'abord remplie par les ions produits par la source d'ionisation. L'ion précurseur est ensuite isolé dans la trappe. Une tension accélératrice est ensuite appliquée de

façon à le fragmenter par collision avec les atomes du gaz tampon. Une fois, les ions fils formés, ils sont accumulés dans la trappe et éjectés via l'électrode chapeau de sortie par balayage de radiofréquence vers le détecteur. Le principe de cette technique est illustré par la figure 30.



**Figure 30** : Principe de la spectrométrie de masse en tandem pour une trappe ionique<sup>248</sup>.

La trappe ionique tout comme le triple quadripôle permet d'effectuer des acquisitions en mode MRM défini précédemment. Le principe est le même et consiste à effectuer des acquisitions en mode SM<sup>2</sup> sur plusieurs composés. Les trappes ioniques présentent l'avantage de pouvoir travailler en mode SM<sup>n40</sup>. C'est-à-dire que les étapes de remplissage, d'isolement et de fragmentation vont être effectuées de façon à obtenir les ions fils issus de (n-1) fragmentations successives.

<sup>248</sup> "CD-ROM Agilent Technologies, LC/MS Applications and Abstracts, LC/MS basis"

---

## *Chapitre II*

**L'extraction des produits pharmaceutiques à l'aide de MWCnts.**

---

**Article 1: Determination of drugs in river and wastewaters using solid-phase extraction by packed multi-walled carbon nanotubes and liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry.**

S. Dahane, M.D. Gil García, M.J. Martínez Bueno, A. Uclés Moreno, M. Martínez Galera, A. Derdour

*Journal of Chromatography A: 1297 (2013) 17-28*

**ABSTRACT**

The present paper describes a solid-phase extraction by packed multi-walled carbon nanotubes, followed by liquid chromatography–mass spectrometry, method for the determination of some of the most consumed drugs including four  $\beta$ -blockers and eight non steroidal anti-inflammatory drugs, in river and wastewater samples. High extraction efficiency was found for most drugs due to the large specific surface area and high adsorption capacity of this nanomaterial compared with others conventional solid-phase extraction sorbents. Only 20 mg of carbon nanotubes were enough to preconcentrate the analytes with recoveries from 68 to 107 % for most of them.

The pharmaceuticals were analyzed by liquid chromatography coupled to a hybrid triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometer at ultra-trace levels. Data acquisition was carried out in selected reaction monitoring mode, using two transitions for simultaneous identification and quantification of the analytes. Additionally, an information dependent acquisition scan was performed to carry out the identification of those analytes whose second transition was absent or was present at low intensity. The analytical performance of the whole method was evaluated in two environmental water matrices (river and wastewaters). Matrix effect was not found in river water, quantitation being carried out with calibration graphs built with solvent based standard. On the contrary, matrix effect was present in wastewater for some of the target drugs and, therefore, quantitation was carried out using the standard addition methods. Limits of detection and quantitation in river waters were in the range of 9-36 and 23-121 ng L<sup>-1</sup>, respectively and the relative standard deviation of the full method was less than 17 %. The proposed methodology was applied to the analysis of three river and two wastewater (influent and effluent) samples, all of them from Almería (Spain). Some pharmaceuticals were found in

river water at concentration levels near to or lower than their quantitation limits, whereas the most consumed pharmaceuticals were found at high concentration levels in influent wastewater and were not detected or were found at lower levels in the effluent wastewater sample.

***Keywords:*** *Pharmaceuticals, Solid-phase extraction, Multi-walled carbon nanotubes, Liquid chromatography-mass spectrometry, River water, Wastewater*

Rapport-Gratuit.com

## I. Introduction

Bien que la persistance des produits pharmaceutiques dans l'environnement soit relativement faible, ils sont considérés comme semi-persistants en raison de leur importation continue dans l'environnement<sup>249</sup>. Des études récentes ont montré que des mélanges complexes de produits pharmaceutiques de différentes classes thérapeutiques peuvent présenter des effets toxiques synergiques sur des niveaux de concentrations environnementales de *biote*<sup>250,251,252,253</sup>. Par conséquent, c'est important de développer les méthodes analytiques de plusieurs classes du produit pharmaceutique et établir leur comportement dans les milieux aquatiques<sup>254, 255</sup>.

**Biote** : En écologie, un **biote** ou **biota** [du grec βίος, vie] est l'ensemble des organismes vivants (flore, faune et champignons ainsi que les micro-organismes tels que bactéries, levures, microchampignons...) présents dans un habitat (naturel, semi-naturel) ou biotope particulier, ou un lieu ou une région précise

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) sont souvent utilisés quelque soit dans les applications humaines ou vétérinaires. Dans les pays développés leur prescription annuelle peut atteindre plusieurs centaines de tonnes<sup>256</sup>. L'élimination urinaire des médicaments et de leurs métabolites, ainsi que leur élimination incomplète en stations d'épuration d'eau, révèle la présence de plusieurs anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) tels que l'ibuprofène, le naproxène, le diclofénac) dans les effluents municipaux de station d'épuration (STP) avec des concentrations du microgramme par litre et en nano gramme par litre dans les rivières et les eaux souterraines<sup>257,209,258</sup>.

Les  $\beta$  bloquants sont parmi les médicaments largement prescrits dans le monde entier, où ils tiennent un rôle fondamental dans le traitement cardiovasculaire tel que l'hypertension, l'arythmie et l'insuffisance cardiaque<sup>259</sup>. La plupart des  $\beta$ -bloquants sont métabolisés et excrétés sous différents métabolites, mais certains d'entre eux ne sont pas métabolisés et sont

---

<sup>249</sup> D. Bendz, N.A. Paxéus, T.R. Ginn, F.J. Loge, *J. Hazard. Mater.* 122 (2005) 195.

<sup>250</sup> S. L. Fraker, G.R. Smith, *Environ. Toxicol.* 19 (2004) 250.358.

<sup>251</sup> C. M. Flaherty, S.I. Dodson, *Chemosphere* 61 (2005) 200.

<sup>252</sup> M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, R. Tauler, D. Barceló, *Talanta* 65 (2005)

<sup>253</sup> F. Pomati, S. Castiglioni, E. Zuccato, R. Fanelli, D. Vigetti, C. Rossetti, D. Calamari, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2442.

<sup>254</sup> D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1202.

<sup>255</sup> Z.L. Zhang, J.L. Zhou, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 205

<sup>256</sup> H. J. Stan, T. Heberer, *Analysis* 25 (1997) M20.

<sup>257</sup> T. A. Ternes, *Water Res.* 32 (1998) 3245.

<sup>258</sup> S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, *J. Chromatogr. A* 911(2001) 225.

<sup>259</sup> M. Gros, T.M. Pizzolato, M. Petrovic, M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 374.

excrétés tels que<sup>260</sup>. Bien que, les  $\beta$  bloquants ne soient pas très persistants, les quantités les plus fréquemment détectés dans les eaux environnementales sont potentiellement faibles<sup>209,261,261,262,263</sup>; malgré leur consommation élevé.

En raison de l'importance spécifique et le caractère hydrophobe de la surface, les nanotubes de carbone ont été considérés comme de nouveaux supports d'extraction en phase solide. Ils ont été utilisés pour l'extraction de dioxine<sup>264</sup>, de trihalométhane<sup>265</sup>, de microcystine<sup>266</sup>, du 1,2-dichlorobenzène<sup>267</sup>, de la nicotine et du goudron<sup>268</sup>. Ils ont également été utilisés comme adsorbants pour piéger et séparer les composés organiques volatils (COV), dans différentes applications chromatographiques<sup>269, 270, 271, 272</sup>. ils ont également montré une grande satisfaction analytique en tant qu'adsorbant efficace de SPE pour la cyanazine<sup>273</sup>, le chlorotoluron<sup>274</sup>, le bisphénol A, le 4-n-nonylphénol, le 4-tert-octylphénol<sup>275</sup>, les chlorophénols<sup>158</sup>, plusieurs esters de phtalates<sup>276</sup>, les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens<sup>167</sup> et les polybromodiphényléthers<sup>277</sup>.

Dans ce contexte, nous avons réalisé une méthode analytique à l'aide de la technique SPE, (la préparation des cartouches par MWCnts se fait manuellement au niveau de notre laboratoire), pour une extraction sélective de douze composés pharmaceutiques dont huit anti-inflammatoires non stéroïdiens et quatre  $\beta$  bloquants ; et les détectés par la chromatographie liquide couplée à la masse dans différentes sources d'eaux (rivière et station d'épuration).

<sup>260</sup> M. Packer, *Am. J. Hypertens.* 11 (1998) 23S.

<sup>261</sup> B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 132.

<sup>262</sup> M. Farré, M. Gros, B. Hernández, M. Petrovic, P. Hancock, D. Barceló, *Rapid Commun. Mass Spectrosc.* 22 (2008) 41.

<sup>263</sup> M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 104-112

<sup>264</sup> R.Q. Long, R.T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2058.

<sup>265</sup> C.S. Lu, Y.L. Chung, K.F. Chang, *Water Res.* 39 (2005) 1183.

<sup>266</sup> H. Yan, A. Gong, H.S. He, J. Zhou, Y.X. Wei, L. Lv, *Chemosphere* 62 (2006) 142.

<sup>267</sup> X.J. Peng, Y.H. Li, Z.K. Luan, Z.C. Di, H.Y. Wang, B.H. Tian, Z.P. Jia, *Chem. Phys. Lett.* 376 (2003) 154.

<sup>268</sup> Z.C. Chen, L.S. Zhang, Y.W. Tang, Z.J. Jia, *Appl. Surf. Sci.* 252 (2006) 2933.

<sup>269</sup> Y. Li, Y. Chen, R. Xiang, D. Ciuparu, L.D. Pfefferle, C. Horwath, J.A. Wilkins, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1398.

<sup>270</sup> C. Saridara, S. Mitra, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7094.

<sup>271</sup> Q.L. Li, D.X. Yuan, Q.M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 283.

<sup>272</sup> Q.L. Li, D.X. Yuan, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 203.

<sup>273</sup> Q.X. Zhou, W.D. Wang, J.P. Xiao, *Anal. Chim. Acta* 559 (2006) 200.

<sup>274</sup> Q.X. Zhou, Y.J. Ding, J.P. Xiao, *Chromatographia* 65 (2006) 25.

<sup>275</sup> Y.Q. Cai, G.B. Jiang, J.F. Liu, Q.X. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 149.

<sup>276</sup> Y.Q. Cai, G.B. Jiang, J.F. Liu, Q.X. Zhou, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2517.

<sup>277</sup> J.X. Wang, D.Q. Jiang, Z.Y. Gu, X.P. Yan, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 8.



## II. Définition

### II. 1 Les anti-inflammatoires non stéroïdien

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, souvent abrégés en *AINS*, sont des médicaments aux propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Ils réduisent la douleur, la fièvre et l'inflammation. Le terme « non stéroïdien » est utilisé pour les distinguer des glucocorticoïdes, qui ont une semblable action anti-inflammatoire (dépression des eicosanoïdes). Les plus connus sont l'aspirine et l'ibuprofène.

### II.2 Les $\beta$ bloquants

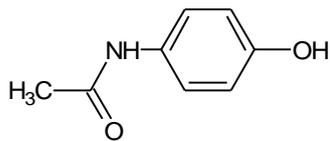
Un bêtabloquant ou  $\beta$ -bloquant est un médicament utilisé en cardiologie. Il bloque l'action des médiateurs du système adrénergique tels que l'adrénaline. Les bêtabloquants prennent la place de ces médiateurs sur les récepteurs  $\beta$  mais ne provoquent pas de réaction de la part du récepteur. Certains  $\beta$ -bloquants empêchent l'apparition des médiateurs adrénergiques, et indirectement s'opposent à leurs actions.

Développement de la méthode d'analyse de produits pharmaceutiques dans les eaux par SPE/CPL/SM<sup>2</sup>

### III.1 Les spécifications des composés étudiés

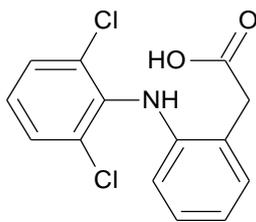
Les molécules concernées par cette étude sont des produits pharmaceutiques habituellement présents dans les eaux. Ces composés sont :

- **AINS:** Acétaminophène, Naproxène, Ibuprofène, Diclofénac, Kétoprofène, acide Méclofénamique, acide Flufénamique et acide Tolfénamique.
- **BB :** Métoprolol, Bétaxolol, Bisoprolol et Nadolol.



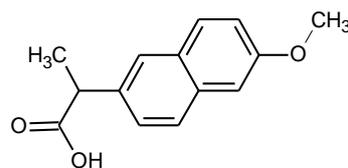
**Acétaminophène**

**M : 151,16 g/mol**



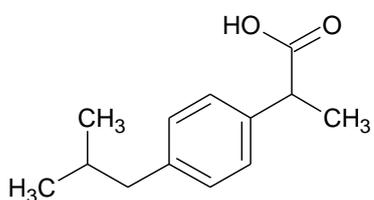
**Diclofénac**

**M : 230,26 g/mol**



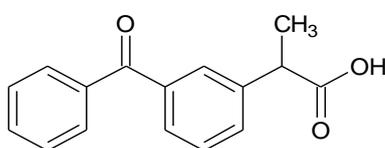
**Naproxène**

**M : 296,15 g/mol**



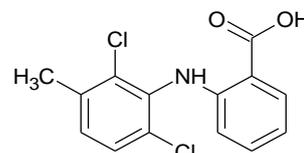
**Ibuprofène**

**M : 151,16 g/mol**



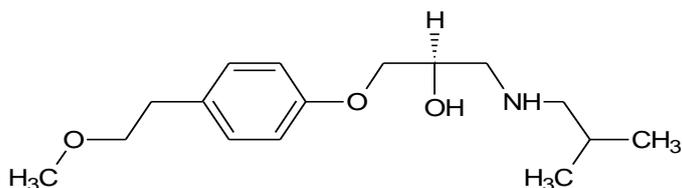
**Kétoprofène**

**M : 230,26 g/mol**



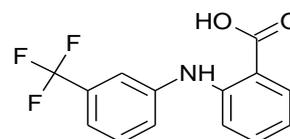
**Ac Méclofénamique**

**M : 267,18 g/mol**



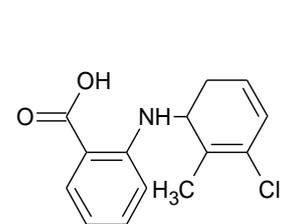
**Métoprolol**

**M : 296,15 g/mol**



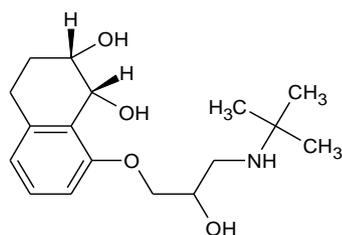
**Ac Flufénamique**

**M : 281,22 g/mol**



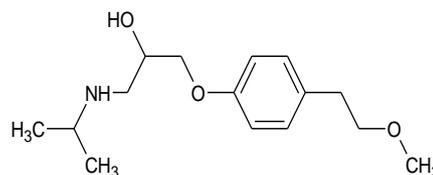
**Ac Tolfénamique**

**M: 261,70 g/mol**



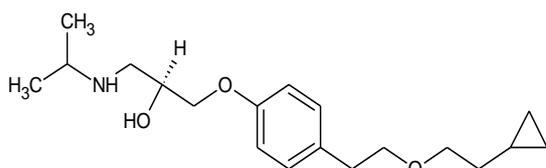
**Nadolol**

**M: 307,42 g/mol**



**Bisoprolol**

**M: 254,28 g/mol**



**Bétaxolol** **M: 206,27 g/mol**

La classe thérapeutique et les propriétés physicochimiques des produits pharmaceutiques<sup>278</sup> étudiés sont indiquées dans le **Tableau 1**.

PPs	Classe thérapeutique	pKa	S (mg L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub>
Acétaminophène	analgésique	9.4	1400	0.5
Naproxène	Acide 2- arylpropanoïque	4.8	16	3.10
Diclofénac	Arylacétique	4.2	2.4	4.51
Ibuprofène	Acide 2- arylpropanoïque	4.85	24	3.79
Kétoprofène	Acide 2- arylpropanoïque	4.2	51	3.0
Métoprolol	β-blocker	9.7	4777	1.7
Bétaxolol	β-blocker	9.4	2980	3.62
Bisoprolol	β-blocker	9.2	7070	1.7
Ac Méclofénamique	Acide phénamique	4.2	3660	5.12
Nadolol	β-blocker	9.67	2250	0.71
Ac Flufénamique	Acide flufénamique	3.67	26.5	5.62
Ac Tolfénamique	Acide tolfénamique	4.31	0.78	5.17

**Tableau 1** : La classe thérapeutique, structures et les propriétés physicochimiques des composés pharmaceutiques PP.

Avant de valider la méthode d'analyse de PP par LC/MS<sup>2</sup>; l'identification et la séparation de douze composés on été faite par HPLC/DAD.

<sup>278</sup> Environmental Protection Agency, The Estimation Programs Interface (EPI) Suite TM Version 4.1 (2012). <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.html>

### III.1 L'optimisation de la méthode d'analyse des PP par HPLC/DAD.

Le laboratoire est équipé d'un système chromatographique en phase liquide détecté par UV (Waters photodiode array 2996) et un autre détecteur Fluorescent (waters 474). Ce système comporte quatre parties :

Système de pompage (**water**1525), injecteur (20 $\mu$ L), colonne et détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer.

#### III.1.1 Préparation des standards

La préparation des standards se fait de la même façon. On a préparé une solution de concentration 400 (mg L<sup>-1</sup>). Pour cela on pèse environ 10 mg de principe actif qu'on dilue dans 25 mL de méthanol grade HPLC. Les solutions standards sont conservées dans des flacons ambrés et portés à 4°C au frigo.

Les solutions standards sont préparées quotidiennement et individuellement à partir de la solution mère, et diluées dans le mélange (20/80, v/v) méthanol/eau ultra pure.

Dans un premier temps nous avons identifié chaque principe actif individuellement pour le quel nous avons pu déterminer la longueur d'onde d'émission et d'excitation. Plusieurs études<sup>279</sup> ont montré que les AINS présentaient des spectres fluorescents. **Tableau 2.** La séparation et l'identification ont été faite sans le détecteur fluorescent car il ne possède pas de système de balayage ; seulement il peut fonctionner en fixant la longueur d'onde.

Composés	$\lambda$ Emission (nm)	$\lambda$ Excitation (nm)
Fufénamic-Mefénamic-	495	360
Meclofénamic-Tolfénamic		
Naproxène	330	245

**Tableau 2 :** longueurs d'ondes d'émissions et d'excitations des AINS.

<sup>279</sup> P. Galloa, S. Fabbrocinoa, G. Dowling, M. Salini, M. Fiori, G. Perretta, L. Serpea. *J.Chromatography A*, 1217 (2010) 2832–2839

### III.1.2 Les conditions chromatographiques et l'influence de chaque paramètre

Lors d'une analyse par HPLC, différents facteurs influent sur la séparation et l'intensité du pic. Certains d'entre eux sont les conditions chromatographiques tels que la phase mobile (nature et débit) ou les caractéristiques physiques de la colonne analytique.

L'identification individuelle des PPs est faite selon un mode isocratique. Les PPs sont préparés dans différents mélanges selon la composition de la phase mobile

La colonne utilisée est de type Phenomenex C18 (150 X 4,5 5 $\mu$ m) et elle est changée au cours de l'analyse pour modifier la taille des pics en diminuant la taille des pores par une thermo C18 (150 X 4,5 3 $\mu$ m). Ensuite cette dernière est remplacée par un autre modèle Phenomenex kinetex C18 (150 x 4,6 2.6 $\mu$ m) et cela pour visionner l'ensemble des signaux. Le débit utilisé au cours de l'analyse est varié entre 1 et 1.3 mL/min.

La phase mobile joue un rôle essentiel en HPLC. En plus de son importance pour la séparation des composés, elle influe sur les intensités des signaux observés. Une étude a été menée sur l'influence de la nature du solvant organique et de l'agent acidifiant ajouté à la phase mobile.

Les compositions testées sont : une phase mobile composée d'une part d'acétonitrile et d'autre part 0.1% de l'acide formique, 0.01M de l'acide *o*-phosphorique<sup>277</sup>, 50mM de l'acide *o*-phosphorique pH : 3.4 / méthanol ou 25mM de l'acide *o*-phosphorique pH : 3  $\pm$ 0.1 / méthanol, dans les proportions 20% de solvant organique et 80% de phase aqueuse. Dans tous les cas, un gradient isocratique est suivi pour identifier chaque composé. Le temps de rétention de chaque composé est indiqué dans le **Tableau 3**.

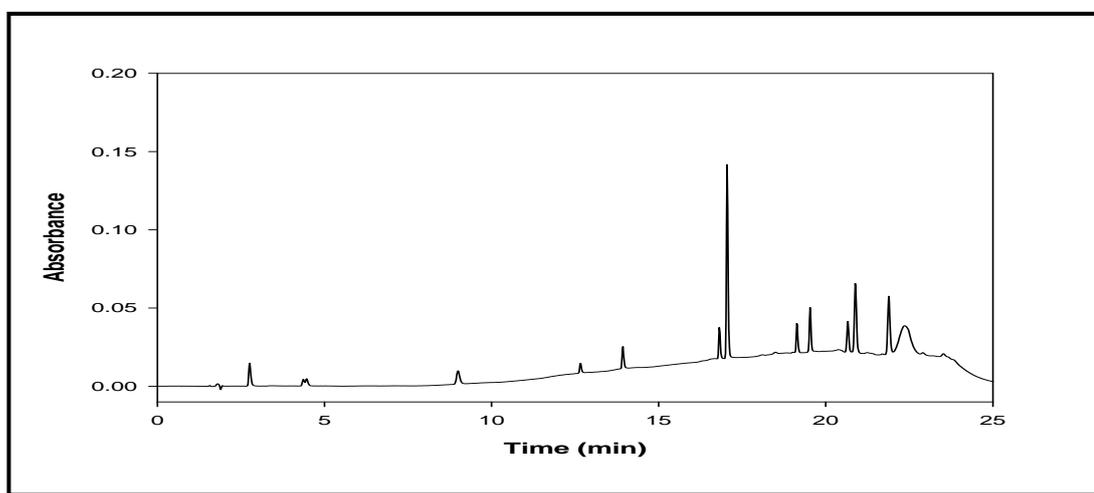
PPs	t <sub>R</sub> (mn)	PPs	t <sub>R</sub> (mn)	PPs	t <sub>R</sub> (min)
Ace	3.4	Ket	6.6	Mec	10.2
Nap	6.9	Met	7.05	Nad	4.4
Dic	7.1	Bet	12.5	Flu	10.7
Ibu	7.3	Bis	11.2	Tol	12.7

**Tableau 3 :** Le temps de rétention de chaque composé injecté individuellement.

### III.1.3 Identification et séparation chromatographique des composés ciblés

Une solution contenant un mélange de composés à 2 mg L<sup>-1</sup> a été préparée dans le mélange méthanol/ eau ultra pure (20/80 v/v) et injecter; en utilisant pour la séparation une phase mobile composée de l'acétonitrile, méthanol et 25mM de l'acide *o*-phosphorique pH : 3 ±0,1. Il consiste à garder la proportion de la phase organique de 20% de méthanol et 5% de l'acétonitrile pendant 3 minutes pour un débit de 1mL/min, puis on augmente ce débit à 1,3 mL/mn pendant une minute. Ensuite cette proportion a été incrémentée de 20 à 40% pour le méthanol et de 5 à 30% pour l'acétonitrile en 11 minutes et puis maintenir cette proportion pendant 5 mn avant de revenir aux conditions initiales en 5 minutes pour un débit de 1.3mL/mn ensuite en une minute pour avoir le débit initial.

Le temps de rétention final de chaque composé dans le mélange est indiqué dans le **Tableau4**. Ainsi le chromatogramme total du mélange est donné dans la **Figure1**.



**Figure1** : Le chromatogramme des PP par LC/DAD.

Composé	Act	Nad	Met	Bis	Bet	Ket	Nap	Dic	Ibu	Flu	Mec	Tol
tr(min)	2.98	4.6	8.50	13.2	14.02	16.8	17.40	18.95	19.6	20.35	21.02	22.30

**Tablea**

**u 4 :**

Le temps

de rétention de chaque composé par la méthode LC/DAD.

### III.2 Extraction sur phase solide : évaluation et optimisation

La méthode de séparation et d'identification ayant été développée, la mise en place du protocole analytique globale incluant une étape préalable d'extraction des PPs des eaux a été effectuée.

Un protocole d'extraction des produits pharmaceutiques par les nanotubes de carbone de type MWCnts a été réalisé. Les cartouches, destinées à l'extraction ont été préparées manuellement au niveau de notre laboratoire. Ce protocole d'extraction a permis d'étudier et de mettre en évidence plusieurs paramètres avant de le valider par LC/QqQLIT/MS. Les paramètres à sélectionner et confirmer sont : le type de l'éluant et son volume, l'effet des sels et du solvant organique, le pH, la quantité de l'adsorbant et le volume de l'échantillon. Cette optimisation de la méthode est effectuée par HPLC/DAD et confirmée par LC/QqQLIT/MS.

### ***III.2.1 La préparation des cartouches de SPE***

Les multi-walled de carbone utilisés dans cette étude sont de 6-13nm de diamètre extérieur et 2.5-20µm de longueur. Ils sont introduits dans des corps de seringue de 1mL de capacité de type polypropylène et fixé entre deux frittés (polyéthylène) dont la granulométrie est généralement comprise entre 40 et 60 µm afin de permettre un écoulement facile des échantillons à différentes solutions sans perte de charge trop importante.

On place un fritté dans la cartouche, ensuite on la pèse. Une fois la balance tarée, l'adsorbant est ajouté progressivement jusqu'à atteindre la quantité suffisante pour l'analyse. L'adsorbant est ensuite enveloppé par le deuxième fritté qui est poussé par un bâton en verre

### ***III.2.2 La procédure de SPE***

La procédure de l'extraction sur phase solide comporte trois ou quatre étapes en général

- ❖ La première étape : le conditionnement de l'adsorbant contenu dans la cartouche d'extraction.
- ❖ La deuxième étape : on procède à la percolation de l'échantillon sur le support.
- ❖ La troisième étape : le séchage de l'adsorbant ou la cartouche par N<sub>2</sub>.
- ❖ La quatrième étape : on procède à l'élution des composés ciblés.
- ❖ La cinquième étape : l'élimination du solvant d'élution par N<sub>2</sub>.

Pour réussir cette technique, nous avons utilisé une extraction à pression négative : c'est la méthode la plus répandue. Il s'agit d'un bac en verre possédant un couvercle adaptable percé de 6 à 24 orifices muni d'un robinet de réglage et d'une pompe ou tout autre système à vide

permutent de faire le vide en créant une dépression de type Büchi Vac V-500 (Switzerland) vacuum pump. (**Figure 2**).



**Figure 2** : Système pour extraction en phase solide dite en pression négative

### III.2.2.1 le choix de l'éluant

Les nanotubes de carbone Cnts présentent des propriétés électroniques, qui leur permettent d'interagir fortement avec les molécules organiques, par l'intermédiaire de forces non-covalentes telles que la liaison hydrogène, l'interaction  $\pi$ - $\pi$ , la force électrostatique, la force de van der-Waals et les interactions hydrophobes. Ces interactions, dépendent des caractéristiques structurelles, liées à la forme des surfaces, de la taille des pores internes et de la largeur de surface extérieure d'absorption, cela le définit comme un excellent adsorbant. Ainsi, Cnts interagissent parfaitement avec les noyaux benzéniques de composés aromatiques<sup>280</sup> et cette rétention nécessite plus d'éluant pour récupérer les analytes qui restent fixés sur les nanotubes de carbone<sup>281</sup>.

Plusieurs solvants ont été testés seuls (méthanol, acétonitrile, acétone, n-hexane, dichlorométhane et l'acétate d'éthyl) ou, en proportion entre eux. Pour cette étude, les échantillons sont préparés comme suit :

On prépare des solutions de 2 $\mu$ g de PPs dans 10mL de volume d'eau ultra pure. Les cartouches sont emballées par 20mg de MWCnts.

<sup>280</sup> K. Pyrzyńska, *Chemosphere* 83 (2011) 1407.

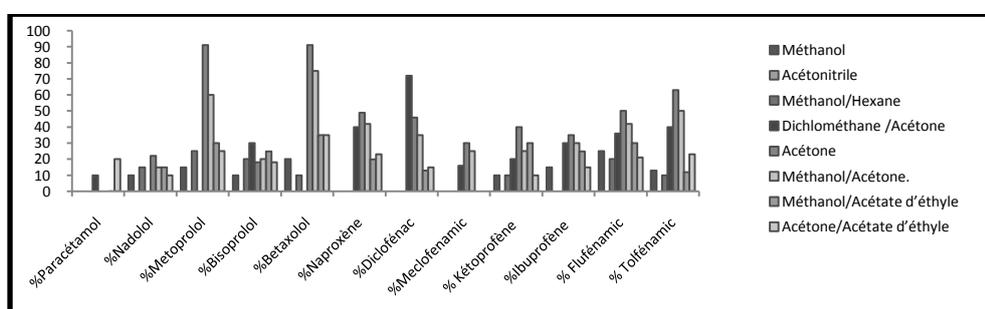
<sup>281</sup> L.M. Ravelo-Pérez, A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2618.

Les cartouches sont pré-conditionnées par 2mL d'éluant et 2mL d'eau ultra pure avant de percoler les échantillons.

Les cartouches sont séchées à l'aide de l'azote N<sub>2</sub> pendant 10 minutes, ensuite on élue chacune d'entre elles par 3mL de solvant, qui sont séchées par N<sub>2</sub>; afin de reconstituer la concentration à un millilitre de mélange (méthanol/eau ultra pure, 20/80 : v/v).

Les extraits sont analysés par HPLC et comparés avec un standard de même concentration.

Les solvants testés n'ont pas donné une bonne récupération sauf l'acétone. Les résultats sont présentés dans la **Figure 3**.

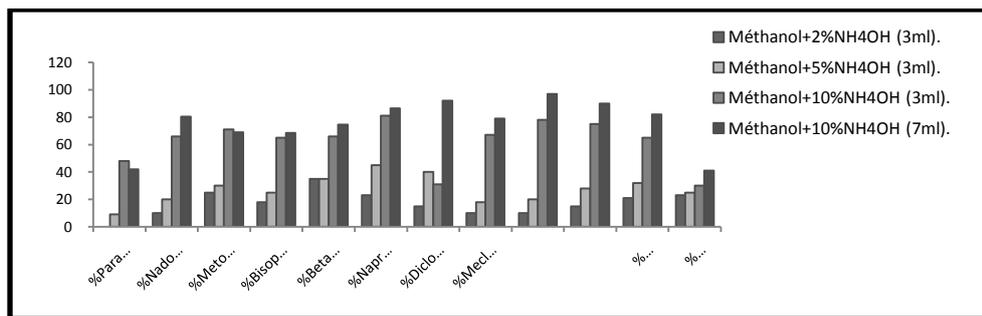


**Figure 3** : La récupération des PPs dans les différents solvants organiques.

En raison des propriétés acide-base des produits pharmaceutiques, nous avons pensé d'ajouter une quantité d'acide ou de base à l'éluant. Plusieurs études d'extraction, sur phase solide, pour produits pharmaceutiques ont été effectuées par une simple modification de l'éluant organique par l'ajout d'un acide ou d'une base<sup>282,283</sup>. Dans cette étude ; 2% d'hydroxyde d'ammonium ont été ajouté séparément à trois solvants organiques méthanol, acétonitrile et acétone. Le meilleur rendement est obtenu par le mélange méthanol/ hydroxyde d'ammonium. Nous avons observé une cohérence entre la récupération et la proportion ajoutée de l'hydroxyde d'ammonium. Cette proportion est renforcée de 2% jusqu'à 10% pour récupérer l'ensemble des PPs avec 7mL comme volume final d'éluant. (**Figure 4**).

<sup>282</sup> H. Niu, Y. Cai, Y. Shi, F. Wei, J. Liu, S. Mou, G. Jiang, *Anal. Chim. Acta* 594 (2007) 81.

<sup>283</sup> G. Morales-Cid, A. Fekete, B.M. Simonet, R. Lehmann, S. Cárdenas, X. Zhang, M.Valcárcel, P. Schmitt-Kopplin, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2743.



**Figure 4** : L'amélioration de rendement des PPs dans les différentes proportions de l'hydroxyde d'ammonium.

### III.2.2.2 L'étude du pH et d'effet des sels

Les PPS utilisés dans cette étude montrent un caractère acide ou basique (**Tableau1**) et, par conséquent le pH joue un rôle important dans les interactions analytes-MWCnts<sup>273,284,285</sup>.

Une série testée de pH varié de 2 à 10. Les échantillons préparés contiennent 2µg de chaque composé dans un volume de 100mL d'eau ultra pure.

La même procédure d'extraction a été suivie, les cartouches sont éluées par 7mL de (méthanol+10% hydroxyde d'ammonium). Les résultats sont indiqués au **Tableau 5**.

Analytes	Ace	Bet	Bis	Ket	Met	Nad	Nap	Dic	Flu	Mec	Tol	Ibu
pH2	7	70	87	72	66	65	48	48	70	55	18	40
pH4	3	77	87	76	79	83	53	44	75	68	7	36
pH6	4	55	68	65	71	69	44	62	86	68	18	54
pH8	7	67	83	78	79	79	58	82	98	76	40	56
pH10	5	62	78	54	74	67	40	54	92	49	49	36

**Tableau 5** : La récupération des PPs par MWCnts en fonction de pH.

Les meilleurs récupérations sont observées à pH : 8, et varier entre 40% et 98% pour l'ensemble des PPs, sauf l'acide tolfénamique qu'a présenté 49% comme maximum à pH : 10. On note une faible récupération de l'Acétaminophène ne surpassant pas les 7% quelque soit la valeur de pH.

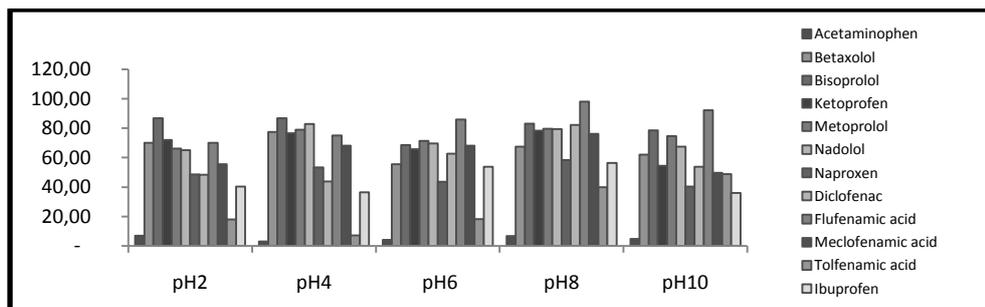
Les récupérations de l'acide tolfénamique sont similaires aux résultats comparés à la littérature<sup>286</sup>, car ils ont justifiés cette impuissance de rendement par la faible polarité du composé (log KOW = 5.4), et par l'importance du caractère hydrophobe de la surface de nanotube de carbones.

<sup>284</sup> X.D. Du, Y.L. Wu, H.J. Yang, T. Yang, *J. Chromatogr. A* 1260 (2012) 25.

<sup>285</sup> H. Katsumata, T. Matsumoto, S. Kaneco, T. Suzuki, K. Ohta, *Microchem. J.* 88 (2008) 82.

<sup>286</sup> J. Carpinteiro, J.B. Quintana, E. Martínez, I. Rodríguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 63.





**Figure 5** : L'amélioration de rendement des PPs en fonction de pH.

Ce qui leur donne une grande capacité à retenir les polluants organiques hydrophobes<sup>287</sup>. Et inversement, les faibles taux de récupération de l'acétaminophène pourraient être attribués à sa très grande polarité (solubilité dans l'eau : 236000 mg L<sup>-1</sup>, log KOW = 0.27), afin d'obtenir la meilleure extraction des analytes, le pH a été ajusté à 8,0 ± 0,1 par l'hydroxyde de sodium.

D'autre part, la teneur en sel dans les échantillons d'eau peut affecter la rétention des analytes au cours d'extraction. Dans ce contexte, La même procédure d'extraction a été suivie. Des échantillons de 100ml d'eau ultra pure, contenant 2µg de pps à différentes concentrations de chlorure de potassium variant entre (0.001 et 0.02mol L<sup>-1</sup>). Les résultats obtenus sont montrés dans le **Tableau 6**.

KCl(M)	Ace	Bet	Bis	Ket	Met	Nad	Nap	Dic	Flu	Mec	Tolf	Ibu
0	18	82	93	78	78	99	74	69	89	99	72	63
0,001	10	84	96	86	72	83	78	77	91	92	68	83
0,005	21	78	89	82	76	90	90	86	89	97	65	89
0,01	51	81	77	97	84	85	88	97	93	94	73	86
0,02	3	47	55	83	56	54	60	60	82	76	64	89

**Tableau 6** : La récupération des PPs par MWCnts en fonction de KCl.

Pour la majorité des PPs, la récupération est augmentée ou restée inchangée jusqu'à une concentration de chlorure de potassium de 0,01 molL<sup>-1</sup>, tandis que les concentrations élevées de sel, ont diminué la récupération jusqu'à 30% pour certains d'entre eux. Par conséquent, l'optimisation de la méthode est constatée à 0,01 mol L<sup>-1</sup> de chlorure de potassium. Et retenue pour le reste du travail.

<sup>287</sup> H. Bagheri, H. Piri-Moghadam, M. Naderi, *TRAC-Trend Anal. Chem.* 34 (2012) 126.

### **III.2.2.3 Le débit de l'écoulement**

La vitesse d'écoulement des échantillons d'eau à travers la cartouche de SPE implique toujours un important impact dans la procédure. Cette variable affecte à la fois le taux de récupération des analytes et le temps d'extraction dans le système de SPE<sup>288</sup>. En générale, les volumes d'échantillon importants doivent être extraits plus rapidement.

La petite taille des particules de Cnts utilisée dans ce travail (O.D. x L of 6-13nm et 2.5-20 µm) implique une compacité de l'absorbant, ce qui réduit le débit de l'écoulement et augmente considérablement le temps de pré-concentration pour des volumes importants.

De cette façon, une série d'expériences a été réalisée, en faisant passer 100 ml d'eau ultra-pure (pH 8,0 et 0,01 mol L<sup>-1</sup> de chlorure de potassium) contenant 2 µg de PPs. Ensuite on les pré-concentre sous différentes vitesses d'écoulement qui varient entre 1 et 3 ml mn<sup>-1</sup>.

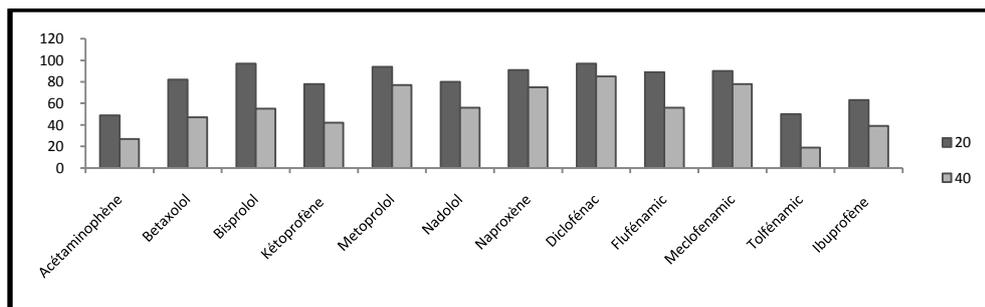
Les résultats ont montré que le taux de récupération de PPs s'est amélioré à faible débit (1ml mn<sup>-1</sup>), plus on augmente le débit plus la récupération diminue. En conséquence, le débit est limité à 1 ml mn<sup>-1</sup> au cours de la procédure SPE-Cnts.

### **III.2.2.4 La quantité de MWCNTs**

L'effet de la quantité de l'adsorbant sur les récupérations de produits pharmaceutiques a été étudié en utilisant 20 et 40 mg de MWCnts. Les quantités importantes de l'adsorbant n'ont pas été vérifiées en raison de la difficulté de faire passer l'échantillon d'eau à travers le MWCnts. De plus le volume nécessaire à l'élution peut augmenter de manière significative. Pour cette étude, 100 ml d'échantillons d'eau ultra-pure ajustés à pH 8,0, contiennent 0,01 mol L<sup>-1</sup> de chlorure de potassium et 2 µg d'analytes sont pré concentrés, éluer par 7 ml de méthanol contenant 10% d'hydroxyde d'ammonium, et analyser par LC/DAD. Le taux de récupération obtenu par 40 mg de MWCnts est inférieurs à celui obtenu par 20 mg, cela peut être dû à la forte capacité d'absorption de la MWCNT Ainsi, plus on augmente la quantité de l'adsorbant, plus l'ajout de volume d'éluant est nécessaire. La récupération obtenue à 20 mg de MWCnts était satisfaisante seulement par 7 mL d'éluant et par conséquent, les volumes plus élevés n'ont pas été vérifiés. De ce fait, les 20 mg ont été choisi pour continuer le reste des expériences.

---

<sup>288</sup> G. Fang, X. Wang, S. Wang, *Chromatographia* 72 (2010) 403.



**Figure 6 :** L'amélioration de rendement des PPs en fonction de la quantité de MWCnts.

### III.2.2.5 Effet du volume d'échantillon

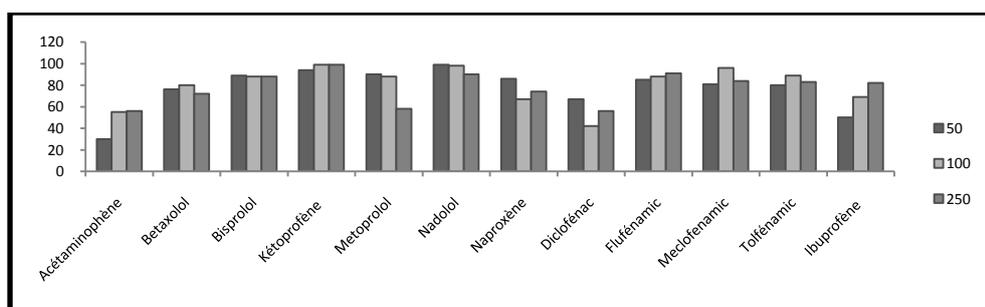
L'analyse des polluants organiques à faible concentrations nécessite un facteur d'enrichissement important, par conséquent, il est nécessaire de préconcentrer de grands volumes d'échantillons sans perdre le taux de récupération.

Trois volumes différents (50, 100 et 250 ml) d'échantillons d'eau ultra pure ajustés à pH 8,0, contenant  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de chlorure de potassium et  $2 \mu\text{g}$  d'analytes ont été pré concentrés, suivant la procédure décrite ultérieurement SPE-MWCTS. L'accroissement des volumes n'a pas été vérifiée en raison de débit utilisé ( $1 \text{ mL mn}^{-1}$ ) cela permet de dire que plus on a des volumes d'échantillons élevés plus le temps de pré-concentration sera important.

La récupération des PPs reste identique pour l'ensemble des volumes, seulement pour réduire le temps de la pré-concentration nous avons optimisé la méthode SPE-Cnts par 100mL comme volume d'échantillon.

	Acé	Bet	Bis	Két	Met	Nad	Nap	Dic	Flu	Mec	Tol	Ibu
50	30	76	89	94	90	99	86	67	85	81	80	50
100	55	80	88	99	88	98	67	42	88	96	89	69
250	56	72	88	99	58	90	74	56	91	84	83	82

**Tableau 7 :** L'effet du volume d'échantillon sur la récupération des PPs.



**Figure 7 :** L'amélioration de rendement des PPs en fonction du volume d'échantillon.

## IV. Validation et optimisation de la méthode par LC-QqQLIT-MS/MS

### IV.1 LC-QqQLIT-MS/MS procédure

#### IV.1.1 Conditions

Une séparation de PPs a été réalisée par LC-QqQLIT/MS/MS par mode gradient, où l'acétonitrile est utilisé comme (solvant A) et 0.1% de l'acide formique comme (solvant B) réglé à 0.5 mL mn<sup>-1</sup>. Initialement, cette analyse est réalisée par 10% de solvant A dans la première minute, pour atteindre 100% de solvant A en 14 minutes. Ces conditions restent inchangées pendant 5 minutes. Au cours de 0.1 minute, le système retourne aux conditions initiales qu'on garde pendant 10 minutes. Le volume d'injection est de 10 µl. Les douze composés sont complètement séparés au cours de 30 minutes.

Le système chromatographie LC est connecté à QqQLIT-MS/MS, par une source électrospray (ESI) et a été exploité en deux modes d'ionisation positive et négative. Les paramètres de la source TurboIonSpray sont :

Source Température 500 °C : l'utilisation de haute température sert à compléter le processus de solvatation et cette valeur dépend aussi du débit et de la nature de la phase mobile. Gaz rideau (curtain Gaz (CUR) 30 (unités arbitraires)) : ce gaz assiste l'ionisation et permet la création d'un spray. Il sert à désolvater les molécules de la phase mobile et donc à produire des ions. La pression appliquée dépend essentiellement du débit de la phase mobile.

Gaz de collision (CAD) moyen, Ion Source gaz (GS1 et GS2) 50 psi et IonSpray Voltage (IS) 5500 V en mode d'ionisation positive et IS - 4500 V en mode d'ionisation négative. L'azote a été utilisé comme un gaz de nébulisation, gaz rideau et gaz de collision.

Tous les paramètres de la source d'ionisation ESI peuvent être classés en deux catégories lors d'une acquisition, d'une part les paramètres fixes, c'est à dire identiques à toutes les molécules et d'autre part les paramètres variables dépendant de la molécule étudiée. Par ailleurs, si certains ont une faible influence, d'autres au contraire sont déterminants. La pression des différents gaz est l'un des paramètres communs à tous les composés analysés. Il est donc important de trouver les conditions optimales de pression de gaz pour l'ensemble des molécules de la sonde ESI qui influent significativement sur l'efficacité de l'ionisation des composés. En

revanche, certains paramètres sont spécifiques à la molécule à doser, comme les valeurs des énergies de collision qui sont à déterminer pour chaque composé étudié.

#### **IV.1.2 Optimisation**

Selon la décision 2002/657/CE de la Commission européenne)<sup>289</sup>, deux transitions SRM ont été optimisées par LC-QqQLIT-MS/MS pour chaque composé.

Pour chaque composé, l'ion majoritaire a été déterminé par infusion directe d'une solution de chaque composé à 1mg L<sup>-1</sup>, cette étape est effectuée par l'absence du colonne chromatographique. Les paramètres de la source d'ionisation ESI de chaque composé sont optimisés et indiqués dans le **Tableau 8**.

Après cet essai, les molécules sont analysées et sélectionnées par leur mode d'ionisation : l'acétaminophène, nadolol, métoprolol, bisoprolol, bétaxolol, kétoprofène, naproxène et l'acide méclofénamique par le mode positif, tandis que diclofénac, ibuprofène, acide flufénamique et acide tolfénamique par le mode négatif. **Figure 8**

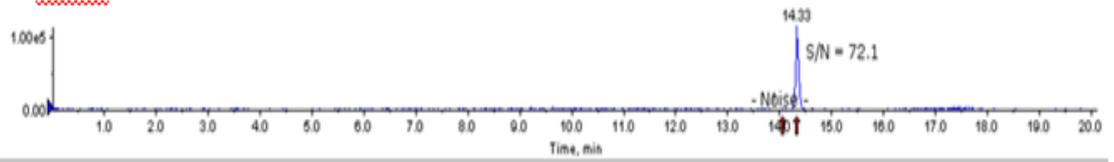
Comme il est indiqué l'analyse sur LC-QqQLIT/MS/Ms est définie par l'optimisation de deux transitions SRM déterminantes pour chaque composé, le temps de rétention ( $t_r$ ) le rapport de SRM (relation entre la confirmation et la quantification SRM2/SRM1) sont nécessaires pour la confirmation (**Tableau 8**). On peut constater les différences d'intensités obtenues entre SRM1 et SRM2 jusqu'à 10 fois pour bisoprolol, diclofénac, méclofénamique et tolfénamique. Cela a limité l'identification de ces composés à faible concentrations, en cas où, la transition SRM2 est moins intense une vérification du rapport signal/ bruit ( $S/N \geq 3$ ) est nécessaire. En outre, l'ibuprofène présente seulement une transition, ce qui empêche son identification. Pour cette raison, l'analyse est réalisée par le balayage d'IDA pour améliorer l'identification de l'ibuprofène et les composés mentionnés ci-dessus.

---

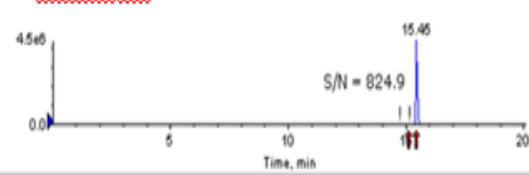
<sup>289</sup> Commission Decision (2002/657/EC) of 12th August 2002, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities* L221, Brussels, Belgium, 8–36.

## B: ESI (-)

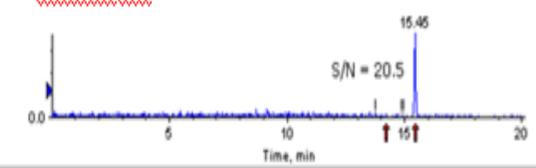
XIC of Ibuprofen NMR1 205.100 → 161.200



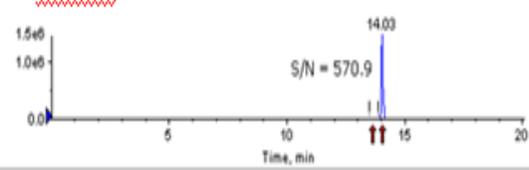
XIC of Tolfenamic acid NMR1 260.100 → 216.000



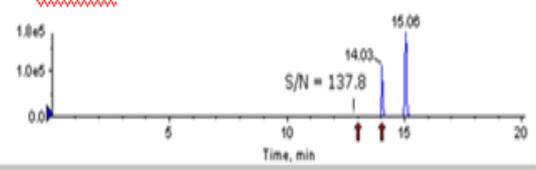
XIC of Tolfenamic acid NMR2 260.100 → 214.000



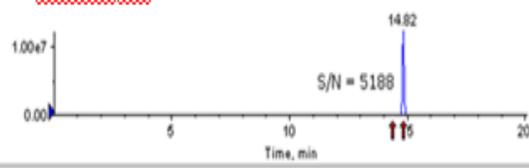
XIC of Diclofenac NMR1 294.000 → 250.000



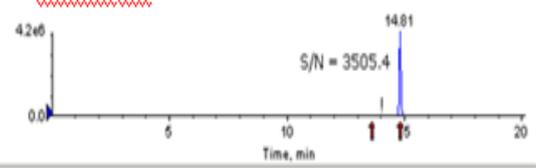
XIC of Diclofenac NMR2 294.000 → 214.100



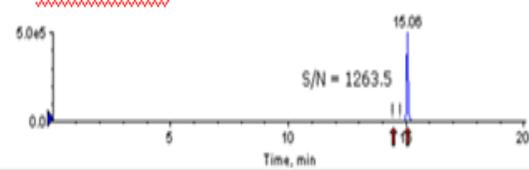
XIC of Flufenamic acid NMR1 280.000 → 236.000



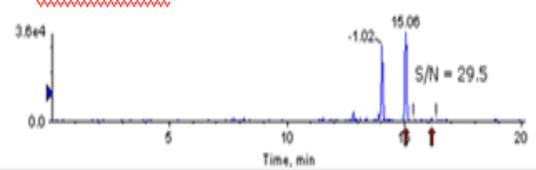
XIC of Flufenamic acid NMR2 280.000 → 176.000



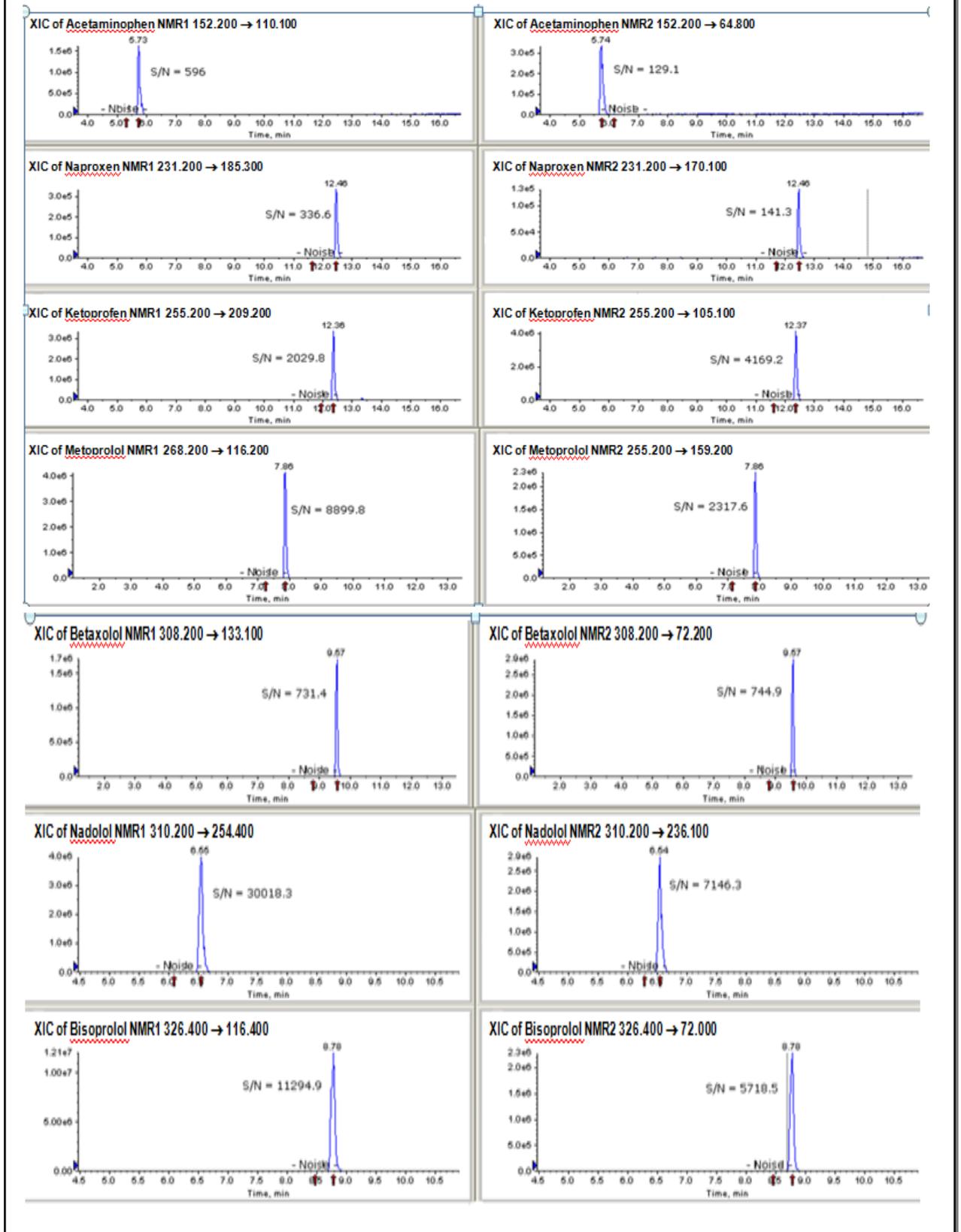
XIC of Meclofenamic acid NMR1 294.000 → 258.000



XIC of Meclofenamic acid NMR2 294.000 → 178.000



A: ESI (+)



**Figure 8** : Les chromatogrammes de chaque PPs par LC-QqQ-LIT-MS/MS.

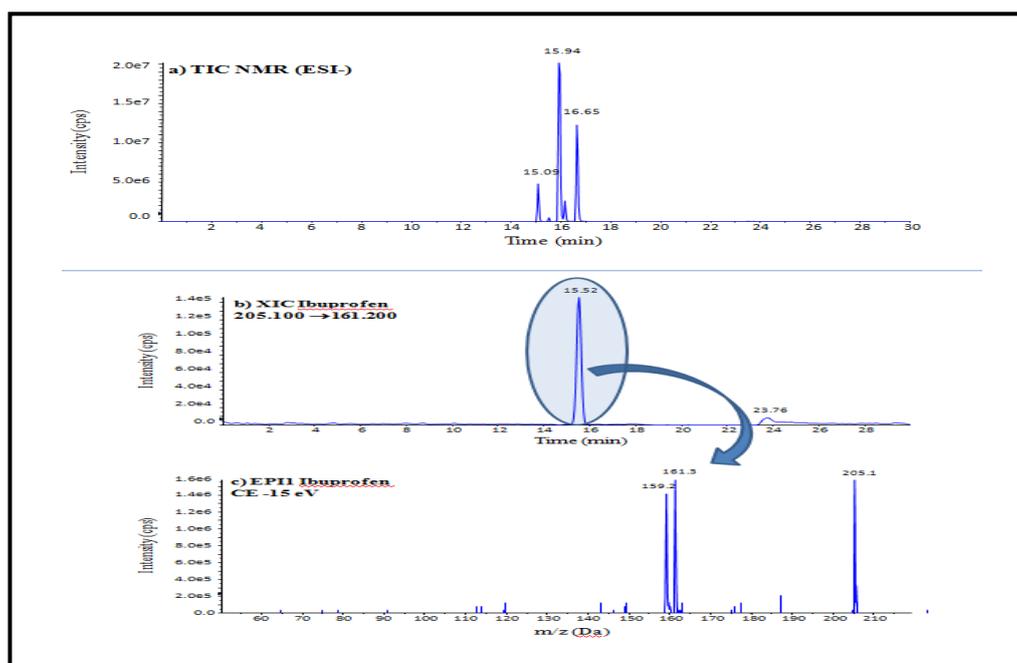
Pour des résultats parfaits par le mode IDA, la transition la plus intense SMR 1 a été utilisée dans l'analyse de balayage et les valeurs opérationnelles ont été optimisées. Les Paramètres IDA incluent l'acquisition de deux ions dont la hauteur maximale dépasse 500 par seconde. L'analyse EPI exécutée par le quadripôle Q1, est maintenue à l'unité de la résolution et la trappe ionique linéaire scanne de 50 à 350 amu tenue à une vitesse de balayage de 10,000 amu s<sup>-1</sup>. Le temps est sélectionné par la trappe ionique. Dans cette manière, deux balayages EPI ont été suivis pour chaque SRM-IDA-EPI, à deux énergies de collisions distinctes CE pour le diclofénac, l'acide tolfénamique et l'ibuprofène (-15 et -25 eV) et pour le bisoprolol et l'acide méclofénamique (25 et 40 eV).

**La figure 9** montre les chromatogrammes de l'ibuprofène, en associant les deux modes opérationnels SRM et EPI. Selon SRM, une seule transition convenable a été obtenue (205.2 161.3 m/z), alors que le spectre EPI (CE -15eV) a déterminé l'ion précurseur (205.2 m/z) et les deux principaux fragments (159,2 et 161,3 m/z).

tr (min)	Precursor ion (m/z)	DP	EP	CPX	SRM1	CE1	SRM2	CE2	SRM2/SRM1	
									(RSD)*	
Ace	6.63	152.200	90	10	5	110.100	20	64.800	20	0.3 (4.0)
Nad	7.05	310.200	90	10	5	254.400	20	236.100	25	0.7 (6.2)
Met	8.21	268.200	90	10	5	116.200	25	159.200	28	0.6 (3.8)
Bis	9.00	326.400	90	10	5	116.400	25	72.000	40	0.1 (5.7)
Bet	9.54	308.200	90	10	5	72.200	40	133.100	34	0.6 (4.6)
Ket	13.30	255.200	90	10	5	105.100	33	209.200	16	0.8 (4.0)
Nap	13.40	231.200	90	10	5	185.300	20	170.100	32	0.4 (6.9)
Dic	15.10	294.000	-90	-10	-5	250.000	-15	214.100	-28	0.1 (2.6)
Ibu	15.50	205.100	-90	-10	-5	161.200	-10	-	-	-
Flu	15.94	280.000	-90	-10	-5	236.000	-24	176.000	-44	0.3 (6.2)
Mec	16.18	294.000	-90	-10	-5	258.000	-21	178.000	-41	0.1 (4.5)
Tol	16.66	260.100	-90	-10	-5	216.000	-18	214.000	-25	0.01 (5.8)

**Tableau 8 :** les paramètres optimisés de LC-QLIT-MS/MS pour chaque composé.

\*RSD: la déviation relative de standard (relative standard deviation).



**Figure 9 :** Le chromatogramme identifiant de l'ibuprofène par le mode SRM-IDA-EPI.

## IV.2 Validation de la méthode

Pour déterminer l'adéquation de la méthode d'analyse SPE-MWCnts-LC-QqQLIT-MS/MS, il est nécessaire de l'appliquer sur des échantillons réels, afin de déterminer la linéarité, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), la précision, la récupération de chaque composé et même l'effet de matrice.

### VI.2.1 effet de matrice

L'effet de matrice en analyse LC/MS, en source électro spray ionique ESI, est décrit pour la première fois par Kebarle et Tang en 1993<sup>290</sup>. Plus de détails sur cet effet et de ses conséquences pour l'analyse des résidus ont été donnés par Antignac et al<sup>291</sup>. Spécialement l'aspect le plus important est la compétition entre l'analyte et la co-élution de la matrice pendant l'ionisation, conduisant soit à une suppression ou à une amélioration du signal qui conduit à des résultats erronés.

Dans ce sens, l'effet de matrice est évalué par une comparaison graphique entre les pentes d'étalonnages obtenues des standards, préparés dans le solvant et dans le blanc de rivière<sup>292</sup>. Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence significative entre les deux pentes. Par conséquent, la quantification de l'échantillon réel est obtenue par les normes de calibration de standard (préparé dans le solvant).

D'autre part, il est connu que des quantités importantes de ces produits pharmaceutiques sont fréquentes dans les eaux usées, ce qui empêche l'utilisation du blanc pour étudier l'effet de matrice. Dans ce cas, les pentes d'étalonnage de standard (préparées dans le solvant) ont été comparées à celles obtenues par la méthode de l'ajout de standard pour chaque composé quelque soit l'échantillon des eaux usées. Des différences significatives ont été aperçues entre les deux pentes de diclofénac et l'ibuprofène dans les influents d'eaux usées, seul le diclofénac a montré l'effet de matrice dans l'effluent d'eaux usées. Par conséquent, et afin d'éviter l'utilisation de deux différentes méthodes d'étalonnage, la quantification des échantillons d'eaux usées (entrée et sortie) a été réalisée par la méthode de l'ajout de standard pour tous les analytes.

<sup>290</sup> P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.* 65 (1993) 972.

<sup>291</sup> J. P. Antignac, K. de Wash, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, B. Le Bizec, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 129.

<sup>292</sup> D. L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam (1997) 190, 209, 436.



### ***VI.2.2 la limite de quantification et de détection.***

Du moment où les tests n'ont pas montré un effet de matrice, l'application de la méthode sur des échantillons réels, est basée tout d'abord sur la détermination de limite de détection et de quantification (LODs et LOQs) dans le solvant.

La limite de détection LOD, déterminée dans le solvant, correspond à la plus faible quantité d'analyte qui a conduit à un signal dont l'intensité est égale à 3 fois le rapport signal/bruit (S/N) pour SRM2. A l'exception de l'ibuprofène qui présente une seule transition SRM, le bisoprolol, le diclofénac, l'acide méclofénamique et l'acide tolfénamique présentent une différence d'intensité dont les intensités SRM2 sont 10 fois plus faibles que les SRM1. Dans ces cas, LODs estimée comme la concentration minimale d'analyte qui a conduit à un signal dont l'intensité est égale à 3 fois le rapport signal/bruit (S/N) pour l'intensité SRM1.

La limite de quantification LOQ est déterminée dans le solvant et correspond à la plus faible quantité d'analyte qui produit un signal dont l'intensité est 10 fois le rapport signal/bruit (S/N) pour l'intensité SRM1.

Les résultats de LOD et LOQ, obtenus dans le solvant, sont de  $0.01\mu\text{g L}^{-1}$  à  $3\mu\text{g L}^{-1}$  et de  $0.05\mu\text{g L}^{-1}$  à  $7.1\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement (**Tableau 9**), ces valeurs indiquent la grande sensibilité du spectromètre de masse et sa capacité à détecter et quantifier les analytes ciblés à très faibles concentrations trouvées dans les échantillons réels.

Les méthodes de limites de quantification et détection (MDL et MQL) sont obtenues de critère décrit ci-dessus par le solvant. Par conséquent les analyses faites de faibles concentrations d'analytes du blancs de rivière (la rivière Nacimiento de Almeria), ils ont conduit aux signaux dont les intensités sont 3 et 10 fois le rapport (S/N), respectivement. Les valeurs envisagés dans l'eau de rivière (**Tableau 9**) sont plus importantes que celles obtenues dans le solvant, les méthodes MDLs et MQLs ont portées de  $0.9$  à  $3.6\mu\text{g L}^{-1}$  et de  $2.3$  à  $12.1\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement. Tenant compte du facteur d'enrichissement de la pré-concentration par SPE-MWCnts qui est 100, MDLs et MQLs sont dans l'ordre  $9 - 3\text{ ng L}^{-1}$  et  $23-121\text{ ng L}^{-1}$ , respectivement dans les échantillons réels de l'eau de rivière.

Composés	Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$R^2$	Solvant		La ravière (NCR)	
			( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
			LOD	LOQ	MDL	MQL
Ace	5-150	0.995	0.5	0.8	2.1	3.6
Bet	5-200	0.997	0.2	0.2	0.9	2.3
Bis	5-200	0.994	0.04	0.1	1.6	5.4
Ket	5-150	0.994	0.2	0.5	2.0	3.2
Met	5-200	0.995	0.1	0.1	1.4	4.2
Nad	8-150	0.999	0.05	0.1	0.9	7.3
Nap	5-200	0.997	3.0	7.1	0.9	5.1
Dic	5-200	0.999	0.1	0.2	0.9	2.9
Flu	5-100	0.998	0.04	0.05	2.5	4.6
Ibu	15-200	0.995	0.1	0.4	3.6	12.1
Mec	5-200	0.995	0.2	0.5	1.9	4.2
Tol	5-100	0.999	0.01	0.05	1.0	3.2

**Tableau 9** : les paramètres de validation et les valeurs de Limite de quantification et de détection.

### VI.2.3 Linéarité

La linéarité de la méthode est étudiée en utilisant des solutions étalons de produits cibles préparés dans le solvant, les concentrations varient de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de chaque analyte [à l'exception du nadolol ( $8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) et du l'ibuprofène ( $12 \mu\text{g L}^{-1}$ )] jusqu'à  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , et ce choix dépend directement des valeurs de MQLs obtenues. Le **Tableau 9** montre l'intervalle de concentrations étudiées ainsi le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de droites d'étalonnage. Les valeurs trouvées de  $R^2$  pour tous les analytes étudiés sont supérieures à 0,99. Pour la plupart des analytes, la linéarité est prouvée jusqu'à  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  sauf pour l'acétaminophène, le kétoprofène et le nadolol pour lesquels la linéarité est limitée à  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  comme une concentration maximale ainsi que l'acide flufénamique et l'acide tolfénamique qui ont été limités à  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### VI.2.4 Précision et exactitude

La récupération et la variation intra-journalière ( $n = 3$ ) sont calculées dans les matrices d'eaux : une ultra pure et d'autre de rivière Nacimiento (NCR), dont deux niveaux de concentration d'analytes ont été confirmée ( $0,05$  et  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Les résultats de deux échantillons d'eau (**Tableau 10**) montrent un taux de recouvrement entre 50,3 et 106,6% et les

valeurs de RSD% sont relativement inférieures à 17%. Sauf l'acétaminophène et l'acide tolfénamique dont les taux de recouvrement sont inférieurs à 50% quelque soit le type d'échantillon, cela peut confirmer les explications vues dans la section III.2.2.2.

Composés	L'eau Ultra pure				L'eau de Rivière			
	0.05 µg mL <sup>-1</sup>		0.10 µg mL <sup>-1</sup>		0.05 µg mL <sup>-1</sup>		0.10 µg mL <sup>-1</sup>	
	R (%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)
Ace	30.0	4.1	24.6	3.4	4.3	1.0	6.5	0.8
Bet	87.2	6.1	72.7	5.8	68.5	3.5	91.7	7.7
Bis	81.5	5.8	91.4	4.9	69.1	10.0	78.2	11.0
Nad	81.3	5.9	98.2	5.7	97.3	11.1	106.6	16.5
Met	80.7	6.1	86.8	5.9	83.0	12.2	79.6	12.0
Ket	94.5	6.0	84.2	5.8	69.1	7.9	70.4	3.0
Ibu	50.3	6.0	76.6	6.1	50.9	8.1	52.1	13.6
Nap	95.1	6.5	88.3	6.3	82.3	16.8	79.2	14.5
Dic	75.7	5.2	97.9	4.6	93.7	16.5	79.0	16.5
Flu	85.6	6.0	88.0	5.6	70.9	10.8	73.2	8.2
Tol	40.3	6.7	49.3	5.8	23.2	3.5	38.1	5.9
Mec	84.2	5.8	95.7	4.6	82.5	15.5	83.9	12.9

**Tableau 10 :** Les récupérations et les RSD% moyennes de PPs dans l'eau ultra pure et l'eau de rivière.

RSD : la déviation relative de standard calculée est la moyenne de trois échantillons identiques. (n=3)

#### VI.2.5 Application aux échantillons de la rivière et des eaux usées

Pour affirmer la faisabilité de la méthode proposée, trois échantillons d'eau de rivière (échantillons ANX1, ANX2 et NCR) ainsi que deux échantillons d'eaux usées : une entrée (IFW) et une sortie de traitement (EFW) ont été analysés par la technique SPE-MWCnts-LC-QqLIT-MS/MS.

Les résultats trouvés sont indiqués dans le **Tableau 11**, et montre que le diclofénac est trouvé à une concentration légèrement supérieure à MQL dans l'échantillon ANX1 (35,5 ng L<sup>-1</sup>), tandis que le naproxène et l'ibuprofène sont aussi présents dans cet échantillon mais à des

concentrations inférieures à leurs MQLs. le bisoprolol, le naproxène, le diclofénac et l'ibuprofène dans l'échantillon ANX2 à des concentrations détectées inférieures à leurs MQLs.

En ce qui concerne les eaux usées, les concentrations élevées sont observées pour l'acétaminophène (3491 ng L<sup>-1</sup>), le naproxène (2237 ng L<sup>-1</sup>), l'ibuprofène (1363 ng L<sup>-1</sup>), l'acide Méclofénamique (1334 ng L<sup>-1</sup>), le Diclofénac (851 ng L<sup>-1</sup>), le kétoprofène (307 ng L<sup>-1</sup>), le bisoprolol (182 ng L<sup>-1</sup>) et le nadolol (80 ng L<sup>-1</sup>) dans l'eau résiduelle, tandis que le métoprolol est détecté à un niveau inférieur de sa limite de quantification. Le bétaxolol, l'acide méclofénamique et l'acide tolfénamique n'ont pas été détectés. D'autre part, seuls l'acide flufénamique (772 ng L<sup>-1</sup>), le Diclofénac (736 ng L<sup>-1</sup>), le bisoprolol (163 ng L<sup>-1</sup>), le kétoprofène (160 ng L<sup>-1</sup>) et le naproxène (98 ng L<sup>-1</sup>) ont été détectés dans l'effluent d'eaux usées à des concentrations très significatives, mais à des concentrations inférieures à celles trouvées dans l'échantillon d'entrée de la station de traitement, l'acétaminophène, nadolol, et l'ibuprofène n'étant pas détectés.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Martínez Bueno et al<sup>293</sup>, qui ont évalué l'apparition et la persistance des produits pharmaceutiques dans les stations d'épuration municipales, où sont trouvés des taux d'élimination de 100% pour l'acétaminophène, de 70% pour le naproxène et l'ibuprofène et de 40% pour le kétoprofène. En outre, les taux d'élimination du nadolol et du bisoprolol (70% et 40%,) sont proches à ceux déclarés par Gabet Giraud et al<sup>294</sup>. Si on prend l'ibuprofène comme exemple, la **figure10** montre l'apparition visible de l'ibuprofène dans l'eau résiduelle, et cela est confirmé par la méthode SRM et IDA. Comme indiqué précédemment, il n'a pas été possible de parvenir à une identification appropriée de l'ibuprofène par SRM en raison de l'absence de la transition SRM2 (l'intensité responsable de l'identification et la confirmation) mais la comparaison des spectres EPI obtenus par IDA avec les spectres EPI internes archivés a permis la confirmation de ce composé dans les échantillons d'eaux usées.

---

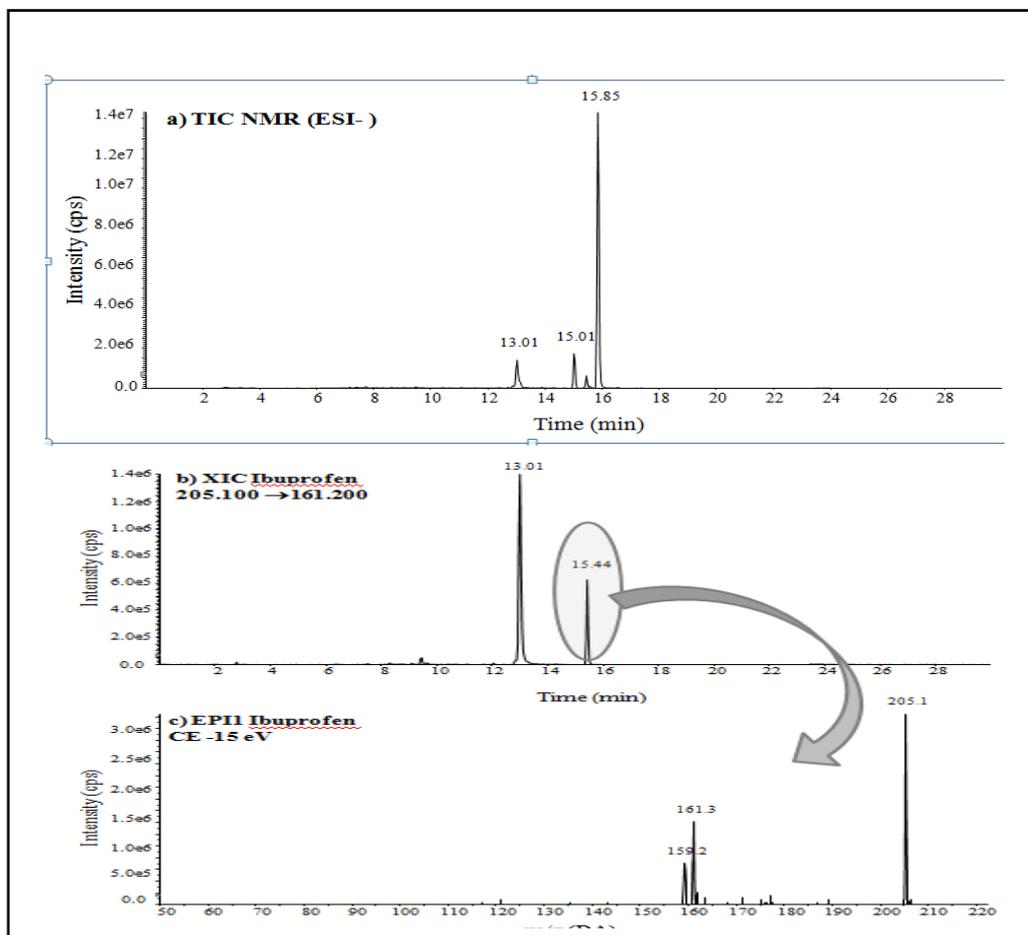
<sup>293</sup> M. J. Martínez Bueno, M. J. Gómez, S. Herrera, M. D. Hernando, A. Agüera, A. R. Fernández-Alba, *Environ. Pollut.* 164 (2012) 267.

<sup>294</sup> V. Gabet-Giraud, C. Miege, J.M. Choubert, S. Martin Ruel, M. Coquery, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 4257.

Composés	L'eau de rivière (ng L <sup>-1</sup> )			Eaux usées (ng L <sup>-1</sup> )	
	ANX1	ANX2	NCR	IFW	EFW
Ace	-	-	-	3491	-
Nad	-	-	-	80	-
Met	-	-	-	<42*	<42*
Bis	-	<54*	-	182	163
Bet	--	-	-	-	-
Ket	-	-	-	307	160
Nap	<51*	<51*	-	2237	98
Dic	36.5	<29*	-	851	736
Ibu	<121*	<121*	-	1363	-
Flu	-	-	-	1334	772
Mec	-	-	-	-	-
Tol	-	-	-	-	-

**Tableau 11:** Les quantités trouvées dans les échantillons d'eau réel par la méthode SPE-MWCNT-LC-QqLIT MS/MS.

-: non détecté ; \* détecté et la concentration est inférieure à celle de MQL.



**Figure10** : l'apparition visible de l'ibuprofène dans l'eau résiduelle par IDA

## VI.2.6 Etude Comparative de MWCNTs avec les cartouches SPE commerciales

Généralement, plusieurs adsorbants classiques de SPE ont été utilisés pour la pré-concentration des produits pharmaceutiques dans les échantillons aqueux, les plus fréquemment utilisés étant Oasis HLB<sup>255,295</sup> et Oasis MCX<sup>263,296</sup>. Dans la plupart des cas, les recouvrements

<sup>295</sup> a) J.D. Cahill, E.T. Furlong, M.R. Burkhardt, D. Kolpin, L.G. Anderson, *J. Chromatogr. A* 1041(2004) 171.

b) A.L.N. van Nuijs, I. Tarcomnicu, W. Simons, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2211.

<sup>296</sup> a) N.A. Al-Odaini, M.P. Zakaria, M.I. Yaziz, S. Surif, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6791.

b) M. Martínez Galera, P. Parrilla Vázquez, M.M. Parrilla Vázquez, M.D. Gil García, C. Ferre Amate, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1796.

c) A.A. Salem, I.A. Wasfi, S.S. Al-Nassibi, *J. Chromatogr. B* 908 (2012) 27.

déclarés pour les analytes cibles sont dans le même ordre que ceux obtenus par notre méthode SPE-MWCnts.

En outre, les cartouches de MWCnts utilisées pour préconcentrer les échantillons aqueux (solvant, l'eau ultra pure) non réels peuvent être réutilisées jusqu'à 10 fois, après un simple lavage avec 5 ml de méthanol, tandis que les cartouches classiques sont généralement rejetées. Les cartouches utilisées pour préconcentrer les échantillons réels ne peuvent pas être réutilisées.

L'utilisation des cartouches à base de MWCnts devient très économique. En les comparant avec les cartouches commerciales de type Oasis HLB, une réduction de 30% des coûts est constatée.

## V. Conclusion

Les cartouches SPE sont préparées seulement par 20 mg de MWCnts au niveau de notre laboratoire. La pré-concentration a été procédée avec succès pour extraire les douze produits pharmaceutiques (quatre  $\beta$  - bloquants et huit anti-inflammatoires non stéroïdiens) dans la rivière et les eaux usées (entré et sortie).

En raison de la largeur spécifique de surface et l'importance de la capacité d'adsorption de cet adsorbant, une excellente efficacité d'extraction est observée pour la majorité des composés étudiés.

Les produits pharmaceutiques ont été analysés par la chromatographie liquide couplée à un hybride triple quadripôle- trappe ionique linéaire spectromètre de masse à ultra-traces. Fonctionner en mode conventionnel (SRM). Cette configuration a permis l'identification et la quantification des analytes, en présentant les deux transitions SRM dont le rapport  $SRM2/SRM1 > 0,3$ . En outre, quand la seconde transition (SRM2) est absente ou présente à faible intensité, une connexion de SRM au mode IDA est nécessaire et l'analyse se fait par un balayage d'EPI ce qui permet une fiable identification pour les faibles concentrations.

La procédure proposée a été appliquée pour l'analyse de trois eaux de rivière et de deux eaux usées (influent et des effluents), les échantillons prélevés sont ceux d'Almería (Espagne). Le Bisoprolol, le naproxène, le diclofénac et l'ibuprofène ont été trouvés dans l'échantillon ANX2 à des quantités inférieures à leur MQLs et le même résultat a été observé pour le naproxène et l'ibuprofène dans l'échantillon ANX2, alors que le diclofénac est marqué à concentration légèrement supérieure à son MQL. D'autre part, tous les produits pharmaceutiques cibles

apparaissent dans les influents des eaux usées, sauf le bétaxolol, l'acide méclofénamique, l'acide tolfénamique, par contre, la quantité du naproxène et de l'acide flufénamique dans les effluents diminue de manière significative. L'acétaminophène, le nadolol, le bétaxolol et l'ibuprofène n'ont pas été détectés. Nos résultats ont montré une cohérence avec ceux déclarés par d'autres auteurs pour les mêmes composés.

Rapport-Gratuit.com

---

*Chapitre III*

**L'extraction des pesticides à l'aide de MWCnts.**

---

**Article 2: Determination of eight pesticides of varying polarity; in surface waters using solid phase extraction with multiwalled carbon nanotubes and liquid chromatography linear ion trap mass spectrometry.**

Soraya Dahane, Maria Dolores Gil Garcia, Ana Ucles Moreno, Maria Martinez Galera, Maria del Mar Socias Viciano, Aicha Dourdour.

*Journal of Microchim Acta 182 (2015)95-103.*

**Abstract**

We describe a MWCNT- based method for the solid phase extraction of eight pesticides from environmental water samples. The analytes are extracted from 100mL samples at pH 5.0 (containing 5 mmol L<sup>-1</sup> of KCl) by passing the solution through a column filled with 20mg of multiwalled carbon nanotubes. Following elution, the pesticides were determined by LC and electrospray ionization hybrid quadrupole linear ion trap MS. Two selected reaction monitoring transitions were monitored per compound, the most intense one being used for quantification and the second one for confirmation. In addition, an information-dependent acquisition experiment was performed for unequivocal confirmation of positive findings. Matrix effect was not found in real waters and therefore the quantification was carried out with calibration graphs built with solvent based standards. Except for cymoxanil, the detection and quantification limits in surface waters are in the range from 0.3 to 9.5 ng L<sup>-1</sup> and 1.6 to 45.2 ng L<sup>-1</sup>, respectively. Recoveries from spiked ultrapure water are ≈100%, except the most polar pesticides methomyl and cymoxanil. The same behavior is found for real water samples (except for phosalone). The standard deviation is < 10% in all cases.

**Keywords:** *Pesticides, Solid phase extraction, Multiwalled carbon nanotubes, Liquid Chromatography-mass spectrometry.*

## I. Introduction

Selon l'agence de protection environnementale américaine (EPA) un pesticide est défini comme une substance ou un mélange de substances, destiné à détruire, à repousser ou à réprimer les ravageurs. Le terme pesticide s'applique aux insecticides, herbicides, fongicides, et diverses autres substances utilisées pour attaquer les parasites<sup>297</sup>. Malgré les tendances à intégrer les programmes de contrôle, les pesticides sont fréquemment utilisés pour la protection des agricultures afin d'assurer que la nourriture de bonne qualité est disponible à des prix raisonnables.

Les N-méthyl carbamates sont largement utilisés dans les maisons, les jardins et l'agriculture. Ils ont la même capacité que les organophosphorés d'inhiber les enzymes cholinestérase et, par conséquent, ils montrent une similitude symptomatologie aiguë et chronique à leur exposition<sup>298</sup>.

Généralement, les fongicides sont utilisés pour protéger les tubercules, les fruits et légumes au cours du stockage où ils sont appliqués directement sur les plantes, arbres, les grandes cultures et les céréales<sup>299</sup>. Bien que la toxicité produite des fongicides pour l'être humain est généralement considérée faible, ils doivent également être contrôlés dans les sources d'eaux, selon la directive de l'Union européenne sur la qualité de l'eau (98/83/CE)<sup>300</sup> : la concentration maximale admissible pour les pesticides est de 0,1 µg L<sup>-1</sup> pour chaque substance et 0,5 µg L<sup>-1</sup> pour la somme de pesticides (compris leurs métabolites).

Les CNT ont été appliquées pour l'extraction de deux composés organiques et inorganiques. En ce qui concerne les premiers, les nanotubes de carbone ont été largement utilisés pour l'extraction de pesticides<sup>281,301</sup>, Cet adsorbant a été utilisé dans les procédures de SPE à préconcentrer les différentes familles de pesticides dans l'eau, les jus de fruits et le sol. Ainsi, les sulfonylurées<sup>302, 303, 304</sup>, insecticides néonicotinoïdes<sup>305</sup>, les pesticides

---

<sup>297</sup> U.S. Environmental Protection Agency. Pesticide Home <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>.

<sup>298</sup> J. R. Roberts, J. R. Reigart, Organophosphate Insecticides, in: Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 6th Ed., U. S. Environmental Protection Agency (2013) pp. 43-55. [http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp\\_ch5.pdf](http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch5.pdf)

<sup>299</sup> H. H. Oruc, *Fungicides and their effects on animals* (2010) pp. 349-362. [http://cdn.intechopen.com/pdfs/12394/InTech-fungicides\\_and\\_their\\_effects\\_on\\_animals.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/12394/InTech-fungicides_and_their_effects_on_animals.pdf)

<sup>300</sup> EU Council, *Directive on the Quality of Water Intended for Human Consumption*, 98/83/CE, European Union, Brussels, (1998)

<sup>301</sup> K. Pyrzynska, *Chemosphere* 83 (2011) 1407-1413

<sup>302</sup> Q. Zhou, W. Wang, J. Xiao, *Anal. Chim. Acta* 559 (2006) 200-206

<sup>303</sup> Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, *Anal. Sci.* 23 (2007) 189-192

<sup>304</sup> H. Niu, Y. Shi, Y. Cai, F. Wei, G. Jiang, *Microchim. Acta* 164 (2008) 431-438

organophosphorés<sup>306</sup>, les acides phénoxyalcanoïques<sup>307</sup> et les pesticides avec diverses polarités<sup>308, 309</sup> ont été pré-concentrés dans l'eau.

D'autres applications de SPE ont été consacrées à l'extraction de : pesticides organophosphorés, l'atrazine et ses métabolites dans les sols<sup>310,154</sup>, les pesticides organophosphorés dans les jus de fruits<sup>153</sup>, les pesticides de multi-classes dans les huiles d'olive vierges<sup>311</sup> et, plus récemment, les nanotubes de carbone ont été utilisés pour modifier la méthode *Quechers*\* dans le quel est servi pour extraire 30 résidus de pesticides dans les fruits et les légumes<sup>312</sup>.

L'objectif principal de cette étude est d'étudier le potentiel de MWCnts comme un adsorbant pour extraire les pesticides : cinq insecticides organophosphorés (méthidation, parathion-méthyl, malathion, phosalone et le diazinon), deux fongicides (cymoxanil et penconazole) et un carbamate (méthomyl), afin d'appliquer cette technique sur des échantillons d'eau environnementaux. La détermination des analytes cibles a été réalisée par triple hybride quadripôle trappe ionique linéaire couplée à la spectrométrie de masse. (LC-QqQ-LIT-MS/MS).

\*: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*<sup>313</sup>

## II. Définition

Un pesticide ou un produit phytosanitaire est une substance émise dans une culture pour lutter contre des organismes nuisibles. C'est un terme générique qui rassemble les insecticides, les fongicides, les herbicides, les parasiticides. Ils s'attaquent respectivement aux insectes ravageurs, aux champignons, aux « mauvaises herbes » et aux vers parasites. Le terme pesticide englobe donc les substances « phytosanitaires » ou « phytopharmaceutiques ».

---

<sup>305</sup> Q. Zhou, Y. Ding, J. Xiao, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1520–1525

<sup>306</sup> Q. Li, X. Wang, D. Yuan, *J. Environ. Monit.* 11 (2009) 439–444

<sup>307</sup> K. Pyrzynska, A. Stafiej, M. Biesaga, *Microchim. Acta* 159 (2007) 293–298

<sup>308</sup> S. Wang, P. Zhao, G. Min, G. Fang, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 166–171

<sup>309</sup> M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, L.M. Ravelo-Pérez, M.A. Rodríguez-Delgado, *Electrophoresis* 29 (2008) 4412–4421

<sup>310</sup> M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodríguez-Delgado, *Anal. Chim. Acta* 6647 (2009) 167–178

<sup>311</sup> S. López-Feria, S. Cárdenas, M. Valcárcel, M., *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7346–7350

<sup>312</sup> P. Zhao, L. Wang, L. Zhou, F. Zhang, S. Kang, C. Pan, *J. Chromatogr. A* (2012) 17-25

<sup>313</sup> F. J. Schenck, J.E.Hobbs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (New York: Springer) 73 (1) (2004) 24–30.

## **II.1 Les insecticides**

Sont des substances actives ayant la propriété de tuer les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction.

Elles sont liées aux modes d'action des insecticides, fondés par exemple sur la neurotoxicité de certaines molécules, ou sur leur impact sur la respiration cellulaire, la formation de la cuticule chitineuse, ou de la perturbation de la mue.

Principalement sont-les:

- Organophosphorés
- Carbamates
- Pyréthriinoïdes de synthèse
- Organochlorés
- Benzoylurées

### ***II.1.1 Les organophosphorés***

La première commercialisation (parathion) date de 1944. Ils sont actuellement les insecticides les plus variés du marché. Ils pénètrent facilement dans l'organisme des insectes par leur liposolubilité élevée. Certains sont spécifiquement acaricides.

La plupart des organophosphorés pénètrent plus ou moins dans le tissu des plantes, étant semi systémiques, ou sont transportés par le système vasculaire de la plante : ils sont alors systémiques.

### ***II.1.2 Les carbamates***

Ce vaste groupe regroupe les dérivés de l'acide carbamique, comprenant aussi un grand nombre de fongicides et d'herbicides.

Les insecticides agissent comme les organophosphorés ; en inhibant le cholinestérase. Certains ont des actions spécifiques (aphicide, molluscicide). Le propoxur, bendiocarbe et dioxacarbe sont utilisés en lutte paludique pour leur grande rémanence.

## ***II.2. Les fongicides***

Un fongicide est une substance conçue exclusivement pour éliminer ou limiter le développement des champignons parasites des végétaux. Les produits à usages médicaux sont dénommés des antimycosiques. Les fongicides sont également produits à l'état naturel par certains végétaux

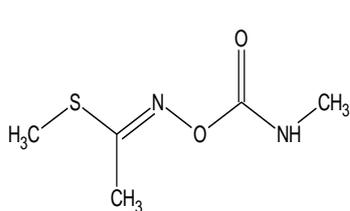
Actuellement, les fongicides employés proviennent de l'association d'une trentaine de matières actives regroupés en plusieurs familles chimiques.

### **III. Développement de la méthode d'analyse de produits pharmaceutiques dans les eaux par SPE/CPL/SM<sup>2</sup>**

#### *III.1 Les spécifications des composés étudiés*

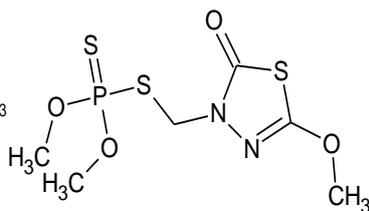
Les molécules concernées par cette étude sont des produits phytosanitaires présents couramment dans les eaux :

- **Les insecticides:** Méthidation, Parathion-Méthyl, Malathion, Phosalone, Méthomyl et le Diazinon.
- **Les fongicides :** Cymoxanil et Penconazole.



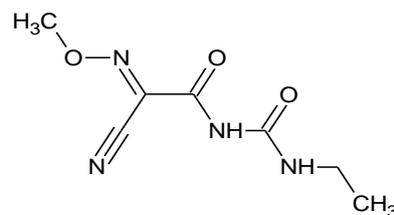
**Méthomyl**

**M=162.2**



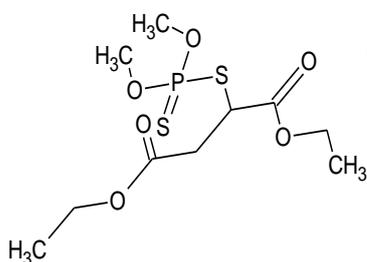
**Méthidathion**

**M=302.3**



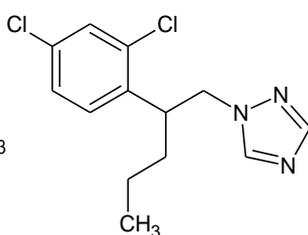
**Cymoxanil**

**M=198.1**



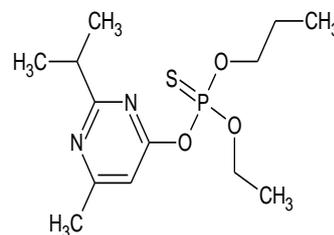
**Malathion**

**M=330.4**



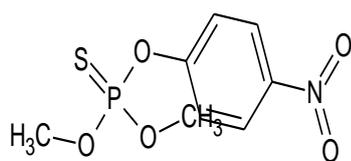
**Penconazole**

**M=284.2**



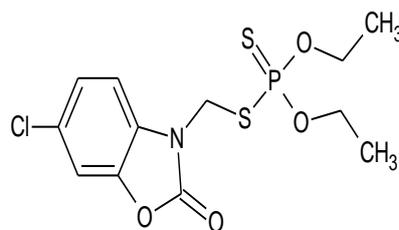
**Diazinon**

**M=304.3**



**Parathion Méthyl**

**M=263.2**



**Phosalone**

**M=367.8**

Les propriétés physicochimiques<sup>314</sup> des pesticides étudiés sont indiquées dans le **Tableau1**.

<sup>314</sup> Pesticide Properties Database (PPDB), Agriculture and Environment Research Unit (AERU). University of Hertfordshire. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/projects/ppdb/>

pesticide	Mode d'action	S (20°C) (mg L <sup>-1</sup> )	Log P	pKa
Méthomyl	Insecticide	55000	0.09	-
Cymoxanil	Fongicide	780	0.67	9.3
Methidathion	Insecticide	240	2.57	-
Malathion	Insecticide	148	2.75	-
Penconazole	Fongicide	73	3.72	1.51
Diazinone	Insecticide	60	3.69	2.6
P.Méthyl	Insecticide	55	3.00	-
Phosalone	Insecticide	1.4	4.01	-

**Tableau 1 :** Les propriétés physicochimiques des pesticides étudiés.

La validation de la méthode a été faite par LC-MS<sup>2</sup>, et optimisée par la chromatographie phase liquide détectée par UV DAD « Diode Array Detector ».

### III.2 L'optimisation de la méthode d'analyse des pesticides par HPLC/DAD.

Le laboratoire est équipé d'un système chromatographique en phase liquide détecté par UV (Waters photodiode array 2996). Ce système comporte quatre parties :

Système de pompage (**water**1525), injecteur (20µL), colonne et détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer.

#### III.2.1 Préparation des standards

La préparation des standards se fait de la même façon, on a préparé une concentration de 400 (mg L<sup>-1</sup>), où le principe actif est dilué dans l'acétonitrile grade HPLC. Les solutions standards sont conservées dans des flacons ambrés et portés à 4°C au frigo.

Les solutions standards sont préparées quotidiennement et individuellement à partir de la solution mère, et sont diluées dans le mélange (50/50, v/v) méthanol-eau ultra pure, elles sont injectées en chromatographie phase liquide. L'identification des pesticides se fait par leurs temps de rétention et en fonction de leurs longueurs d'ondes.

Les composés sont séparés sur une colonne de chromatographie en phase liquide. Le détecteur utilisé est un Diode Array UV.

#### III.2.2 Les conditions chromatographiques et l'influence de chaque paramètre

La chromatographie liquide haute performance est une technique physico-chimique qui permet de séparer les pesticides et même d'optimiser la méthode d'extraction. Différents facteurs influent sur la séparation et l'intensité du pic. Certains d'entre eux sont des conditions

chromatographiques telles que la phase mobile (nature et débit) ou les caractéristiques physiques de la colonne analytique.

Les séparations ont été réalisées sur une phase stationnaire à polarité inverse de type Phenomenex C18 (150 X 4.6, 5µm). Les pesticides sont identifiés individuellement grâce à un programme d'éluion isocratique, où le mélange de la phase mobile était (50/50 :V/V, acétonitrile/eau ultra pure). Le temps de rétention et la longueur d'onde de chaque pesticide sont résumés dans le **tableau 2**

Pesticides	tr (min)	λ(nm)	Pesticides	tr (min)	λ(nm)
Méthomyl	2.05	234	Penconazol	10.88	225
Malathion	11.9	220	Cymoxanil	2.2	270
P. Méthyl	10	220	Phosalone	≤ 20	220
Méthidathion	8	220	Diazinon	19.17	220

**Tableau 2** : le temps de rétention et la longueur d'onde de chaque pesticide injectés individuellement.

### III.2.3 Identification et séparation chromatographique des composés ciblés

L'identification des composés cibles dans un mélange a consisté à changer plusieurs paramètres chromatographiques tels que la phase stationnaire ou trois colonnes (phenomenex : C18 (150 X 4.6, 5µm), C16 (150 X 4.6, 5µm) et thermo C18 (150 X 4.6, 3µm)) ont été utilisées au cours de la séparation. Plus la dimension des pores est petite, plus l'intensité du pic sera meilleure. La taille de pore est diminuée de 5µm à 3µm. En effet, la meilleure séparation des pesticides est réalisée sur une colonne thermo de type C18 (150 X 4.6, 3µm). Le débit utilisé au cours de l'analyse est 0.4 mL/mn

La phase mobile joue un rôle essentiel en HPLC. En plus de son importance pour la séparation des composés, elle influe sur les intensités des signaux observés. Une étude a été menée sur l'influence de la nature du solvant organique et de l'agent acidifiant ajouté à la phase mobile.

Les compositions testées sont : une phase mobile composée d'une part d'acétonitrile et d'autre part 0.1% d'acide formique, eau ultra pure et même le mélange méthanol/ eau ultra

pure. Dans tous les cas, un mode gradient d'élution pour séparer les différents composés est suivi. Le dernier mélange a permis d'achever la séparation des pesticides.

Une solution contenant les composés dans un mélange à 2 mg L<sup>-1</sup> a été préparée dans le mélange méthanol/ eau ultra pur (50/50 v/v) et injectée; en utilisant pour la séparation une phase mobile composée de méthanol/ eau ultra pure. On garde la proportion de la phase organique 50% de méthanol pendant 3 minutes, ensuite incrémente la proportion de solvant organique de 50 à 70% en 20 minutes puis à 100% en cinq minutes en plus. En effet cette proportion de méthanol reste invariable pendant 2 min; avant de revenir aux conditions initiales en deux minutes. La séparation de huit pesticides dans LC/DAD est donc achevée en 32minutes.

Le temps de rétention final de chaque composé dans le mélange est résumé dans le tableau ci dessous (**Tableau3**).

Pesticides	MET	MAL	PMT	MED	PEN	CYM	PHO	DIA
tr(min)	2.98	19.8	17.89	15.02	25.5	4.54	27.5	26.67

**Tableau 3** : Le temps de rétention de chaque composé par la méthode LC/DAD.

### **III.3 Extraction sur phase solide : évaluation et optimisation**

La mise en place du protocole analytique global incluant une étape préalable d'extraction des Pesticides des eaux, a été effectuée. Un protocole d'extraction des produits phytosanitaires par les nanotubes de carbone de type MWCnts a été réalisé, dans lequel les cartouches destinées à l'extraction ont été préparées manuellement au niveau de notre laboratoire. Ce protocole d'extraction a consisté d'étudier et mettre en évidence plusieurs paramètres avant de le valider par LC/QqQLIT/MS. Les paramètres à sélectionner et à confirmer sont : le type de l'éluant et son volume, l'effet des sels, du solvant organique ajouté et le volume de l'échantillon.

#### **III.3.1 La préparation des cartouches de SPE**

L'extraction sur 20mg de multi walled de carbone (6-13nm de diamètre extérieur et 2.5-20µm de longueur) est testée. L'adsorbant est mis dans des seringues de 1ml de capacité de type polypropylène et fixé entre deux frittés (polyéthylène). Sa granulométrie est généralement comprise entre 40 et 60 µm afin de permettre un écoulement facile des échantillons de la

procédure d'extraction sans perte de charge trop importante. On place un fritté dans la cartouche ensuite la pèse et tarer la balance, l'adsorbant est pesé progressivement jusqu'à atteindre la quantité suffisante pour l'analyse. Ensuite enveloppe l'adsorbant par un deuxième fritté en enfonçant par un bâton en verre.

### **III.3.2 La procédure de SPE**

La procédure de l'extraction sur phase solide admet entre trois à quatre étapes en général.

- ❖ La première étape : le conditionnement de l'adsorbant contenu dans la cartouche d'extraction.
- ❖ La deuxième étape : on procède à la percolation de l'échantillon sur le support.
- ❖ La troisième étape : le séchage de l'adsorbant ou la cartouche par un jet d'azote N<sub>2</sub>.
- ❖ La quatrième étape : on procède à l'élution des composés ciblés.
- ❖ La cinquième étape : l'élimination de solvant de l'élution par un jet d'azote N<sub>2</sub>.

La même technique d'extraction décrite dans le chapitre II a été réalisée pour cette partie (extraction à pression négative, en utilisant le même équipement).

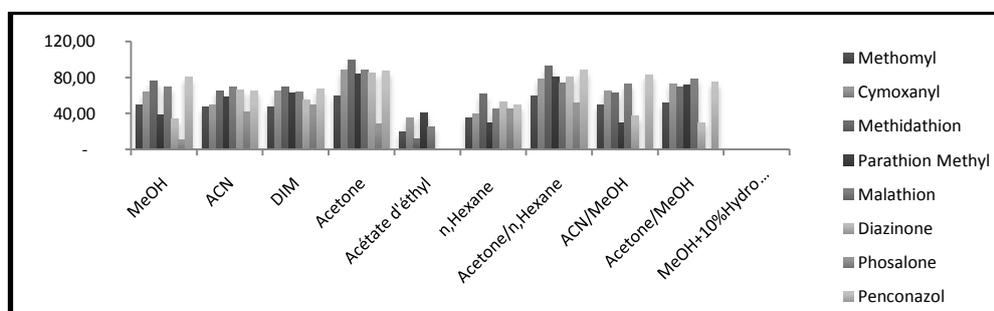
#### **III.3.2.1 le choix de l'éluant**

Une grande capacité d'adsorption de composés organiques est observée par les nanotubes de carbone (CNTs), alors que l'élution complète des analytes est très difficile dans certains cas<sup>281, 315</sup>. Par conséquent, le choix du solvant d'élution a permis de réaliser des études préliminaires, en utilisant des solvants organiques de différentes polarités tels que : le méthanol, l'acétonitrile, l'acétone, le n-hexane, l'acétate d'éthyle, et le dichlorométhane. Dans ces privilégiés, 10mL d'eau ultra pure sont utilisé comme un volume maximal d'échantillon, auxquels on ajoute 20 ng de pesticides, le mélange est extrait à travers une cartouche SPE contenant 20 mg de MWCnts, préalablement conditionnée avec 5 ml du solvant d'élution choisi puis 5mL d'eau ultra pure. Pour chaque solvant testé, le volume consommé d'élution est seulement 2mL. Les résultats constatés montrent que tous les solvants dosés ont un mauvais rendement, à l'exception de l'acétone qui a montré une récupération supérieure à 60% pour la plupart des composés, tandis que pour la phosalone la récupération a été inférieure à 30%. Cela peut être dû à la faible polarité de ce pesticide ( $\log K_{ow} = 4,01$ ), qui reste retenu par l'adsorbant. Afin d'améliorer la récupération de phosalone, nous avons testé des mélanges de solvants dont

---

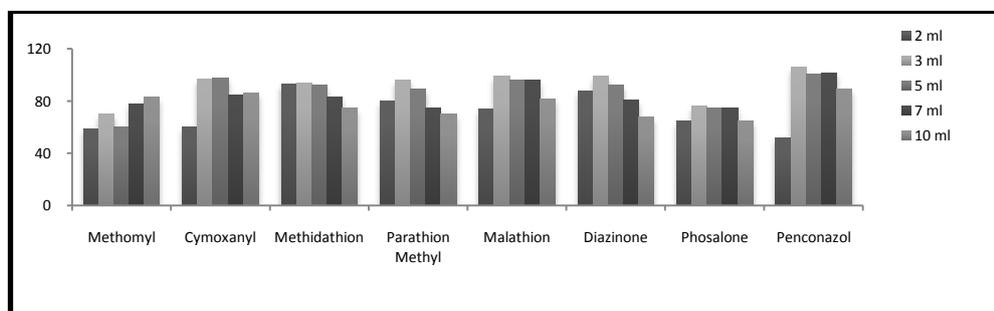
<sup>315</sup> S. Dahane, M.D. Gil García, M.J. Martínez Bueno, A. Uclés Moreno, M. Martínez Galera, A. Derdour, *J. Chromatogr. A* 1297 (2013) 17-28

la proportion (50/50, v/v) tels que acétone/n.hexane (méthanol/acétone), (ACN/méthanol) et méthanol+10% hydroxyde d'ammonium. La meilleure récupération a été observée avec le mélange acétone/n.hexane, qui atteint les 50%. En conséquence, ce mélange est choisi comme un solvant d'élution pour le reste des testes à venir (**Figure 2**).



**Figure 1** : La récupération des pesticides dans les différents solvants organiques.

Ensuite, le volume d'élution du solvant choisi (acétone: n-hexane 50:50, v / v) a été étudié entre 2 et 10 mL. Les résultats obtenus (**Figure 2**) ont montré qu'un volume de 3 ml d'acétone / n-hexane (50:50 v / v) est suffisant pour achever l'élution de tous les pesticides extraits par MWCnts, pour lesquels les taux d'extraction varient entre 70% pour le méthomyl et le phosalone et 100% pour le reste.



**Figure 2** : L'amélioration de rendement des pesticides dans les différents volumes de mélange (acétone/n.hexane).

### III.3.2.2 L'étude du pH, l'effet de sels et du solvant organique

Le pH de l'échantillon a un effet important sur la récupération, au cours d'une technique SPE, cela permet de définir l'état moléculaire des composés cibles (ionique ou neutre). Les pesticides sélectionnés ne présentent pas de propriétés acide-base, seulement le penconazole, le diazinon et le Cymoxanil présentent des valeurs de pKa 1,5, 2,6 et 9,3 respectivement. De ce

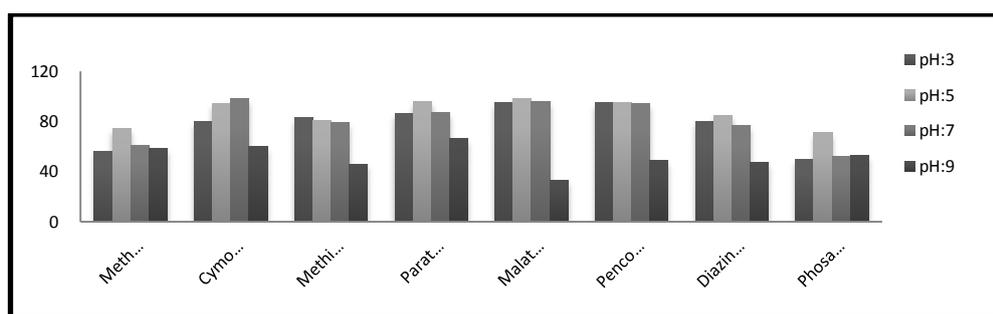
fait, les valeurs de pH évalués sont de l'ordre de 3 à 9. Dans cette étude les valeurs extrêmes de pH n'ont pas été prises en considération, en raison, de l'hydrolyse éventuelle de certains pesticides dans des conditions fortement acides ou basiques.

Les tests ont été effectués en utilisant 50 mL d'eau ultra-pure contenant 20 ng de chaque pesticide, ajustées à différentes valeurs de pH à l'aide d'acide chlorhydrique à 0,1 mol L<sup>-1</sup> ou de l'hydroxyde de sodium 0,1 mol L<sup>-1</sup>. La récupération de chaque pesticide est mentionnée dans le **Tableau 4**.

En général, le taux de récupération est similaire pour les deux pH 3 et 7, à l'exception de méthomyl et le phosalone qui ont montré de meilleurs taux de récupération à pH 5. La récupération est faible pour la plupart des pesticides à pH 9, probablement dû à leur dégradation. Le pH 5 a été considéré comme une valeur optimale dans cette étude.

Pesticides	MET	CYM	MED	PMT	MAL	PEN	DIA	PHO
pH:3	56	80	83	86	95	95	80	50
pH:5	74	94	81	96	98	95	85	71
pH:7	61	98	79	87	96	94	77	52
pH:9	58	60	46	66	33	49	47	53

**Tableau 4** : La récupération des pesticides en fonction de pH par MWCnts.



**Figure 3** :L'amélioration du rendement des pesticides en fonction de pH.

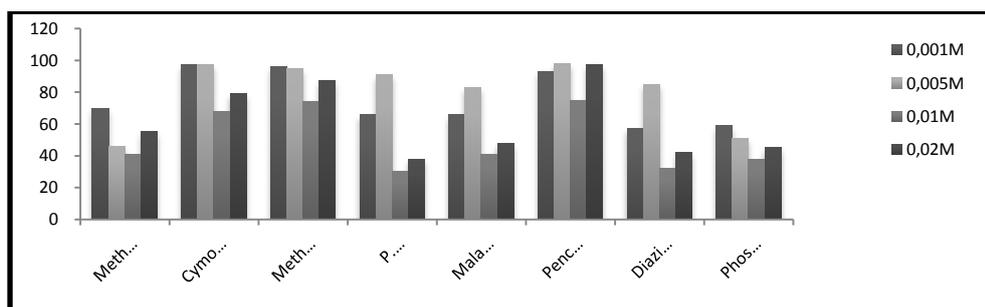
D'autre part, l'effet de sels sur le rendement d'extraction a également été étudié. Il est bien connu que la présence de sels dans l'eau peut affecter la rétention des analytes par l'adsorbant au cours de SPE<sup>316</sup>. L'addition de sel à l'échantillon d'eau améliore généralement la rétention

<sup>316</sup> H. Bagheri, Z. Ayazi, A. Aghakhani, *Anal. Chim. Acta* 683 (2011) 212–220.

des analytes dans les adsorbants de SPE, ce qui implique une diminution de la solubilité des composés cibles dans les échantillons aqueux, les rendant ainsi plus favorables à une extraction sur une phase solide<sup>317</sup>. L'augmentation du rendement des pesticides peut être expliquée par l'hydratation des sels par les molécules d'eau, cela empêche la dissociation totale des analytes dans l'eau<sup>318</sup>. Tandis qu'à concentration élevée de sels, l'interaction entre les ions de sel et les analytes prédominent, ce qui réduit leur capacité d'être retenus dans l'adsorbant.

Dans ce contexte, l'effet de sel a été examiné par l'analyse des extraits des échantillons-SPE de l'eau ultra-pure acidifiée à pH :  $5 \pm 0.1$  contenant différentes concentrations de KCl (de 0 à  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ). Les résultats obtenus (Figure 5) montrent que les rendements d'extraction des composés étudiés restent constants ou augmentent relativement à une concentration de  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl pour la plupart des pesticides. Avec de plus fortes concentrations de KCl, la rétention des pesticides diminuent progressivement.

La concentration de KCl ( $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ ) est ajoutée aux échantillons d'eau pour les tests à venir.



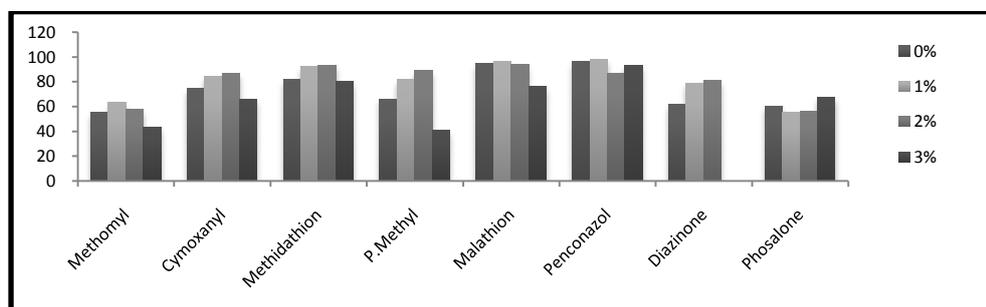
**Figure 4** : La récupération des pesticides par MWCnts en fonction de KCl.

Enfin, l'addition de solvant organique a été évaluée de manière à améliorer la récupération de pesticides. Dans ce but, 50 mL d'échantillon d'eau ultra-pure acidifiée à pH :  $5 \pm 0.1$  contenant  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl et 20 ng de chaque pesticide ont été modifiés par l'addition de différentes quantités de méthanol (de 0 à 3% v / v). Il est clairement observé (Figure 6) que l'addition de 1 ou 2% de méthanol a augmenté le taux de récupération de la plupart des pesticides, avec des résultats similaires pour les deux valeurs, à l'exception du phosalone (plus apolaire), ce qui a donné de meilleurs taux de récupération avec 3% de méthanol, mais ce pourcentage a diminué les taux de récupération pour les quatre pesticides polaires car la force

<sup>317</sup> Z.L. Zhang, J.L. Zhou, *J. Chromatogr. A*, 1154 (2007) 205–213.

<sup>318</sup> R. Carabias- Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernandez, F.J. Sanchez-San Roman, M.G. Prado Flores, *J. Chromatogr. A* 950 (2002) 157.

éluotropique augmente avec le pourcentage de méthanol dans l'eau. Par conséquent, l'optimisation de la méthode est réalisée par 1% de méthanol.



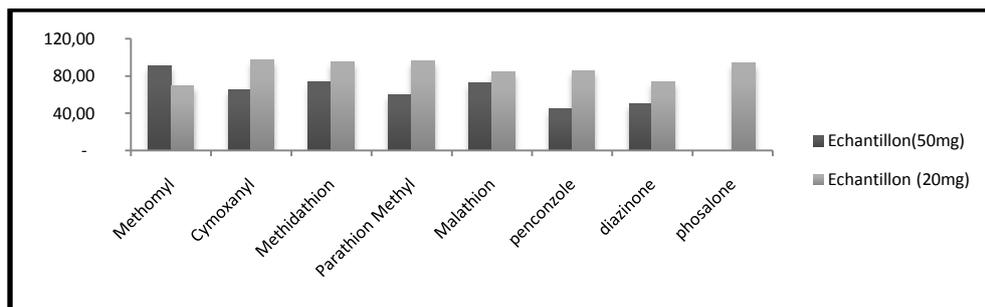
**Figure 5** : La récupération des pesticides par MWCnts en fonction de Méthanol.

### III.3.2.3 Le débit de l'écoulement

Dans le chapitre antérieur, nous avons découvert que la taille des particules de MWCnts (OD  $\times$  L de 6-13 nm  $\times$  2,5-20  $\mu$  m) réduit le débit de l'échantillon à travers l'adsorbant et de ce fait, conduit à une augmentation significative du temps de pré-concentration<sup>315</sup>. Les résultats obtenus dans ce travail ont montré que les débits supérieurs à 1 ml mn<sup>-1</sup> conduisent à de faibles récupérations. Par conséquent, le débit est limité à 1 ml mn<sup>-1</sup> au cours de la procédure SPE-Cnts.

### III.3.2.4 La quantité de MWCNTs

L'effet de la quantité de l'adsorbant sur la rétention des pesticides dans une cartouche SPE; a été étudié en utilisant 20 et 50 mg de MWCnts. La petite taille des particules de Cnts (OD  $\times$  L de 6-13 nm  $\times$  2,5-20  $\mu$  m) a empêché de vérifier les grandes quantités, cela entraîne une difficulté de passage de l'échantillon à travers l'adsorbant, ce qui nécessite plus de volume d'éluant<sup>315</sup>. Les résultats trouvés montrent que seulement le méthomyl atteint 91 % de récupération pour les 50mg, alors que le reste des composés présente des récupérations inférieures à celles obtenues pour 20 mg. Le phosalone le plus apolaire n'a pas été récupéré ou bien mal élué (0%) par le volume d'éluant (3mL) qui s'avère insuffisant. Ce comportement peut être expliqué par la forte capacité d'adsorption des Cnts qui a amélioré la récupération du méthomyl qui est très polaire à 50 mg de Cnt, le penconazole apolaire est fortement retenu. La récupération n'a pas été améliorée par l'augmentation de la quantité de Cnts, par conséquent, les 20 mg de Cnts ont été choisis comme une idéale quantité pour les expériences à venir.

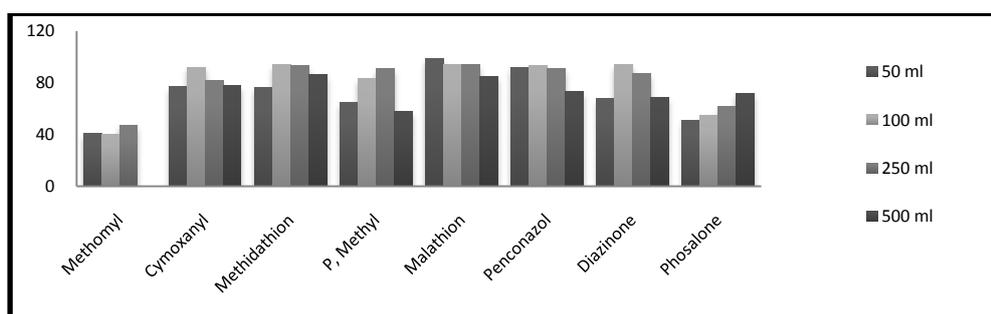


**Figure 6** : La récupération des pesticides par MWCnts en fonction de la quantité de Cnts.

### III.3.2.5 Effet du volume d'échantillon

Les normes retenues par l'union européenne UE<sup>300</sup>, pour la consommation humaine des pesticides dans l'eau potable sont entre (0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour un pesticide unique et 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour tous les pesticides). Donc le volume de l'échantillon est important pour obtenir une meilleure récupération avec un plus grand facteur d'enrichissement.

De ce fait, le volume de l'échantillon est estimé en appliquant la procédure de SPE à différents volumes d'eau ultra-pure acidifiée à pH :  $5 \pm 0.1$  dopés par la même quantité de pesticides (20 ng) et contenant 0.005mol  $\text{L}^{-1}$  de KCl, 0.1% de méthanol (figure 8). Les résultats obtenus montrent une stabilité de rétention des analytes dans les différents volumes, à l'exception du méthomyl, qui est complètement élué au-delà de 250 mL de volume. Bien qu'il soit évident que le volume est 250 mL, le volume réduit à 100mL, dans le but de réduire le temps et même en raison de la grande sensibilité de la méthode LC-MS/MS.



**Figure 7** : L'amélioration de rendement des Pesticides en fonction de volume d'échantillon.

## IV.Validation et optimisation de la méthode par LC-QqQLIT-MS/MS

### IV.1 LC-QqLIT-MS/MS procédure

#### IV.1.1 Conditions

Les analyses des huit pesticides dans des échantillons environnementaux ont été réalisées par chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

La séparation chromatographique des pesticides est réalisée sur une colonne analytique de type ZORBAX Eclipse XDB C8 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) ; en mode gradient où l'acétonitrile est utilisée comme (solvant A) et 0.1% de l'acide formique comme (solvant B). Le programme de gradient d'éluion est le suivant: premièrement 10% de solvant A à 0,5 minutes. Et pendant 9 minutes maintenir les 100% de solvant A, puis rester dans ces conditions 5minutes. Ensuite revenir aux conditions initiales après 0.1minutes et les garder pendant 10 minutes. Le volume d'injection est 10 $\mu\text{l}$ , le débit de l'analyse est fixé à 0.4mL mn<sup>-1</sup>.

La chromatographie liquide couplée à un hybride triple quadripôle trappe ionique linéaire (QqQ-LIT) et une spectrométrie de masse (5500 QTRAP<sup>®</sup>), une source électrospray (ESI) et a été exploité et utiliser en mode d'ionisation positive (PI). Les paramètres de la source TurboIonSpray ont été définis de façon à obtenir la sensibilité la plus satisfaisante possible pour l'ensemble des pesticides. En réalité, le seul paramètre réellement influant et optimisable en multi-résidus est la température de désolvatation. Celle-ci est fonction du débit et de la composition de la phase mobile. Ainsi, à un débit de 0.4 mL min<sup>-1</sup>, une température minimale de 500 °C est nécessaire pour évaporer efficacement l'éluant au cours du gradient d'éluion.

Gaz rideau (curtain Gaz (CUR) 30 (unités arbitraires, psi)) : ce gaz assiste l'ionisation et permet la création d'un spary. Il sert à désolvater les molécules de la phase mobile et donc à produire des ions. La pression appliquée dépend essentiellement du débit de la phase mobile.

Gaz de collision (CAD) moyen, Ion Source gaz (GS1 et GS2) 50 psi et IonSpray Voltage (IS) 5500 V en mode d'ionisation positive. L'azote a été utilisé comme un gaz de nébulisation et gaz de collision.

Les paramètres de la source d'ionisation ESI peuvent être classés en deux catégories lors d'une acquisition, d'une part les paramètres fixes, c'est à dire identique à toutes les molécules et d'autre part les paramètres variables dépendant de la molécule étudiée. Par ailleurs, si certains ont une faible influence, d'autres au contraire sont déterminants. La pression des différents gaz est l'un des paramètres communs à tous les composés analysés. Il est donc

important de trouver les conditions optimales de pression de gaz pour l'ensemble des molécules de la sonde ESI pour influencer significativement sur l'efficacité de l'ionisation des composés. En revanche, certains paramètres sont spécifiques à la molécule à doser, comme les valeurs des énergies de collision qui sont à déterminer pour chaque composé étudié.

#### IV.1.2 Optimisation

La séparation chromatographique des huit pesticides est réalisée par la modification d'une méthode déjà publiée<sup>319</sup>, qui a été développée pour l'analyse de 70 pesticides dans l'eau de la rizière, y compris deux des huit pesticides sélectionnés (diazinon et malathion). La colonne et la phase mobile sont les mêmes, mais le gradient a été légèrement modifié en raison de la diminution du nombre d'analytes considérés dans cette étude.

Le processus d'ionisation par electrospray en mode positif (PI) conduit à la formation de plusieurs ions à partir de la molécule initiale qui peuvent se présenter sous la forme d'un ion précurseur protoné  $[M+H^+]$  pour tous les pesticides. Afin de s'accorder aux exigences de l'UE, les deux transitions les plus intenses pour chaque pesticide ont été sélectionnées<sup>320</sup>.

Pour chaque composé, l'ion majoritaire est déterminé par infusion directe dans le spectromètre de masse d'une solution de chaque composé à  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Cette étape a été effectuée en l'absence de colonne chromatographique. Les paramètres de la source d'ionisation ESI de chaque composé sont optimisés et indiqués dans le **Tableau 5**.

---

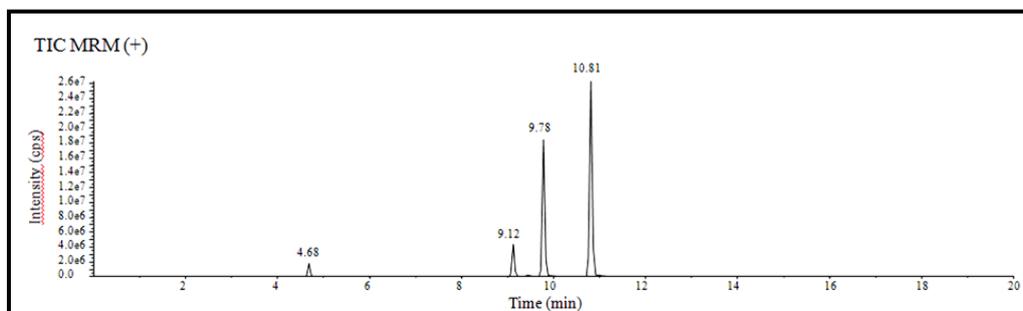
<sup>319</sup> L. Pareja, M.J. Martinez-Bueno, V. Cesio, H. Heinzen, A.R. Fernandez-Alba, J. *Chromatogr. A* 1218 (2011) 4790-4798

<sup>320</sup> Commission Decision 2002/657/EC. *Off. J. Eur. Commun.* 1.221 (2002)8.

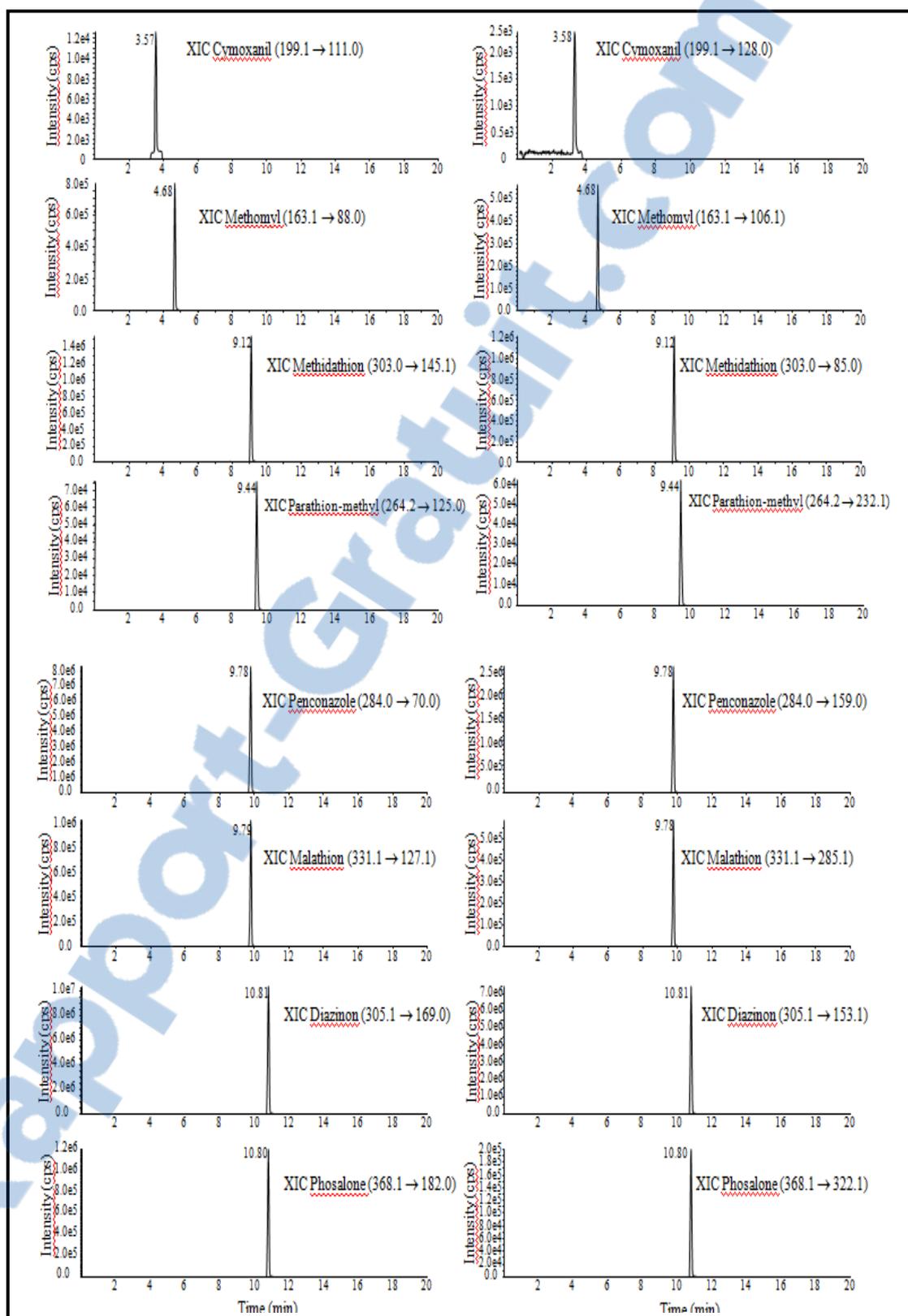
Analytes	t <sub>R</sub> (mn)	Précurseur ion (m/z)	DP	EP	CPX	CE1	SRM1	CE2	SRM2	SRM2/SRM1 ± (*)
Méthomyl	4.67	163.1	60	10	4	15	88.0	15	106.1	0.75 ± 0.15
Cymoxanil	3.61	199.1	84	10	4	25	111.0	13	128.0	0.19 ± 0.04
Méthidathion	9.13	303.0	60	10	4	13	145.1	27	85.0	0.84 ± 0.17
Malathion	9.80	331.1	60	10	4	16	127.1	11	285.1	0.70 ± 0.14
Penconazole	9.78	285.0	100	10	4	27	70.0	20	159.0	0.30 ± 0.06
Diazinon	10.80	305.1	100	10	4	30	169.0	27	153.1	0.75 ± 0.12
P-méthyl	9.45	264.2	140	10	4	27	125.0	24	232.1	0.72 ± 0.14
Phosalone	10.80	368.1	120	10	4	19	182.0	13	322.1	0.17 ± 0.03

**Tableau 5:** les paramètres optimisés de LC–QLIT-MS/MS pour chaque composé.

Le chromatogramme ionique total (TIC) et les deux chromatogrammes d'ions extraits ou fragments (XIC) d'une solution de mélange étalon des pesticides sélectionnés sont présentés dans la figure 8(a-b).



**Figure 8a :** Le chromatogramme total de pesticides (TIC) par LC-QqQ-LIT-MS/MS.



**Figure 8b** : Les chromatogrammes d'ion extrait de chaque pesticide (XIC) par LC-QqQ-LIT-MS/MS.

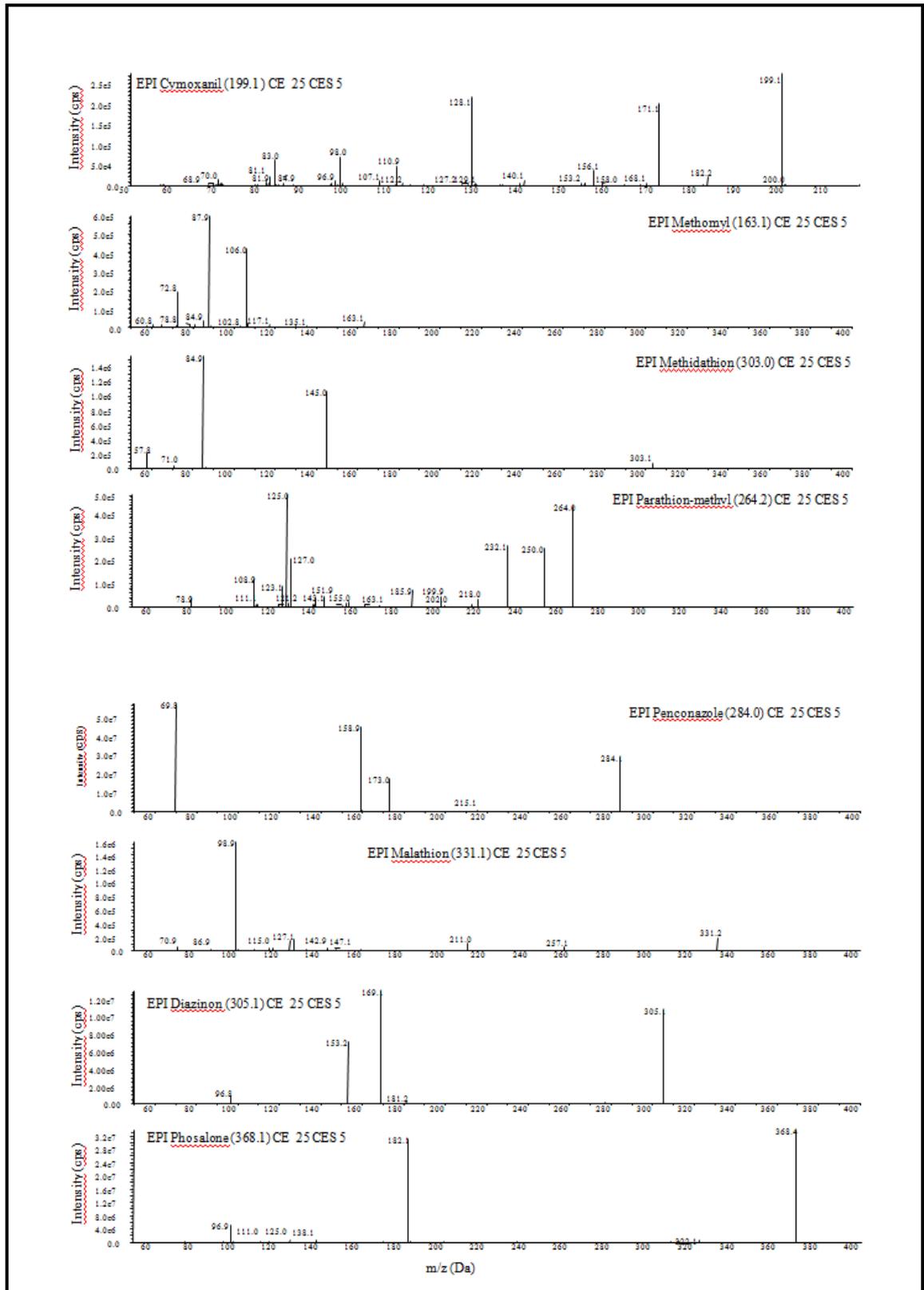
En mode d'acquisition SRM, deux transitions ont été détectées, ou la plus intense est choisie SRM1 pour la quantification, tandis que les deux transitions les plus intenses de SRM (SRM1 et SRM2) ont été utilisées pour l'identification. En outre, afin d'éviter une surestimation ou des faux résultats dans l'analyse quantitative, d'autres critères ont été utilisés pour l'identification: (a) la mise en correspondance du temps de rétention LC (tr) du pesticide dans les standards avec ceux des échantillons réels (tr pesticides dans l'échantillon réel doit être égale à  $\pm 2\%$  du tr de pesticides étalon) et (b) la comparaison entre les deux abondances relatives des deux transitions SRM sélectionnées (SRM2/SRM1) dans les échantillons réels et standards ; pour lesquels les valeurs trouvées sont dans l'ordre de  $\pm 20\%$  par rapport à ceux calculés par le standard d'analyse<sup>263</sup>.

Selon le deuxième critère, nous avons calculé les abondances des produits cibles à partir d'un mélange de standards. Les résultats observés, pour les abondances des deux fragments sélectionnés (SRM1 et SRM2), sont similaires pour la plupart des analytes SRM2/SRM1 qui varie entre 0,84 et 0,70 ; sauf le cymoxanil et le phosalone pour lesquels le rapport SRM2/SRM1 est inférieur de 0,3. Dans ce cas, la transition SRM2 ne peut pas être utilisée pour l'identification à des faibles concentrations. Cet inconvénient peut être surmonté par l'approche IDA. Et également par les spectres EPI (Enhanced Product Ion) qui sont plus performants et à haute sensibilité pour les faibles concentrations<sup>321</sup>. Ainsi, des informations structurelles de confirmation sont remportées pour le cymoxanil et le phosalone en mode IDA. Une confirmation supplémentaire pour le reste des analytes a été établie.

L'approche IDA utilisée dans cette étude a combiné le mode d'acquisition de SRM avec un ion produit plus performant (PEI). Les spectres PEI ont été acquis en utilisant la diffusion de l'énergie de collision (CES) avec CE = 25 V et CES de 5 V, de telle sorte que la piège a été rempli automatiquement par des ions de fragments obtenus à trois énergies différentes (CE-CES, CE, CE + CES), qui sont de 20 V, 25 V et 30 V, et convenablement la fragmentation a été obtenu pour tous les pesticides. **La figure 9** résume les spectres du PEI de chaque pesticide dans les conditions optimales.

---

<sup>321</sup> M.J. Martínez Bueno, A. Agüera, M.D. Hernando Guil, M.J. Gómez, A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5995-6002.



**Figure 9** : Les spectres du EPI de chaque pesticide dans les conditions optimales.

Les spectres PEI reproduits de chaque pesticide ont été comparés à ceux de la bibliothèque de spectre de masse. Une bonne corrélation a été observée entre les deux spectres. Les critères

de confirmation pour identifier les composés cibles ont une valeur d'ajustement supérieure à 70%.

## IV.2 Validation de la méthode

La méthode proposée de SPE-MWCNT-LC-QqLIT-MS/MS, est évaluée par l'estimation de la limite de détection et de quantification, la linéarité, les effets de matrice, la précision et l'exactitude.

### IV.2.1 la limite de quantification et de détection.

Les limites instrumentales de détection (IDL) et de quantification (IQL) sont estimées par l'injection directe d'un mélange de pesticides étalon (acétonitrile/eau ultra pure, 10/90, v / v) à de faibles concentrations. Les IDL sont déterminées par la plus faible concentration de pesticides dont la transition SRM2 est présentée par la norme  $S / N = 3$ , tandis que les IQL sont déterminées par la plus faible concentration de pesticide dont la transition SRM1 est montrée par le rapport  $S / N = 10$  (**tableau 6**). La limite instrumentale de détection (IDL), obtenue pour tous les analytes, varie entre 0,02 et 0,25  $\mu\text{g L}^{-1}$  et la limite instrumentale de quantification (IQL) varie entre 0,07 et 0,93  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Analytes	Solvant		NCR		ANX		BNT		GUA	
	IDL	IQL	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
MET	0.04	0.07	0.55	2.18	0.71	1.31	0.57	2.35	0.52	2.37
CYM	0.19	0.93	7.72	23.50	5.56	26.60	12.10	54.14	5.36	27.17
MED	0.02	0.08	0.18	0.45	0.18	0.57	0.14	0.31	0.13	0.35
MAL	0.02	0.07	0.36	1.31	0.28	1.31	0.47	1.46	0.23	0.83
PEN	0.02	0.09	0.45	2.68	0.48	0.92	0.39	1.78	0.57	1.43
DIA	0.02	0.08	0.06	0.25	0.06	0.33	0.03	0.16	0.05	0.23
PMT	0.25	0.92	0.95	4.52	0.82	3.19	0.47	4.20	0.80	2.53
PHO	0.16	0.29	0.37	1.22	0.39	1.30	0.36	1.20	0.33	1.11

**Tableau 6** : Les valeurs de Limite de quantification et de détection de chaque pesticide.

En outre, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été calculées en utilisant le critère décrit ci-dessus. Dans ce contexte des échantillons à blanc de quatre types d'eau environnementale (deux rivières et deux eaux de décharge) sont pré-concentrés par la méthode SPE et dosés à faibles concentration de pesticides. Le (**Tableau 6**) illustre bien les valeurs obtenues par les différents échantillons. On constate que la LOD et la LOQ sont

semblables pour l'ensemble des échantillons, mais légèrement élevées pour celles calculées dans le solvant (LOD entre 0,03 et 0,95  $\mu\text{g L}^{-1}$  et LOQ entre 0,16 et 4,52  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sauf le cymoxanil qui montre des valeurs nettement élevées que celles trouvées dans le solvant.

Tenant compte du facteur de pré-concentration établi dans cette méthode (100), les limites de détection et de quantification, dans les échantillons réels, sont entre 0,3 et 9,5  $\text{ng L}^{-1}$  (LOD) et entre 1,6 et 45,2  $\text{ng L}^{-1}$  (LOQ) pour tous les pesticides sauf le cymoxanil qui présente 121,0  $\text{ng L}^{-1}$  (LOD) et 541,4  $\text{ng L}^{-1}$  (LOQ).

#### ***IV.2.2 Linéarité***

La linéarité de la méthode est étudiée à partir des droites obtenues des solutions étalons des analytes cibles. Les concentrations varient de la valeur d'IQL de chaque analyte jusqu'à 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . L'intervalle de linéarité diffère d'un pesticide à l'autre. Si on prend les droites, le diazinon s'est limité à 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , le cymoxanil, le malathion et le méthomyl à 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , le méthidathion, parathion-méthyl et phosalone à 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Seul le penconazole atteint les 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  comme limite maximale de linéarité. Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) pour tous les analytes est supérieur à 0,99.

#### ***VI.2.3 effet de matrice***

L'effet de matrice est évalué par une comparaison graphique entre les pentes d'étalonnage obtenues des standards préparés dans le solvant et dans le blanc de rivière (rivière et de décharge)<sup>322</sup>. Pas de différence significative entre les pentes. Cela peut s'expliquer clairement par le non existence d'effet de matrice dans les échantillons réels pour l'ensemble des analytes cible. Par conséquent, la quantification des pesticides dans les échantillons d'eau réels a été effectuée à l'aide des normes de calibration de standard.

#### ***IV.2.4 Précision et exactitude***

La récupération des pesticides réalisée par cette procédure SPE- MWCNT proposée, est évaluée par trois répliques de deux niveaux de concentration 5 et 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour le diazinon et 25

---

<sup>322</sup> D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J.Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam, (1997), pp. 190, 209, 436.

et 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour les autres pesticides. Ils sont fortifiés directement dans les échantillons d'eau ultra pure. Le taux de récupération dans l'eau ultra-pure (tableau 4) atteint les 100%, sauf les plus polaires tels que le méthomyl et le cymoxanil qui sont partiellement récupérés. Cela est dû à leurs solubilités dans l'eau (Tableau 1).

La précision de la méthode est confirmée par les valeurs satisfaisantes (3,0 à 9,3%); de l'écart type relatif (RSD %) moyen des échantillons de trois répliques. (**Tableau 7**).

#### **IV.2.5 Application aux échantillons de la rivière et des eaux usées**

Pour une confirmation de l'applicabilité de la méthode SPE-MWCNT-LC-QqLIT-MS/MS, deux types d'eaux environnementales ont été testés (deux de rivière et deux de décharge). Les échantillons sont préparés en trois répliques et fortifiés en deux niveaux de concentrations 5 et 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour le diazinon et 25 et 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour les autres pesticides, les récupérations moyennes obtenus sont illustrés dans le **Tableau 7**.

Le même comportement des pesticides est observé au cours de l'extraction des échantillons réels et de l'eau ultra pure, mais, en outre le phosalone qui présente une polarité importante par rapport aux autres pesticides, a montré une faible récupération dans trois échantillons réels (ANX, BNT et GUA) entre (65-57)%. Cette diminution est attachée à la présence des composants organiques dans les échantillons prélevés.

Analytes	Eau ultra pure		NCR		ANX		BNT		GUA	
	25	50	25	50	25	50	25	50	25	50
MET	51 (7)	54 (6)	43 (5)	50 (4)	49 (6)	52 (6)	60 (5)	53 (6)	56 (7)	58 (7)
CYM	80 (6)	59 (4)	86(10)	57 (7)	79 (8)	71 (8)	71 (7)	68 (5)	74 (6)	68 (4)
MED	100 (5)	95 (5)	98 (8)	98 (6)	84 (7)	86 (5)	93 (4)	86 (4)	84 (6)	90 (5)
MAL	110 (5)	122 (6)	86 (8)	97 (6)	77 (6)	107 (4)	89 (5)	107 (4)	109 (6)	76 (3)
PEN	100 (4)	86 (4)	66 (9)	69 (7)	87 (6)	102 (4)	86 (7)	73 (5)	87 (6)	91 (6)
DIA*	106 (3)	121 (4)	91 (6)	58 (4)	111 (3)	96 (4)	94 (7)	70 (5)	71 (5)	72 (5)
PMT	89 (6)	81 (5)	81 (8)	83 (6)	79 (6)	72 (5)	95 (4)	79 (4)	84 (6)	72 (4)
PHO	115 (5)	81 (3)	98 (7)	89 (4)	65 (8)	64 (8)	57 (6)	57 (4)	58 (7)	60 (7)

**Tableau 7:** La moyenne de récupération (%) et de RSD (%) de chaque pesticide dans l'eau ultra-pure et environnementale.

\*0.005 et 0.01  $\text{ng L}^{-1}$ , RSD, relative standard deviation (n=3).

Ces composés organiques sont présentés comme une matière organique naturelle macromoléculaire (humique) issue de la polymérisation de composés liés aux processus de dégradation biologique et d'oxydation chimique de déchets végétaux et animaux. Elle existe dans l'environnement et elle interfère avec MWCnts. Ces substances humiques sont divisées arbitrairement en deux entités humiques et fulviques. Elles incluent dans leur structure des sites aliphatiques et aromatiques, dont 30% sont aromatiques (substitués par des chaînes alkyles et des groupements carboxyles, cétones et hydroxyles) et même des structures polycycliques (poly-aromatique et composés de type furane et pyridine). Le poids moléculaire important et le caractère hydrophobe de ces composants renforcent la capacité d'adsorption par MWCnts, bien que le revêtement de la surface de MWCnts par les acides humiques puisse modifier ces propriétés, en les conduisant à interagir avec les sites riches en électrons de MWCNT par les interactions  $\pi - \pi$ <sup>323</sup>.

Donc, les acides humiques HAs peuvent rivaliser avec les molécules organiques en deux mécanismes (concurrence directe du site et blocage des pores) sur MWCnts. Et en raison de la présence de la structure aromatique (30%), ils peuvent interférer avec les plus hydrophobes, ce qui réduirait leur adsorption sur MWCnts. À la lumière des résultats obtenus dans cette étude, nous proposons ce dernier mécanisme qui explique les faibles taux de récupération obtenus pour le phosalone dans les trois échantillons réels.

Le temps de rétention des huit pesticides dans les quatre échantillons d'eau réels est à  $\pm 2\%$  de celui de standards (**voir tableau 2**), et les rapports des deux transitions sélectionnées SRM2/SRM1 sont à  $\pm 20\%$  par rapport aux celles trouvées dans les normes d'analyse (**voir le tableau 2**). En outre, les spectres acquis au cours de l'analyse des échantillons réels ont été identifiés par rapport à ceux archivés avec une ressemblance de 70%.

## V. Conclusion

Une préparation manuelle des cartouches SPE au laboratoire avec 20 mg de Multi walled de carbone est utilisés avec succès pour préconcentrer les huit pesticides y compris les insecticides organophosphorés (méthidathion, parathion-méthyl, malathion, phosalone et le diazinon), les fongicides (cymoxanil et penconazole) et le carbamate méthomyl dans les échantillons d'eaux environnementale.

---

<sup>323</sup> X. Gwang, S. Tao, B. Xing, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 6214–6219

En raison de son importante surface spécifique et de sa grande capacité d'adsorption, ce nano matériel, a prouvé une très haute efficacité d'extraction pour l'ensemble des pesticides, sauf pour les deux plus polaires, le méthomyl et le cymoxanil.

Les pesticides ont été analysés par chromatographie liquide couplée à un hybride triple quadripôle- trappe ionique linéaire spectromètre de masse à ultra-traces par les limites maximales de résidus prévus par la loi de l'Union européenne. En travail avec le mode (SRM), cette configuration a permis la quantification et l'identification de ces analytes, en montrant deux transitions SRM avec le rapport  $SRM2/SRM1 > 0,3$  (méthomyl, méthidathion, le malathion, le penconazole, le diazinon et le parathion-méthyl). La seconde transition (SRM2) est présentée à faible intensité (le cas de cymoxanil et phosalone). Le mode IDA uni au mode SRM, et à EPI ont permis l'identification fiable de faibles concentrations. En outre, l'exécution en mode IDA a donné une confirmation supplémentaire pour les six autres pesticides.

La méthode analytique proposée est appliquée pour analyser deux types d'eau, deux de rivière et deux de barrage naturel, polluées par les pesticides cibles. Deux critères pour éviter les surestimations (liés au temps de rétention  $t_r$  et le rapport  $SRM2/SRM1$  dans des échantillons réels) ont été accomplis. L'utilisation du mode IDA et EPI ont permis une identification fiable en quantification pour les pesticides, et une confirmation supplémentaire pour les autres. Enfin, aucun des pesticides n'a été trouvé dans ces échantillons.

---

*Chapitre IV*

**L'extraction des pesticides à l'aide de MCM41.**

---

## I. Introduction

Vu l'importance de nanomatériaux dans la décontamination aquatique, ainsi que la commodité d'utilisation. Les nanotubes de carbone ont montré une excellente efficacité comme adsorbant d'extraction sur phase solide pour les produits pharmaceutiques et les pesticides.

Dans l'intérêt de la décontamination environnementale et l'extraction sur phase solide. Nous avons proposé MCM41, comme un support solide pour vérifier l'adéquation de la méthode analytique précédente sur les pesticides.

Un matériau poreux est défini par sa dimension des pores. D'après l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), un matériau est nommé microporeux lorsque son diamètre ( $d_p$ ) est inférieur à 2 nm, macroporeux si son diamètre est supérieur à 20 nm, et mésoporeux s'il est compris entre 2 et 20 nm<sup>324</sup>.

La silice mésoporeuse est très utilisée comme catalyseur<sup>325</sup> et même dans la chromatographie<sup>326</sup>.

Plusieurs silices mésoporeuses sont connues telles que : MCM-41, MCM-48 et MCM-50. Elles sont de différente structure : hexagonale, cubique et lamellaire respectivement. La plus utilisée est la MCM-41, qui possède des pores unidimensionnels de forme hexagonale, de diamètres allant de 1,5 jusqu'à 10 nm et elle présente une surface spécifique de 700 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> d'environ. MCM-41 est considérée plus stable thermiquement et plus facile à synthétiser<sup>327</sup>.

MCM41 est très utilisé en raison de ses caractéristiques uniques<sup>328,330</sup>. Il est utilisé pour la filtration<sup>329</sup>, la fabrication des nano-fil<sup>330</sup>, les membranes<sup>331,332</sup>, l'adsorption<sup>333</sup> et pour les supports d'enzymes<sup>334</sup>.

Le MCM-41 a prouvé un grand intérêt tant que matériaux pour l'adsorption de divers gaz<sup>335,336</sup>, des oxydes métalliques tels que l'oxyde de tungstène, l'oxyde d'antimoine<sup>337</sup>, et l'oxyde de

---

<sup>324</sup> L. B. McCusker, F. Liebau, G. Engelhardt, *Pure and Applied Chemistry*, 73 (2001) 381-394.

<sup>325</sup> A. Corma, *Chem.Rev.* 97(1997) 2373-2419.

<sup>326</sup> K. K. Unger, D. Kumar, M. Grün, G. Buchel, S. Ludtke, T. Adam, K. Schumacher, S. Renker, *J.Chrom A*.892 (2000) 47-55.

<sup>327</sup> J. C. Vartuli, K. D. Schmitt, C. T. Kresge, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, S. B. McCullen, S. D. Hellring, J. S. Beck, J. L. Schlenker, D. H. Olson, E. W. Sheppard, *Chemistry of Materials*.6 (1994) 2317-2326.

<sup>328</sup> J.S. Beck, J.C. Vartuli, W.J. Roth, M.E. Leonowicz, C.T. Kresge, K.D. Schmitt, C.T.-W. Chu, D.H. Olson, E.E. Sheppard, S.B. McCullen, J.B. Higgins, J.L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.*114 (1992) 10834.

<sup>329</sup> T. Sano, K. Doi, H. Hagimoto, Z. Wang, T. Uozumi, K. Soga, *Chem. Commun.* 8 (1999)733.

<sup>330</sup> C. G. Wu, T. Bein, *Science*. 266 (1994)1013.

<sup>331</sup> S. Kim, J. Ida, V. V. Gulians, Y. S. Lin, *Int. J. Environ. Technol. Manage.* 4 (2004) 21.

<sup>332</sup> C. Constantin, V. Parvulescu, A. Bujor, G. Popescu, B. L. Su, *J. Mol. Catal. A*. 208 (2004) 245.

<sup>333</sup> X. Xu, C. Song, J. M. Andresen, B. G. Miller, A. W. Scaroni, *Int. J. Environ. Technol. Manage.* 4(2004)32

<sup>334</sup> A. M. van der Heijden, T. C. Lee, F. van Rantwijk, H. van Bekkum, *Carbohydr. Res.* 337 (2002) 1993.

<sup>335</sup> R. Schmidt, M. Stöcker, E. Hansen, D. Akporiaye, O.H. Ellestad, *Microporous Mater.* 3 (1995) 443.

titane<sup>338</sup>. Sa morphologie donne meilleure sélectivité dans la séparation chromatographique à haute performance en phase liquide (HPLC) et à la chromatographie supercritique de fluide (SFC)<sup>113,339,340</sup>.

Dans l'étude présentée ci-après, nous nous sommes intéressés à l'extraction sur phase solide des pesticides (déjà vu dans le chapitre III) à l'aide de la silice poreuse MCM41. La méthode MCM-41-LC-MS/MS est destinée pour la détermination de faibles concentrations des pesticides dans des échantillons réels. L'applicabilité de cette approche est testée sur des échantillons d'eau prélevés d'Almeria (Espagne), dont la contamination peut être prévue.

L'objectif principal de cette étude est d'étudier la capacité de la silice poreuse MCM41 comme absorbant de SPE pour extraire les pesticides compris cinq insecticides organophosphorés (méthidation, parathion-méthyl, malathion, phosalone et le diazinon), deux fongicides (cymoxanil et penconazole) et un carbamate (méthomyl).

## II. Développement de la méthode d'analyse de pesticides dans les eaux par SPE/CPL/SM<sup>2</sup>

### II.1 Les spécifications des composés étudiés

Les molécules concernées par cette étude sont les produits phytosanitaires déjà vue dans le chapitre III.

- **Les insecticides:** Methidation, Parathion-Méthyl, Malathion, Phosalone, Méthomyl et le Diazinon.
- **Les fongicides :** Cymoxanil et Penconazole.

### II.2 L'optimisation de la méthode d'analyse des pesticides par HPLC/DAD.

L'optimisation et la séparation des pesticides sont réalisés dans les mêmes conditions chromatographiques vues dans le chapitre III. .

---

<sup>336</sup> P.J. Branton, P.G. Hall, K.S.W. Sing, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1993) 1257-1258.

<sup>337</sup> Q. Huo, D.I. Margolese, U. Ciesla, D.G. Demuth, P. Feng, T.E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi, B.F. Chmelka, F. Schüth, G.D. Stucky, *Chem. Mater.* 6 (1994) 1176- 1191.

<sup>338</sup> D.M. Antonelli, J.Y. Ying, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18 (1995) 34.

<sup>339</sup> M. Grün, I. Lauer, K.K. Unger, *Adv. Mat.* 9 (1997) 254.

<sup>340</sup> K. Schumacher, M. Grün, N. v. Döhren, K.K. Unger, poster presentation, 2nd SFC User Meeting, Siegen, October (1997).

### II.3 Synthèse de MCM41

Plusieurs méthodes sont connues pour la synthèse du MCM41. Ce matériau poreux est connu pour la première fois en 1992 par Beck *et al.*<sup>328, 341</sup> dont la composition du gel est  $2,6\text{OH}^- : 30\text{SiO}_2.\text{Al}_2\text{O}_3 : 6,3\text{CTA} : 8,4\text{TMA} : 382\text{H}_2\text{O}$ . Précisément, 200g de  $\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{CH}_3)_3\text{NOH/Cl}$  (CTA) sont combinés avec 2g d'alumine, 100 g de silicate de tétraméthylammonium (TMA) et 25 g de HiSil (mélange aluminat/silicate). Le mélange est porté sous agitation. Le produit est lavé par l'eau et séché à température ambiante. Ensuite il est calciné à 540 °C pendant 1 h sous un flux d'azote, puis pendant 6 h sous l'air. La diffraction de rayons X montre une largeur de pore à 40 Å. Les valeurs de *hkl* sont caractéristiques d'une structure hexagonale.

Cette méthode a ensuite été adaptée, tout d'abord en jouant sur le pH (synthèse en milieu acide,  $\text{pH} < 5$ ) et en présence de  $\text{H}^+$ .<sup>334, 342</sup>

M. Grün et al, ont donné un protocole de synthèse rapide et pratique. Dans ce protocole le n-hexadecyl triméthyl ammonium de brome  $\text{C}_{16}\text{TMABr}$ , 0.007mol) est dissout dans 50g de l'eau déminéralisée. 13,2g de l'ammoniaque et 60g d'éthanol absolu sont ajoutés à la solution surfactant, la solution est laissée sous agitation magnétique pendant 15mn. Le TEOS est ensuite ajouté et la solution est mise sous agitation durant 2h après la formation du gel. Le produit est filtré et lavé par 100mL de l'eau déminéralisée et 100mL de méthanol, puis la poudre obtenue est mise à sécher pendant une nuit à 363 K, et calcinée pendant 5 heures à 823 K. (gradient de température de  $1 \text{ K.mn}^{-1}$ ).

### II.4 Caractérisation de MCM41

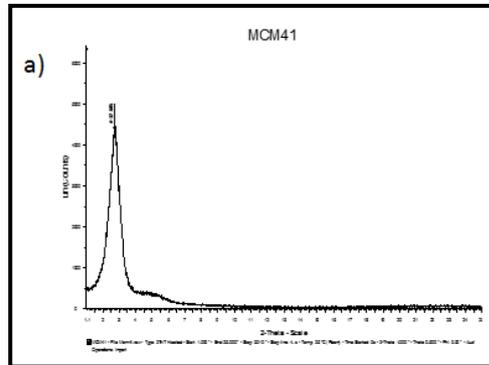
Les propriétés physiques et morphologiques des échantillons synthétisés ont été examinées par diverses techniques. L'estimation de la cristallinité est analysée par un diffractomètre de rayons X Bruker D8 Avance (anticathode  $\text{K}\alpha$  du cuivre), la gamme angulaire utilisée de 1 à 25 ° ( $2\theta$ ) dans l'intervalle de 0,01 ( $2\theta$ ) et le taux de balayage  $2\theta : 0,5^\circ$  par minute. (Automatic divergence slit system). Pour l'acquisition et le traitement des données un ordinateur Dell Optiplex GX270 avec un logiciel Diffract.

Le diagramme de DRX de la MCM-41 est présenté dans la figure (1-a). Les spectres indiquent qu'un mésopore de dimension hexagonale est obtenu. Ou l'arrangement de pores

<sup>341</sup> C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck. *Nature*, 359 (1992) 710-712

<sup>342</sup> Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Retroff, F. Schuth, G. D. Stucky. *Nature* 368 (1994) 317-320

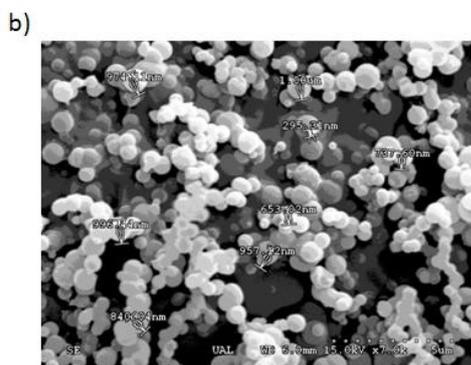
quasi réguliers. Le modèle: hexadécyl triméthylammonium de brome, présente trois pics indexés (100), (110) et (200) dans le système hexagonal<sup>343</sup> alors que notre modèle de MCM41 présente un seul pic intense qui est indexé comme (100) et le reste des pics sont absents. En effet du résultat de *M. Grün et al.* On a confirmé le spectre de MCM-41.



**Figure 1-a** : Diffractogramme RX de la Si-MCM41.

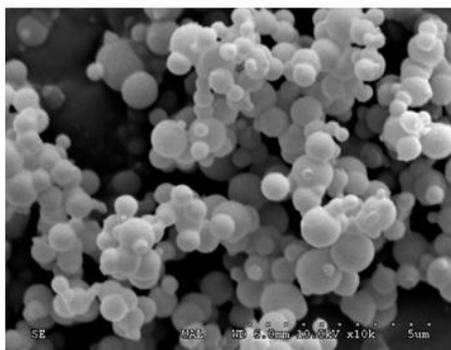
La morphologie du surface et la taille des particules du matériau MCM-41 sont caractérisées à l'aide d'une métallisation directe des échantillons par BAL-TEC SCD 005. Ensuite, ils sont analysés par microscopie électronique ((MEB) HITACHI, S-3500N) en utilisant un logiciel (08-03) et un ordinateur Compaq EVO (code logiciel 02/08/2030).

La morphologie de MCM41 a été étudiée par balayage micrographie électronique (MEB). Cette technique a permis de déterminer la taille, la morphologie et la distribution des pores de matériau synthétisé. La figure (2-b, 2-c) montre les images MEB de la silice mésoporeuse.



**Figure 1-b** : Exposition de la taille et la dimension des pores de la Si-MCM4 par la Microscopie électronique à balayage.

c)



**Figure 1-c** : cliché de Microscopie électronique à balayage de la Si-MCM41.

## **II.5 Extraction sur phase solide : évaluation et optimisation**

Un protocole d'extraction des produits phytosanitaires par la silice poreuse de type MCM41 est réalisé, dans lequel les cartouches destinées à l'extraction ont été préparées manuellement au niveau de notre laboratoire. Ce protocole d'extraction a permis d'étudier et mettre en évidence plusieurs paramètres avant de le valider par LC/QqQLIT/MS. Les paramètres à sélectionner et confirmer sont : le type de l'éluant et son volume, l'effet des sels, du solvant organique ajouté et le volume de l'échantillon.

### **II.5.1 La préparation des cartouches de SPE**

L'extraction est faite sur 100mg de MCM41 (Mobile Cristalline Matériels) (1.5-10) nm de diamètre. L'adsorbant est introduit dans des seringues de 3ml, de type polypropylène et fixé entre deux frittés (polyéthylène) dont la granulométrie est généralement comprise entre 40 et 60 $\mu$ m.

### **II.5.2 La procédure de SPE**

La procédure d'extraction sur phase solide est décrite dans le chapitre II et III.

### II.5.3 Le choix de l'éluant et son volume

MCM-41 est souvent proposé comme modèle mésopores, il présente un excellent matériau pour la comparaison entre l'expérience et la théorie dans le domaine d'adsorption<sup>343, 344</sup>

Les caractéristiques cités de MCM-41 comme faisant un adsorbant sont : (1) il est constitué de pores hexagonaux uniformes et de taille régulier, (2) la longueur des pores est sensiblement plus grande que le diamètre de pore (3) l'absence d'intersections des canaux de pores garantit que les effets de réseau de pores sont petits à négligeables et (4) la diffraction des rayons X peut fournir une estimation indépendante de dimension de pores<sup>345</sup>.

Ces matériaux MCM-41 présente des murs constitués de silice avec des régions à densité variable. Ceci est précisé comme une paroi continue avec une densité plus réduite de celle de la silice amorphe ordinaire, et les cylindres de matériau sont moins dense.

Initialement, nous avons testés plusieurs solvants organiques : le méthanol, l'acétonitrile, l'acétone, le n-hexane, le dichlorométhane et même ajoutés à différente proportion aux l'acétate d'ammonium, l'ammoniaque et l'acide acétique. Pour tous les tests, 1mL d'eau ultra pure est destiné comme un volume d'échantillon, on les fortifié par 20ng de pesticide, ensuite on les extraite par des cartouches (3mL) de 50mg de MCM41.

Les cartouches préalablement conditionnées par 5 ml du solvant choisi et 5mL d'eau ultra pure, le volume consommé d'élution est 2mL. Les résultats montrent une faible récupération des pesticides vis à vis les solvants choisis, seul l'acétonitrile a montré une récupération supérieure à 50% pour le tous; à l'exception du méthomyl et du cymoxanil qui n'ont pas été dépassé les 27%. Cette faible récupération est due à la grande solubilité de ces derniers dans l'eau (5500,780) mg L<sup>-1</sup>. Le malathion n'a pas dépassé 36% de récupération et pour la raison d'amélioré le taux de récupération nous avons ajoutés des proportions d'acide ou base à l'acétonitrile. Le malathion a présenté un taux de récupération supérieure de 90%, alors le cymoxanil et le méthomyl n'ont pas été récupérés. Ces résultats obtenus nous ont imposés de modifier le volume d'acétonitrile de 2mL à 7mL afin d'achever l'élution de tous les analytes. Les rendements sont supérieurs à 90% pour tous les pesticides sauf le cymoxanil et le méthomyl.

---

<sup>344</sup> O. Franke, G. Schulz-Ekloff, J. Rathousky, J. Stárek and A. Zúkal. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1993)724-725.

<sup>345</sup> P. I. Ravikovitch, S. C. O. Domhnaill, A.V. Neimark, F. Schüth and K.K. Unger. *Langmuir* 11(1995)4765-4772.

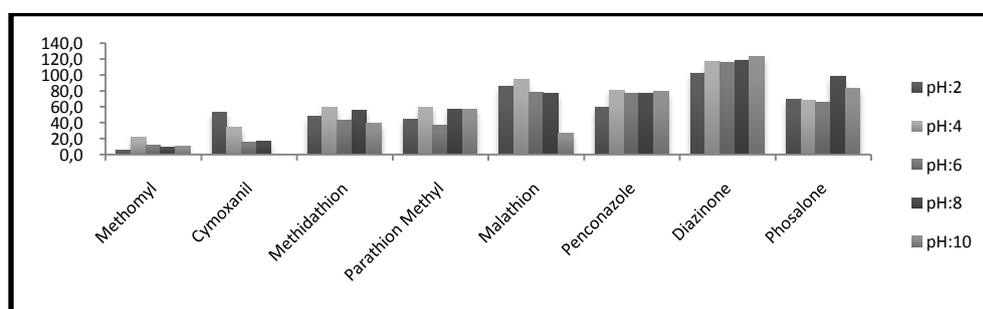
#### II.5.4 L'étude de pH, l'effet des sels et du solvant organique

Le pH de l'échantillon affecte d'une façon directe sur la rétention des analytes. En raison d'améliorer le taux de récupération des pesticides par MCM41, nous avons étudié cette évaluation entre pH 2 et 10. Ce choix d'intervalle est dû aux propriétés acide-bases de penconazole, le diazinon et le cymoxanil qui présentent des valeurs de pKa 1,5, 2,6 et 9,3 respectivement. Dans ces tests, 25mL d'échantillon ajusté à pH connu (entre 2 et 10) est pré-concentré, contenant 2µg de chaque pesticide. Les cartouches sont éluées par 7mL d'acétonitrile. La récupération de chaque pesticide est mentionnée dans **Tableau 1**.

Pesticides	MET	CYM	MED	PMT	MAL	PEN	DIA	PHO
pH:2	5,5	53,6	47,7	44,4	86,1	59,9	101,7	69,2
pH:4	21,4	34,4	59,0	59,0	93,9	81,1	117,0	67,6
pH:6	11,5	15,1	43,6	36,6	77,8	76,5	116,0	65,9
pH:8	9,9	17,3	55,8	57,2	77,0	77,2	118,5	97,9
pH:10	11,0	0,0	39,6	57,2	26,3	78,8	123,1	83,2

**Tableau1** : La récupération des pesticides en fonction de pH par MCM41.

Les rendements trouvés présentent un maximum entre 21.4 et 117% à pH4, par conséquent ils diminuent pour le reste de pH. Si on considère spécialement les faibles taux de récupération, sont obtenus au-delà de pH 4. A l'exception de phosalone qui a dévoilé un maximum à pH 8 et à pH 10(97.9-83.2)% respectivement; alors le parathion méthyl et le diazinon restent stables au cours de la variation de pH. Le pH 4 est choisi pour ce protocole d'extraction.



**Figure 2** : L'amélioration de rendement des pesticides en fonction de pH.

L'effet de sels sur le taux de récupération de pesticides dans les échantillons aquatiques était l'objectif de plusieurs études. Les résultats de ces derniers indiquent que l'augmentation de

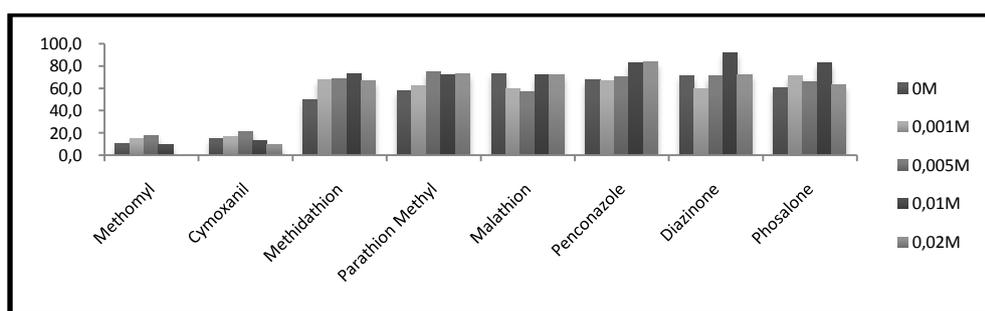
la force ionique peut indistinctement améliorer ou aggraver la récupération, selon la polarité des pesticides et les mécanismes impliqués dans la SPE<sup>346</sup>.

Pour cette raison, l'effet de sels est vérifié par l'analyse des échantillons d'eau ultra pure ajustés à pH4 par l'acide chlorhydrique à 0,1 mol L<sup>-1</sup> ou l'hydroxyde de sodium 0,1mol L<sup>-1</sup>. Les solutions contenant 2µg de pesticides et différentes concentrations du chlorure de potassium (0.001,0.005, 0.01 et 0.02) mol L<sup>-1</sup>, ensuite les pré-concentrées par 50mg de MCM41.Les cartouches sont éluées par 7mL d'acétonitrile et séchées par N<sub>2</sub>. Les résultats sont portés dans le tableau 2.

Pesticides	MET	CYM	MED	PMT	MAL	PEN	DIA	PHO
0M	10,6	15,1	49,8	57,7	73,4	67,9	71,5	60,1
0,001M	14,9	16,5	68,1	62,2	60,0	66,4	59,3	71,4
0,005M	18,1	21,5	68,9	74,4	56,6	70,5	70,8	66,2
0,01M	9,5	13,5	73,0	71,9	72,1	83,1	92,2	83,2
0,02M	0,0	9,4	66,7	73,2	71,7	83,9	72,5	63,1

**Tableau 2** : La récupération des pesticides en fonction de KCl par MCM41.

Les résultats trouvés (figure3) montrent une stabilité ou une légère augmentation des rendements à 0.01 mol L<sup>-1</sup> de KCl pour tous les pesticides. Par conséquent, les rendements légèrement diminuent au-delà de 0.01mol L<sup>-1</sup> de KCl. La concentration de KCl (0,01 mol L<sup>-1</sup>) est ajoutée aux échantillons d'eaux pour les tests à venir.



**Figure 3** : L'amélioration de rendement des pesticides en fonction de KCl.

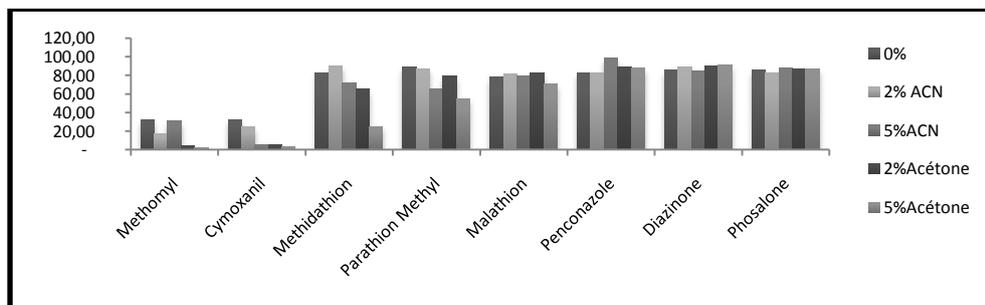
L'ajout du solvant organique aux échantillons permet d'améliorer le taux de récupération. Pour ce test nous avons préparés des solutions à 50mL d'eau ultra pure, ajustées à pH 4,0 ± 0,1

<sup>346</sup> a) B. Jiménez, J.C. Moltó, G. Font, *Chromatogr* 41 (1995) 318.

b) B. Jiménez, J.C. Moltó, G. Font, *LC.GC* 14 (1996) 968

c) S.Wang, M.J. Santos-Delgado, L.M. Polo-Díez, *Chem. Anal.* 14 (1995) 84.

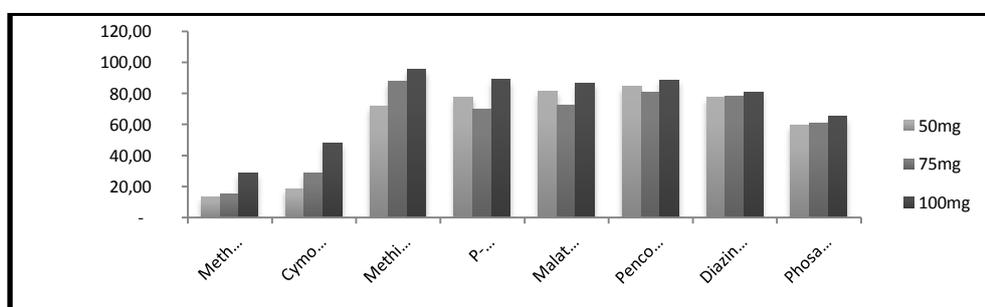
et contenant  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. Les solutions sont polluées par  $2 \mu\text{g}$  de pesticides et modifiées par l'ajout de différents volumes d'acétonitrile et d'acétone (0 à 5% v / v). Les résultats obtenus montrent une constante variation dans l'intervalle d'étude, seuls le méthomyl et le cymoxanil (les plus polaires) ont prévu une perte de récupération. Par contre, à 5% d'acétone le parathion méthyl et le méthidathion diminuent. (Figure 4). De ce fait, l'optimisation de la méthode est considérée sans l'ajout du solvant organique.



**Figure 4** : L'effet du solvant organique sur le taux de récupération des pesticides.

### II.5.6. La quantité de MCM41

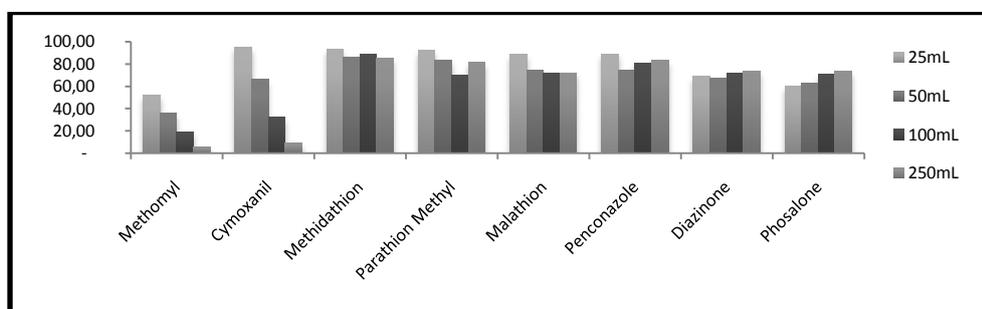
L'effet de la quantité d'adsorbant est effectué par l'analyse de trois solutions de 100mL d'eau ultra pure ajustée à  $\text{pH}4 \pm 0.1$ , contenant  $2 \mu\text{g}$  de pesticides et  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. Ces échantillons sont pré-concentrés sur des cartouches de différente quantité de MCM41 (50,75 et 100mg). Les résultats obtenus dévoilent une augmentation de récupération pour les composés fortement polaire le méthomyl et le cymoxanil de 20%, alors les autres composés progressent relativement de 5% à 10%. La méthode est optimisée à 100mg de MCM41 comme une quantité idéale de 100mL d'échantillon.



**Figure 5** : La récupération des pesticides en fonction de la quantité MCM41.

### II.5.7. Effet du volume d'échantillon

Le volume de l'échantillon joue un rôle important dans la récupération des analytes au cours de l'extraction sur phase solide. Pour cette raison, nous avons testés quatre volumes de 25 à 250mL pour une quantité de 100mg de MCM41. Les échantillons ont suivis la même procédure d'extraction. Les résultats sont portés sur la figure 6, la récupération des analytes a basculé entre deux facteurs, la polarité de composés et le volume de l'échantillon. Plus le pesticide est plus polaire, plus la récupération diminue avec l'augmentation du volume le cas de méthomyl et le cymoxanil cela peut être dû aussi à leur solubilité importante (55000 -780) mg L<sup>-1</sup> respectivement dans l'eau. Par conséquent les composés faiblement polaires ou apolaires marquent une claire augmentation de récupération avec l'accroissement du volume, ce résultat est du à l'augmentation de la solubilité de ces derniers dans l'eau le cas de phosalone et de diazinone. Les autres pesticides méthidathion, malathion et parthion-méthyl restent inchangables au cours de l'évolution du volume. La procédure MCM41-SPE a montré 250mL comme un volume supérieur d'échantillon, et l'optimisation de la méthode est suivie par 100mL d'échantillon, en raison de réduire le temps d'extraction.



**Figure 6** : L'amélioration de rendement des Pesticides en fonction du volume d'échantillon.

### II.5.8. Effet des acides humiques

Les substances humiques (HA) sont des composés organiques dissous, présents dans les eaux naturelles. La teneur normale de ces composés varie de 1 à 20mg L<sup>-1</sup><sup>347, 348</sup>. Mais dans certains cas, des concentrations supérieures de cette norme peuvent être trouvées<sup>349</sup>. Les composés humiques se forment dans le sol et les systèmes aquatiques lors de la dégradation de

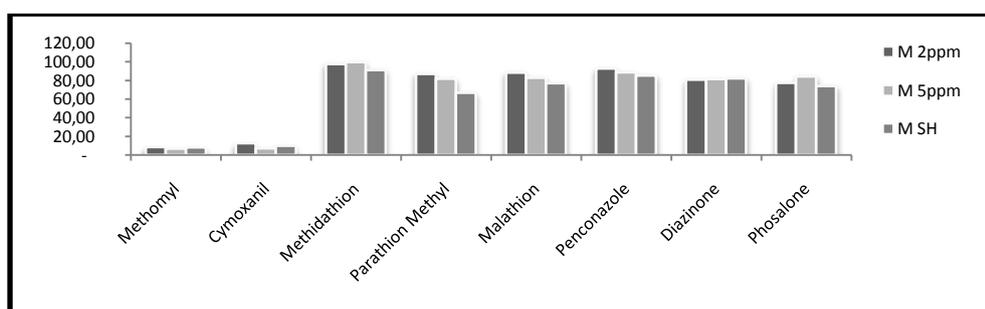
<sup>347</sup> J.C.A. De Wuilloud, R.G. Wuilloud, B.B.M. Sadi, J. A. Caruso. *Analyst*, 128 (2003) 453.

<sup>348</sup> N. Li, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A*. 921 (2001) 255.

<sup>349</sup> E. Achterberg, C. Braungart, R. Sandford, P. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 440 (2001) 27.

dérivés organiques de source végétale ou animale, et ils contribuent dans plusieurs processus environnementaux et géochimiques<sup>350</sup>. Ces composés sont généralement de couleur jaune au noir. Et la structure de substances humiques est considéré comme un réseau de chaînes organiques (de 52% à 62 % de carbone) contenant multi groupes fonctionnels tels que aliphatiques, aromatiques, carboxylique, hydroxyle et amine, cela peut piéger d'autres composés organiques et inorganiques présents dans le système aquatique<sup>351</sup>. Pour cette raison, la détermination de plusieurs composés potentiellement présents dans les eaux naturelles peut être affectée par leur association possible avec des substances humiques. Par exemple, une fraction importante de métaux est complexée par des substances humiques, qui doivent être considérés en particulier à la détermination des métaux à l'état traces<sup>352</sup>.

La matière organique dissoute dans les milieux aquatiques naturels peut causer de faibles récupérations des analytes lors d'un protocole d'extraction. Pour cette raison deux concentrations d'acide humique sont ajoutées aux échantillons d'eau ultra pure entre 2 et 5 mgL<sup>-1</sup>. Aussi un échantillon sans acide humique de confirmation est préparé. Les chromatogrammes obtenus ne présentent aucune augmentation ou suppression du signal pour l'ensemble de pesticides, sauf le méthomyl (8.7%) et le cymoxanil (12.66%) qui ont relativement le même taux de récupération dans l'eau ultra pure le méthomyl (21.94%) et le cymoxanil (26.74%). Donc cette faible rétention n'est pas due à l'acide humique mais à leurs fortes solubilités dans l'eau.



**Figure 7** : L'effet de substance humique sur la récupération des pesticides.

<sup>350</sup> C. Zwiener, F.H. Frimmel, *Anal. Bioanal. Chem.* 378(2004) 862.

<sup>351</sup> M.J. Avena, A.W.P. Vermeer, L.K. Koopal, *Colloids Surf.* 151 (1999) 213.

<sup>352</sup> H.T. Lin, M.C. Wang, G.-C. Li, *Chemosphere* 56 (2004) 1105.

### **III. Validation et optimisation de la méthode par LC-QqQLIT-MS/MS**

#### **III.1 LC-QqLIT-MS/MS procédure**

##### **III.1.1 Conditions**

Les analyses des huit pesticides dans des échantillons environnementaux ont été réalisées par chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). voir le chapitre III.

##### **III.1.2 Optimisation**

La séparation chromatographique des huit pesticides a été décrite en chapitre III. Le processus d'ionisation par électro spray en mode positif (PI) conduit à la formation de plusieurs ions à partir de la molécule initiale qui, peuvent se présenter sous la forme d'un ion précurseur protoné  $[M+H^+]$  pour tous les pesticides. Les paramètres de la source d'ionisation ESI de chaque composé sont optimisés et indiqués dans le **(Tableau 5) chapitre 3**.

Le chromatogramme ionique total (TIC) et les deux chromatogrammes d'ions extraits ou fragments (XIC) d'une solution étalon des pesticides sélectionnés sont présentés dans **la figure 9(a-b). chapitre3**.

#### **III.2 Validation de la méthode**

Pour une bonne application de la méthode proposée SPE-MCM41-LC-QqLIT-MS/MS dans les échantillons réels, une procédure de validation est nécessaire pour déterminer la linéarité, le seuil de quantification LOQ et de détection LOD, l'effet de matrice, la précision et la récupération de chaque pesticide.

##### **III.2.1. Linéarité.**

La linéarité est testée dans le chapitre III.

Analytes	Concentration	$R^2$	ME(%) = ((Pente matrice/Pente solvant)-1) X 100	
			NCR	BNT
Méthomyl	0.20-0.50	0.982	-20.6	-8.9
Cymoxanil	0.10-0.50	0.994	-0.36	-21.9
Méthidathion	0.10-100	0.993	0.7	7.8
Parathion méthyl	0.10-100	0.997	-25.4	-36.7
Malathion	0.10-0.50	0.995	4.6	-2.1
Penconazole	0.20-200	0.994	-2.3	-11.2
Diazinon	0.10-10	0.999	-31.3	-17.2
Phosalone	0.20-100	0.997	-28.5	-29.7

**Tableau 3:** Les valeurs de coefficients de corrélation et l'effet de matrice de chaque pesticide.

### III.2.2 Précision et récupération

La récupération des pesticides retenue par la procédure SPE- MCM41 proposée, est évaluée par trois réplicas de deux niveaux de concentration (0,05 et 0,10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) pour le diazinon et (0,25 et 0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) pour les autres pesticides. Ils sont ajoutés directement dans les échantillons d'eau ultra pure. Le taux de recouvrements dans l'eau ultra-pure (tableau 8) varie entre 59.4 et 112.3%, sauf le méthomyl et le cymoxanil qui sont faiblement récupérés. Cela est dû à leurs solubilités importantes dans l'eau (Tableau 1 chapitre3).

La précision de la méthode est affirmée par les valeurs calculées de l'écart type relatif (RSD %) moyen des échantillons de trois réplicas qui sont moins que 10% pour tous les pesticides. (Tableau 4).

Le taux de recouvrement pour les deux types d'eau réel est varié entre 70% et 102% pour l'eau du barrage. Seuls le parathion méthyl et le penconazole ont montré une récupération moins que 57% et supérieure que les 44% cette basse récupération est dû à l'existence de l'effet de matrice avec un signal de suppression. Dans le cas de l'eau de la rivière le taux de recouvrement varie entre 60% et 115%, la malathion présente un taux de recouvrement important à 157.8% et 158.3% ces valeurs sont significatives d'une augmentation du signal par effet de matrice. Les seuls pesticides qui n'ont pas été récupérés sont le méthomyl et le cymoxanil en raison de leur solubilité.

Le taux de récupération de phosalone est varié entre 43.8% et 53.8% pour les deux types d'eau cela est caractéristique pour son caractère apolaire, car il est le plus apolaire dans ce

groupe, et cette basse récupération ne signifie pas qu'il est mal retenu au contraire il est mal élué.

Donc pour améliorer sa récupération il est nécessaire d'augmenter le volume d'éluion. L'écart type est calculé de trois réplias varie entre 0.81 et 29.5 pour les deux types d'eaux cela est confirmé la précision de la méthode.

pesticides	Eau ultra pure				Eau du barrage				Eau de rivière			
	25µ L <sup>-1</sup>		50 µ L <sup>-1</sup>		25µ L <sup>-1</sup>		50 µ L <sup>-1</sup>		25µ L <sup>-1</sup>		50 µ L <sup>-1</sup>	
	R%	RSD	R%	RSD	R%	RSD	R%	RSD	R%	RSD	R%	RSD
Méthomyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cymoxanil	15.7	7.0	17.9	6.5	15.4	6.2	10.4	5.7	20.44	6.2	20.3	4.5
Méthidathion	66.6	10.1	88.4	4.8	70.3	9.6	73.0	2.6	79.9	1.6	86.9	2.6
P. Méhyl	73.9	2.7	77.6	4.5	53.0	11.8	57	12.2	59.8	2.8	72.1	5.2
Malathion	112.3	5.4	104.3	2.2	95.6	9.5	102.1	16.4	157.8	13.1	158.3	6.8
Penconazole	76.6	3.9	80.8	6.1	44.8	15.0	56.3	12.3	64.8	5.8	60.6	11.2
Diazinon	92.1	3.1	82.4	7.1	70.9	12.1	73.8	7.6	115.7	7.3	97.9	3.5
Phosalone	59.4	3.1	61.1	0.4	43.8	10	44.9	1.8	51.8	2.1	53.8	6.4

**Tableau 4 :** Le taux de recouvrement calculé de trois types d'eau pour chaque pesticide.

### VI.2.3 effet de matrice

L'effet de matrice reçus de mode électrospray ESI de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est décrit pour la première fois par Kebarle Tang et en 1993<sup>290</sup>. Plus de détails sur cet effet et ses conséquences pour l'analyse des différents résidus ont été donnés par Antignac et al<sup>291</sup>. Précisément, l'effet de matrice n'est pas seulement la suppression d'ions, où un écueil majeur d'analyte, mais aussi la capacité de détection, de répétabilité et de précision. L'effet de matrice dépend fortement de source d'ionisation. Dans la source ESI des gouttelettes sont produites à grande quantité d'additifs (venant de l'éluant ou de l'échantillon) peut diminuer l'efficacité de l'évaporation et la capacité d'atteindre la phase gazeuse des analytes<sup>290</sup>. Le précurseur atmosphérique d'ionisation chimique (APCI) est considéré moins dépendant à l'effet de matrice qu'ESI<sup>290, 353</sup>, en raison de l'ionisation des analytes qu'a lieu dans la phase gazeuse. La réaction à la source électrospray dépend du solvant et des additifs tels que

<sup>353</sup> R. Kostiainen, T. Kauppila, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 685

(volatilité, le pH ou la concentration de l'électrolyte), les propriétés physico-chimiques des analytes (pka, l'hydrophobicité, l'affinité du proton ou l'énergie de solvatation d'ions) et les paramètres de fonctionnement des instruments LC-MS (le débit, la température et le voltage)<sup>353</sup>. Par conséquent, toutes ces variables rendent le processus d'ionisation très complexe. En outre, les composants de co-élution peuvent produire des ions similaires dans la MS ou MS<sup>2</sup>, qui peut fausser l'interprétation des résultats, en particulier lorsque ces composés sont présents en forte concentration dans l'extrait et éluer de la même façon que les composés cibles<sup>354</sup>. Les effets de matrice varient selon la combinaison de l'analyte et le changement de temps<sup>354, 355</sup>. Dans ce travail, les effets de matrice sont calculés à partir des pentes de la courbe d'étalonnage en solvant et en matrice selon l'équation :

$$\left( \frac{\text{Pente de droite de calibration de matrice}}{\text{Pente de droite de calibration du solvant}} - 1 \right) \times 100 = ME(\%)$$

Les valeurs calculées d'effet de matrice sont présentées dans le tableau 6. Dans les échantillons de la rivière, quatre pesticides ont présenté un effet de matrice inférieure à 20% (le cymoxanil, le méthidathion, la malathion et le penconazole). Par conséquent le parathion méthyl, le méthomyl, le diazinon et le phosalone présentent un effet moyen de matrice les valeurs varient entre (20 et 50%). Le signal de suppression est le plus courant pour l'ensemble de pesticides dans l'eau de rivière, sauf le méthidathion et la malathion présentent un signal d'amélioration.

Dans les échantillons de l'eau du barrage, l'effet de matrice est moins pour le penconazole, diazinon, le méthidathion, méthomyl et la malathion, dont les valeurs sont moins de 20%, alors le cymoxanil, le phosalone et le parathion méthyle sont notés comme un effet moyen entre (20-50%). Le signal de suppression est le plus courant pour l'ensemble de pesticides sauf le méthidathion ou le signal est d'amélioration.

Selon le critère d'effet de matrice, toute valeur est moins que 20% indique une absence de cet effet au contraire toute valeur est supérieure de 20% et moins que 50% l'effet est moyen alors au-delà de 50% l'effet de matrice est considéré fort. Pour corriger l'effet nous avons suivi la méthode d'ajout du standard, c'est un critère correctif de l'effet de matrice.

<sup>354</sup> A. Garrido Frenich, J. L. Martinez Vidal, J.L. Fernandez Moreno, R. Romero Gonzalez, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4798–4808.

<sup>355</sup> I. R. Pizzutti, A. deKok, M. Hiemstra, C. Wickert, O.D. Prestes, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4539–4552.

Le principe de ce critère est d'ajouter une concentration connue du standard aux échantillons. Initialement nous avons pollués les échantillons par deux concentrations 25 et 50 µg L<sup>-1</sup>, ensuite les pré-concentrés. En arrivant à l'étape de reconstitution de la concentration, on ajoute deux concentrations (25 et 50 µg L<sup>-1</sup>) chacune à part et en gardant un échantillon de concentration initiale. Pour avoir à la fin trois échantillons pour chaque type d'eau. Finalement filtrer et analyser par LC-MS.

Les résultats sont groupés dans le (tableau 5).

En réalité les rendements calculés sont les valeurs théoriques des concentrations initiales, ces derniers sont calculés à partir d'une extrapolation des droites de chaque pesticide. Une amélioration de rendement est observée pour tous les pesticides dans les deux types d'eaux.

Le parthion méthyl est récupéré à 50% pour les deux type d'eaux, alors par l'ajout de standard, il est augmenté jusqu'à 100%. Cela confirme le signal de suppression qui régénère tous les analytes. Par conséquent, la malathion a présenté une meilleure récupération qui a dépassé les 150% (signal d'amélioration) dans l'eau de la rivière alors les recouvrements obtenus par ce critère sont dans les 120%.

pesticides	Ajout du Standard			
	Eau du barrage		Eau de rivière	
	25 µg L <sup>-1</sup>	50 µg L <sup>-1</sup>	25 µg L <sup>-1</sup>	50 µg L <sup>-1</sup>
	R%	R%	R%	R%
Méthidathion	105.9	98.2	96.6	83.6
P. Méthyl	89.9	102.0	133.7	91.7
Malathion	92.2	131.6	119.8	115.7
Penconazole	90.2	99.9	90.3	112.9
Diazinon*	109.5	98.9	83.8	85.7
Phosalone	70.4	68.8	92.7	128.1

**Tableau 5** : les rendements corrigés par l'ajout du standard

\*0.005 et 0.01 ng L<sup>-1</sup>.

### III.2.4 la limite de quantification et de détection.

La limite de détection de l'instrument IDL de pesticides est déterminée expérimentalement par la concentration minimale d'analyte analysée dont la transition SRM2 présenté par la norme S / N = 3, alors la limite de quantification instrumentale IQL est identifiée par la

transition SRM2 dont la norme signal/ bruit =10 (S/N = 10). Les deux normes sont calculées à partir d'une solution standard de pesticides préparés dans le mélange acétonitrile/ eau ultra pure (10/90 v/v) tableau 6. La limite instrumentale de détection (IDL) obtenue pour tous les analytes varie entre 0,02 et 0,25  $\mu\text{g L}^{-1}$  et la limite instrumentale de quantification (IQL) varie entre 0,07 et 0,93  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont identifiées par le critère décrit ci-dessus, dans ce contexte les échantillons blancs de deux types d'eau environnementale (une de rivière et l'autre de barrage) ont été pré-concentrés par la méthode SPE-MCM41 dosés à faibles concentrations de pesticides.

Analytes	Solvant		Eau de rivière		Eau de barrage	
	IDL	IQL	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Méthomyl	0.04	0.07	0.55	2.18	0.57	2.35
Cymoxanil	0.19	0.93	7.72	23.50	12.10	54.14
Méthidathion	0.02	0.08	0.18	0.45	0.14	0.31
P-méthyl	0.25	0.92	0.95	4.52	0.47	4.52
Malathion	0.02	0.07	0.36	1.31	0.47	1.46
Penconazole	0.02	0.09	0.45	2.68	0.39	1.78
Diazinon	0.02	0.08	0.06	0.25	0.03	0.16
Phosalone	0.16	0.29	0.37	1.22	0.36	1.20

**Tableau 6 :** Les valeurs calculées d'ILQ, IDL, MQL et MDL de chaque pesticide.

Les résultats obtenus par les différents échantillons. Il est constaté que la LOD et la LOQ sont semblables pour l'ensemble des échantillons, mais légèrement élevé pour ceux calculés dans le solvant (LOD entre 0,03 et 0,95  $\mu\text{g L}^{-1}$  et LOQ entre 0,16 et 4,52  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sauf le cymoxanil qui a montré des valeurs nettement élevés que ceux trouvés dans le solvant. Tenant compte au facteur de pré-concentration établi dans cette méthode (100), les limites de détection et de quantification dans les échantillons réels sont de 77,2 $\mu\text{g L}^{-1}$  et 121,0 $\mu\text{g L}^{-1}$  et entre 235,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  et 452,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour le cymoxanil et entre 0,3 et 9,5 $\mu\text{g L}^{-1}$  et entre 1,6 et 45,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement pour les autres pesticides.

### ***III.2.5 Application aux échantillons de la rivière et des eaux usées***

Pour une confirmation de l'applicabilité de la méthode SPE-MCM41-LC-QqLIT-MS/MS, deux types d'eaux environnementales ont été testés (une de rivière et l'autre de barrage). Des échantillons blancs d'eaux sont testés, ou nous avons appliqué la même procédure d'extraction. Aucune présence de ces composés n'a été observée dans les deux types d'eau.

## **IV. Conclusions**

Dans ce chapitre, la silice mésoporeuse est testée comme un support solide d'extraction en phase solide sur les huit pesticides dont (organophosphorés, carbamates et un triazole) dans des échantillons d'eaux. Les cartouches d'extraction en phase solide sont préparées au laboratoire avec 100 mg de MCM-41.

Ce choix est basé sur la largeur spécifique du surface et la haute capacité d'adsorption de MCM-41, qu'a donné une rétention relativement élevée pour la plupart des anlytes, sauf les plus polaires tels que le cymoxanil et le méthomyl qui n'ont pas été récupéré.

Les pesticides ont été analysés par la chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse ultra-traces.

La méthode d'analyse est validée et appliquée sur des échantillons réels. La détection de contaminants organiques est absente dans les échantillons réels.

---

*Conclusion Générale*

---

## Conclusion générale

Ce travail a démontré les solutions analytiques apportées, à la fois par l'utilisation de l'extraction en phase solide et par le système triple quadripôle hybridé par une trappe ionique linéaire, dans le contexte d'une analyse multi-résidus de douze produits pharmaceutiques et huit pesticides dans un échantillon constitué d'un solvant d'injection LC classique. L'étude bibliographique a conclu sur le lien entre les micropolluants et les surfaces aqueuses. Elle a aussi montré que peu de résultats étaient disponibles dans la littérature sur la recherche de produits pharmaceutiques dans les matrices aqueuse. Au contraire les produits phytosanitaires sont largement étudiés dans les différentes matrices aqueuses (l'eau souterraine, mer, barrage et station d'épuration).

L'extraction en phase solide est enrichit par l'utilisation des nano matériaux nanotube de carbone et la silice méso poreuse, qui ont prouvé une grande efficacité sur l'échelle analytique, particulièrement dans l'analyses des eaux.

Les méthodes d'extraction ont été optimisées afin de mettre en évidence plusieurs paramètres : le type de l'éluant et son volume, l'effet des sels et du solvant organique, le pH, la quantité de l'adsorbant et le volume de l'échantillon. Cette optimisation de la méthode est effectuée par HPLC/DAD.

Afin d'améliorer la sensibilité et la fiabilité de la méthode, un nouveau mode d'acquisition est utilisé, en combinant la détection sensible du SRM et la confirmation rapide du EPI, a été testé.

Cette méthodologie est appliquée lors de validation des méthodes analytiques proposées. La validation et la confirmation des méthodes analytiques ont été faites dans des échantillons réels.

Les nanotubes de carbones ont confirmé une bonne efficacité comme adsorbant d'extraction en phase solide, soient 20mg de MWCNTs sont suffisante de récupérer plus que 70% de majorité des produits pharmaceutiques et plus que 80% pour les phytosanitaires. Les 20mg de MWCNTs ont prouvé une réutilisation de 10 fois, après un simple lavage avec 5 ml de méthanol dans les échantillons non réels (solvant, l'eau ultra pure). Tandis que les cartouches classiques sont généralement rejetées. Alors que les cartouches utilisées pour pré-concentrer les échantillons réels ne pouvaient pas être réutilisés.

La silice méso poreuse est pour la première fois testée, pour pré-concentrer les pesticides dans l'eau. Les résultats obtenus lors de validation de la méthode analytique atteignent presque les 100%.

Ces méthodologies ont été directement appliquées à analyser huit échantillons réels. Dont deux de rivières, deux du barrage, deux de sources et deux de station d'épurations (sortie et d'entrée).

Il est noté que la détection est observée pour les produits pharmaceutiques que les pesticides dans les échantillons. Seulement le diclofénac est trouvé à une concentration légèrement supérieure à MQL dans l'échantillon ANX1 (35,5 ng L<sup>-1</sup>) par la méthode SPE-MWCNTs, alors ce qui concerne les eaux usées, les concentrations élevées sont vues pour l'Acétaminophène (3491 ng L<sup>-1</sup>), le naproxène (2237 ng L<sup>-1</sup>), l'ibuprofène (1363 ng L<sup>-1</sup>), de l'acide Méclofénamique (1334 ng L<sup>-1</sup>), le Diclofénac (851 ng L<sup>-1</sup>), le kétoprofène (307 ng L<sup>-1</sup>), le bisoprolol (182 ng L<sup>-1</sup>) et le nadolol (80 ng L<sup>-1</sup>) ont été trouvés dans l'eau résiduelle, tandis que le métoprolol a été détecté à un niveau inférieur à sa limite de quantification, le bétaxolol, l'acide méclofénamique et l'acide tolfénamique n'ont pas été détectés. D'autre part, seul l'acide Flufénamique (772 ng L<sup>-1</sup>), le Diclofénac (736 ng L<sup>-1</sup>), le bisoprolol (163 ng L<sup>-1</sup>), le kétoprofène (160 ng L<sup>-1</sup>) et le Naproxène (98 ng L<sup>-1</sup>) ont été trouvés dans l'effluent d'eaux usées à des concentrations très significatives, mais ils sont moins à ceux trouvés dans l'échantillon d'effluent de traitement, l'Acétaminophène, nadolol, et l'ibuprofène n'ont pas été détectés.

Ce travail a donc abouti la mise au point d'une méthode d'analyse multi-résidus permettant la détection et la quantification de 20 composés organiques dans les surfaces aquatiques par LC-MS/MS à une teneur moyenne en microgramme par litre.

Les méthodes analytiques développées au cours de cette thèse, autorisent désormais le contrôle d'une multitude de pesticides et produits pharmaceutiques dans les différentes sources d'eau. Elle pourrait notamment se révéler très utile dans le cadre de la mise en place d'une étude sur l'évaluation des facteurs de concentration des pesticides au cours des procédés d'extraction des eaux environnementales. Enfin, même si les méthodes analytiques développées autorisent la détection d'un grand nombre de composés organiques, elles restent néanmoins soumises au principe de « on ne trouve que ce que l'on recherche ». Il est donc probable qu'une amélioration significative des méthodes soit apportée dans un futur proche grâce à l'avènement de nouveaux adsorbants sélectifs.

Enfin, ce travail mériterait d'être poursuivi en testant quelques produits pharmaceutiques et produits d'usage personnel de type parabène et UV filtre; par la silice mésoporeuse MCM41.

**Rapport-Gratuit.com**

---

*La partie Expérimentale*

---

## I. Produits pharmaceutiques.

### 1. Préparation des solutions standards

Une concentration de 400ppm est préparée pour chaque analyte, peser environ 10mg de principe actif et le diluer dans 25mL de méthanol grade HPLC. Les solutions standards sont conservées dans des flacons ambrés et porter a 4°C au frigo.

Composés	P(mg)	C (ppm)	Composés	P(mg)	C (ppm)
Nadolol	10.6	424	Diclofénac	12	480
Metoprolol	11.4	456	Ac. Flufénamique	11.1	444
Bisoprolol	5.7	228	Ac. Meclofénamique	10.7	428
Bétaxolol	10.4	416	Ac. Tolfénamique	10.1	404
Naproxène	11.7	468	Paracétamol	11.5	460
Kétprofène	9	360	Ibuprofène	11.4	456

### 2. Identification par Chromatographie Phase Liquide (DAD)

#### 2.1 Préparation de la matrice standard

Dans une fiole de 10 mL, prélever l'équivalent de 20ppm de concentration de chaque standard (voir le tableau). Compléter le volume par le méthanol.

Ensuite prélever 1mL de cette solution mère et la diluer dans une fiole de 10mL par le mélange 20/80 de MeOH/Eau.

Deux matrices sont préparées MI et MII

Composés	MI		Composés	MII	
	C (ppm)	Vc (µl)		C (ppm)	Vc (µl)
Nadolol	424	471	Ac. Flufénamique	444	450
Metoprolol	456	438	Ac. Tolfénamique	404	495
Bisoprolol	228	877	Ibuprofène	456	438
Bétaxolol	416	480	Kétprofène	360	555
Naproxène	468	427			
Paracétamol	460	437			
Diclofénac	480	416			
Ac. Meclofénamique	428	467			

## 2.1 Conditions chromatographies

Mode gradient

Colonne : C18(150 X 4.6 , 3 $\mu$ m)

Volume d'injection : 20 $\mu$ l.

Phase mobile : (25 mM acide *o*-phosphorique pH : 3 $\pm$ 0.1/ Acétonitrile/ Méthanol)

Température : 25°C.

### MI

temps	A	B	C	Débit ml/min	Courbe
0	75	5	20	1	6
3	75	5	20	1	6
4	75	5	20	1.5	6
15	30	30	40	1.5	6
20	30	30	40	1.5	6
25	75	5	20	1.5	3
26	75	5	20	1	3

### MII

temps	A	B	C	Débit ml/min	Courbe
0	50	30	20	1.5	6
10	30	50	20	1.5	6
13	30	50	20	1.5	6
16	50	30	20	1.5	6

## 3. L'optimisation de la méthode

### 3.1 Préparation des cartouches

Peser la seringue de 1mL de volume (polypropylène) avec un frité (polyéthylène) y Tarer. Ensuite ajouter les 20mg de nanotube de carbone (MWCnts) progressivement. En fin couvrir le MWCnts par un autre frité.

### 3.2 Préparation des solutions standards

Dans une fiole de 10mL, diluer 1 ml de la solution mère I dans le Méthanol, Pour avoir une concentration de 2ppm. A partir de cette concentration, prélever 10  $\mu$ L y diluer dans une fiole de 10mL de mélange MeOH/Eau : (20/80).

### 3.3 Solvant d'élution et son volume

Préparer des solutions de 10mL d'eau ultra pure, prélever l'équivalent de 2ppb dans un millilitre de la solution I. Les cartouches sont pré-conditionnées par 2mL du solvant d'élution et 2mL d'eau ultra pure. Percoler les échantillons à travers les cartouches, sécher les cartouches par N<sub>2</sub> liquide pendant 10min. Les cartouches sont éluées par plusieurs solvants (3mL), (voir le tableau), ensuite sécher le solvant d'élution et reconstituer la concentration (2ppb) dans un millilitre dans le mélange MeOH/Eau (20/80). En fin les extraits sont analysés par HPLC/DAD. Le même mode opératoire est appliqué sur la matrice II.

Analytes %	Ace	Nad	Met	Bis	Bet	Nap	Dic	Mec	Két	Ibu	Flu	Tol
Méthanol	-	10	15	10	20	-	-	-	10	15	25	13
Acétonitrile	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthanol/Hexane	-	15	25	20	10	-	-	-	10	-	20	10
DCM /Acétone	10	-	-	30	-	40	72	16	20	30	36	40
Acétone	-	22	91	18	91	49	46	30	40	35	50	63
Méthanol/Acétone.	-	15	60	20	75	42	35	25	25	30	42	50
Méthanol/Aco <sub>2</sub> Et	0,1	15	30	25	35	20	13	-	30	25	30	12
Acétone/ Aco <sub>2</sub> Et	20	10	25	18	35	23	15	-	10	15	21	23
MeOH+2%NH <sub>4</sub> OH	-	10	25	18	35	23	15	10	10	15	21	23
Acetonitrile+2%NH <sub>4</sub> OH	-	5	10	15	12	23	10	15	10	-	-	-
Acétone +2%NH <sub>4</sub> OH.	-	10	15	15	25	18	15	10	15	25	20	10
MeOH+2%NH <sub>4</sub> OH	-	10	25	18	35	23	15	10	10	15	21	23
MeOH+5%NH <sub>4</sub> OH.	9	20	30	25	35	45	40	18	20	28	32	25
MeOH+10%NH <sub>4</sub> OH.	48	66	71	65	66	81	31	67	78	75	65	30
MeOH+10%NH <sub>4</sub> OH (7ml).	42	80,5	69	68,6	74,5	86,5	92	79	97	90	82	41

### 3.4 Etude de pH

Le mode opératoire suivant est général pour la suite des études, seulement on fait varier la condition à optimiser et fixer les autres conditions.

Les échantillons sont préparés dans des fioles de 100mL du volume, prélever l'équivalent de 2µg dans un millilitre de PPs et diluer dans l'eau ultra pure à différent pH. Le pH des échantillons est ajusté par HCl 0.1M et NaOH 0.1N.

Les cartouches sont pré-conditionnées par 2mL du méthanol et 2mL d'eau acidifiée. Percoler les échantillons à travers les cartouches, sécher les cartouches par N<sub>2</sub> liquide pendant 10min. Les cartouches sont éluées par 7mL de méthanol+10%hydroxyde d'ammonium, ensuite sécher le solvant d'élution et reconstituer la concentration (2ppb) dans un millilitre dans le mélange

MeOH/Eau (20/80). En fin les extraits sont analysés par HPLC/DAD. Le même mode opératoire est appliqué sur la matrice II.

Analytes	Ace	Bet	Bis	Ket	Met	Nad	Nap	Dic	Flu	Mec	Tol	Ibu
pH2	7	70	87	72	66	65	48	48	70	55	18	40
pH4	3	77	87	76	79	83	53	44	75	68	7	36
pH6	4	55	68	65	71	69	44	62	86	68	18	54
pH8	7	67	83	78	79	79	58	82	98	76	40	56
pH10	5	62	78	54	74	67	40	54	92	49	49	36

### 3.5 L'effet de sels

KCl(M)	Ace	Bet	Bis	Két	Met	Nad	Nap	Dic	Flu	Mec	Tol	Ibu
0	18	82	93	78	78	99	74	69	89	99	72	63
0,001	10	84	96	86	72	83	78	77	91	92	68	83
0,005	21	78	89	82	76	90	90	86	89	97	65	89
0,01	51	81	77	97	84	85	88	97	93	94	73	86
0,02	3	47	55	83	56	54	60	60	82	76	64	89

### 3.6 La quantité de MWCNTs

	Ace	Nad	Met	Bis	Bet	Nap	Dic	Mic	Két	Ibu	Flu	Tol
20	49	80	94	97	82	91	97	90	78	63	89	50
40	27	56	77	55	47	75	85	78	42	39	56	19

### 3.7 Effet du volume d'échantillon

	Ace	Bet	Bis	Két	Met	Nad	Nap	Dic	Flu	Mec	Tol	Ibu
50	30	76	89	94	90	99	86	67	85	81	80	50
100	55	80	88	99	88	98	67	42	88	96	89	69
250	56	72	88	99	58	90	74	56	91	84	83	82

## 4. Validation et optimisation de la méthode par LC-QqQLIT-MS/MS

### 4.1 Solution standard

Dans une fiole de 10mL, prélever 1 ml de la solution mère (2ppm), et la compléter par l'acétonitrile, cette concentration est de 200ppb, ensuite prélever 50µl de cette dernière et la diluer dans une fiole de 10mL du mélange (acétonitrile/ Eau ultra pure) : (1/9). La solution standard est contient 1mg L<sup>-1</sup> du PPs.

### 4.2 Condition LC/MS

Temps (min)	A	B
0	10	90
1	10	90
15	100	0
20	100	0
20.1	10	90
30	10	90

---

Phase mobile : Acétonitrile/0.1% du l'acides formique :A/B

Colonne : ZORBAX Eclipse XDB C8 (143 of 150mm×4.6mm, 5µm).

Débit : 0.5mL.mn<sup>-1</sup>.

Volume d'injection : 10µL.

Composés	tr	Precursor ion	DP	EP	CPX	SRM1	CE1	SRM2	CE2
		(m/z)							
Ace	6.63	152.200	90	10	5	110.100	20	64.800	20
Nad	7.05	310.200	90	10	5	254.400	20	236.100	25
Met	8.21	268.200	90	10	5	116.200	25	159.200	28
Bis	9.00	326.400	90	10	5	116.400	25	72.000	40
Bet	9.54	308.200	90	10	5	72.200	40	133.100	34
Ket	13.30	255.200	90	10	5	105.100	33	209.200	16
Nap	13.40	231.200	90	10	5	185.300	20	170.100	32
Dic	15.10	294.000	-90	-10	-5	250.000	-15	214.100	-28
Ibu	15.50	205.100	-90	-10	-5	161.200	-10	-	-
Flu	15.94	280.000	-90	-10	-5	236.000	-24	176.000	-44
Mec	16.18	294.000	-90	-10	-5	258.000	-21	178.000	-41
Tol	16.66	260.100	-90	-10	-5	216.000	-18	214.000	-25

#### **4.3 Linéarité**

Préparer une série de concentration du PPs, dont les valeurs : 5, 10, 50, 100, 150,200 ppb pour tous les analytes sauf le Nadolol de 8, 10, 50, 100, 150,200ppb et l'ibuprofène 15, 20, 50, 100, 150, 200ppb. Les concentrations sont analysées par LC/MS.

Composés	Concentration	R <sup>2</sup>
Acétaminophène	5-150	0.995
Bétaxolol	5-200	0.997
Bisoprolol	5-200	0.994
Kétoprofène	5-150	0.994
Métoprolol	5-200	0.995
Nadolol	8-150	0.999
Naproxène	5-200	0.997
Diclofénac	5-200	0.999
Ac Flufénamique	5-100	0.998
Ibuprofène	15-200	0.995
Ac Méclofénamique	5-200	0.995
Ac Tolfénamique	5-100	0.999

#### **4.4 La limite de quantification et de détection**

Préparer une concentration à 5ppb dans le mélange (acétonitrile /Eau ultra pure :1/9).

Préparer un blanc du matrice dans une fiole de 100mL, ajouter l'eau de la rivière (nacimiento) ajustée à pH : 8±0.1, 1mL de KCl 1M. Pré-concentrer les échantillons dans les cartouches de 20 mg de MWents. Suivre toutes les étapes de SPE. Avant de reconstituer l'extrait ajouter 75µL de la solution mère de 200ppb pour avoir une concentration de 15ppb, compléter le volume à 1millilitre par le mélange 1/9 du l'acétonitrile /eau ultra pure.

Analyser par LC/MS.

#### **4.5 Effet de matrice**

Deux matrices à préparer : une dans le solvant (Standard) et l'autre dans l'eau de la rivière.

Les concentrations à préparer sont : M2 (50)ppb, M3 (100)ppb, M4 (200)ppb et M1 un échantillon en blanc.

Les matrices sont préparées en deux répliques quelque soient standard ou échantillon.

Les échantillons sont préparés en blanc (ils ne contiennent pas des analytes) sont pré-concentrés en suivant la même procédure d'extraction. A la reconstitution des concentrations en ajoutant 250µL pour M2 à partir d'une solution mère de 200ppb, 500µL pour M3 et 1000µL pour M4. Les solutions M2, M3, M4 et le blanc sont complétées par le mélange 1/9 d'ACN/Eau jusqu'à 1mL.

Le tous est analysé par LC/MS.

#### **4.6 L'ajout du standard**

Préparer cinq concentrations standard (25,50, 100, 150, 200)ppb.

Les échantillons sont préparés en quatre solutions en blanc, les échantillons sont pré-concentrés en suivant la même procédure d'extraction. A la reconstitution des concentrations en ajoutant 12.5µL à la première, 17. 5µL à la deuxième, 25 µL à la troisième et en gardant une en blanc.

Les solutions 1, 2, et 3 sont diluées par le mélange 1/9 :ACN/Eau jusqu'à un millilitre. Pour avoir 25, 35 et 50ppb de concentration.

Le blanc est reconstitué par 1mL d'ACN/Eau : 1/9.

Les concentrations sont préparées à partir d'une solution mère de 2ppm.

Toutes les solutions sont analysées par LC/MS.

#### **4.7 Rendement et exactitude**

Préparer trois échantillons de 50ppb et trois de 100ppb pour l'eau ultra pure et l'eau de la rivière (Nacimiento). Les douze échantillons sont préparés de la même façon, ou le pH est ajusté à 8,0 ±0.1, en ajoutant 1mL de KCl 1M. Pré-concentrer les échantillons dans les cartouches de 20 mg de MWcnts. Suivre toutes les étapes de SPE. Ensuite reconstituer l'extrait par 1 millilitre par le mélange 1/9 du l'acétonitrile /eau ultra pure.

Analyser par LC/MS.

Composés	L'eau Ultra pure (R %)		L'eau de Rivière (R %)	
	50	100	50	100
Ace	30.0	24.6	4.3	6.5
Bet	87.2	72.7	68.5	91.7
Bis	81.5	91.4	69.1	78.2
Nad	81.3	98.2	97.3	106.6
Met	80.7	86.8	83.0	79.6
Ket	94.5	84.2	69.1	70.4
Ibu	50.3	76.6	50.9	52.1
Nap	95.1	88.3	82.3	79.2
Dic	75.7	97.9	93.7	79.0
Flu	85.6	88.0	70.9	73.2
Tol	40.3	49.3	23.2	38.1
Mec	84.2	95.7	82.5	83.9

#### 4.8 Application réelle

Préparer cinq échantillons réels en blanc, deux de la rivière Andarax point 1 et 2, le troisième de la rivière Nacimiento, le quatrième et le cinquième sont prélevés de la station d'épuration d'Almeria : une entrée (IFW) et sortie de traitement (EFW). Les échantillons sont de 100mL du volume; ajustés de et de la quantité nécessaire de sel (KCl).

Les échantillons sont pré-concentrés de la même façon à travers des cartouches de 20mg du MWCnts.

Les extraits sont analysés par LC/MS. Les quantités détectées sont en (ng L<sup>-1</sup>).

Analytes	AXR1	AXR2	NCR	IFW	EFW
Ace	-	-	-	3491	-
Nad	-	-	-	80	-
Met	-	-	-	<42	<42
Bis	-	<54	-	182	163
Bet	-	-	-	-	-
Ket	-	-	-	307	160
Nap	<51	<51	-	2237	98
Dic	36.5	<29	-	851	736
Ibu	<121	<121	-	1363	-
Flu	-	-	-	1334	772
Mec	-	-	-	-	-
Tol	-	-	-	-	-

## II. Produits phytosanitaires

### 1. Préparation des solutions standards

Une concentration de 400ppm est préparée pour chaque analyte, peser environ 10mg de principe actif et le diluer dans 25mL d'acétonitrile grade HPLC. Les solutions standards sont conservées dans des flacons ambrés et porter à 4°C au frigo.

Composés	P(mg)	C (ppm)
Methomyl	15	600
Malathion	12	480
Cymoxanil	11	440
Methidathion	11	440
Parathion Methyl	10.4	416
Penconazole	11	440
Diazinone	11	440
Phosalone	13	520

## 2. Identification par Chromatographie Phase Liquide (DAD)

### a. Préparation de la matrice standard

Dans une fiole de 10 mL, prélever l'équivalent de 20ppm de concentration de chaque standard (voir le tableau). Compléter le volume par le méthanol.

Ensuite prélever 1mL de cette solution mère et la diluer dans une fiole de 10mL par le mélange 50/50 de MeOH/Eau.

Composés	C (ppm)	Vc (µl)
Méthomyl	600	333
Malathion	480	416
Cymoxanil	440	454
Méthidathion	440	454
Parathion Méthyl	416	481
Penconazole	440	454
Diazinon	440	454
Phosalone	520	384

### 2.1 Conditions chromatographies

Mode gradient

Colonne : C18 (150 X 4.6, 3µm)

Volume d'injection : 20µl.

Phase mobile : (Eau ultra pure/Méthanol)

Température : 25°C.

Débit : 0.4 mL min<sup>-1</sup>

temps	A	B
0	50	50
3	50	50
23	30	70
28	0	100
30	0	100
32	50	50

### 3. L'optimisation de la méthode MWCnt

#### 3.1 Préparation des cartouches

Préparer les cartouches de la même façon que les produits pharmaceutiques.

#### 3.2 Préparation des solutions standards

Dans une fiole de 10mL, diluer 1 ml de la solution mère dans le Méthanol, Pour avoir une concentration de 2ppm. A partir de cette concentration, prélever 10 µL y diluer dans une fiole de 10mL de mélange MeOH/Eau : (50/50).

#### 3.3 Solvant d'élution

Préparer des solutions de 10mL d'eau ultra pure, prélever l'équivalent de 2ppb dans un millilitre de la solution mère. Les cartouches sont pré-conditionnées par 5mL du solvant d'élution et 5mL d'eau ultra pure. Percoler les échantillons à travers les cartouches, sécher les cartouches par N<sub>2</sub> liquide pendant 10min. Les cartouches sont éluées par plusieurs solvants (2mL), (voir le tableau), ensuite sécher le solvant d'élution et reconstituer la concentration (2ppb) dans un millilitre dans le mélange MeOH/Eau (50/50). En fin les extraits sont analysés par HPLC/DAD.

Analytes	Met	Cym	Med	Pmt	Mat	Pen	Dia	Pho
MeOH		64	76	39	69	80	34	11
ACN	47	50	65	58	69	65	66	42
DCM	47	65	69	63	64	67	55	50
Acétone	60	88	99	84	88	87	78	28
Acétate d'éthyle	20	35	12	41	25	0	0	0
n.Hexane	35	40	62	30	45	50	53	45
Acétone/ n.Hexane	59	78	93	80	74	88	65	52
ACN/ MeOH	50	65	63	30	73	83	37	0
Acétone / MeOH	52	73	70	72	78	75	30	0
MeOH+10%NH <sub>4</sub> OH	0	0	0	0	0	0	0	0

### 3.4 Etude de pH

Le mode opératoire suivant est général pour la suite des études, seulement on fait varier la condition à optimiser et fixer les autres conditions.

Les échantillons sont préparés dans des fioles de 100mL du volume, prélever l'équivalent de 2µg dans un millilitre de pesticide et diluer dans l'eau ultra pure à différent pH. Le pH des échantillons est ajusté par HCl 0.1M et NaOH 0.1N.

Les cartouches sont pré-conditionnées par 5mL du méthanol et 5mL d'eau acidifiée. Percoler les échantillons à travers les cartouches, sécher les cartouches par N<sub>2</sub> liquide pendant 10min. Les cartouches sont éluées par 3mL de mélange Acétone/n.Hexane, ensuite sécher le solvant d'éluion et reconstituer la concentration (2ppb) dans un millilitre dans le mélange MeOH/Eau (50/50). En fin les extraits sont analysés par HPLC/DAD.

Pesticides	Met	Cym	Med	Pmt	Mal	Pen	Dia	Pho
pH:3	56	80	83	98	95	95	80	50
pH:5	74	94	81	86	67	95	76	52
pH:7	61	98	79	97	96	94	47	71
pH:9	58	60	46	66	33	49	77	53

### 3.5 L'effet de sels

Pesticides	Met	Cym	Med	Pmt	Mal	Pen	Dia	Pho
0,001M	70	97	96	66	66	93	57	59
0,005M	46	97	95	91	83	98	85	51
0,01M	41	68	74	30	41	75	32	38
0,02M	55	79	87	38	48	97	42	45

### 3.6 *L'effet du solvant organique*

Pesticides	Met	Cym	Med	Pmt	Mal	Pen	Dia	Pho
0%	55	75	82	66	95	96	62	60
1%	63	84	92	82	96	98	76	55
2%	58	87	93	89	94	87	81	56
3%	43	66	80	41	76	93	0	67

### 3.7 *La quantité de MWCNTs*

Analytes	Met	Cym	Med	Pmt	Mal	Pen	Dia	Pho
20mg	69	97	95	96	84	86	74	94
50mg	91	65	74	60	73	45	50	0

### 3.8 *Effet du volume d'échantillon*

Pesticides	Met	Cym	Med	Pmt	Mal	Pen	Dia	Pho
50 ml	41	77	76	65	99	92	68	51
100 ml	40	92	94	83	94	93	94	55
250 ml	47	82	93	91	94	91	87	62
500 ml	0	78	86	58	85	73	69	72

## 4. Validation et optimisation de la méthode par LC-QqQLIT-MS/MS

### 4.1 *Solution standard*

Dans une fiole de 10mL, prélever 1 ml de la solution mère (2ppm), et la compléter par l'acétonitrile, cette concentration est de 200ppb, ensuite prélever 50µl de cette dernière et la diluer dans une fiole de 10mL du mélange (acétonitrile/ Eau ultra pure) : (1/9). La solution standard est contient 1mg L<sup>-1</sup> de pesticides.

#### 4.2 Condition LC/MS

Temps (min)	A	B
0	10	90
0.5	10	90
9.5	100	0
14.5	100	0
14.6	10	90
24.6	10	90

Phase mobile : Acétonitrile/0.1% du l'acides formique : A/B

Colonne : ZORBAX Eclipse XDB C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm).

Débit : 0.4 mL.min<sup>-1</sup>.

Volume d'injection : 10µL.

Analytes	t <sub>R</sub> (mn)	Précurseur ion (m/z)	DP	EP	CPX	CE1	SRM1	CE2	SRM2
Méthomyl	4.67	163.1	60	10	4	15	88.0	15	106.1
Cymoxanyl	3.61	199.1	84	10	4	25	111.0	13	128.0
Méthidathion	9.13	303.0	60	10	4	13	145.1	27	85.0
Malathion	9.80	331.1	60	10	4	16	127.1	11	285.1
Penconazole	9.78	285.0	100	10	4	27	70.0	20	159.0
Diazinon	10.80	305.1	100	10	4	30	169.0	27	153.1
P-méthyl	9.45	264.2	140	10	4	27	125.0	24	232.1
Phosalone	10.80	368.1	120	10	4	19	182.0	13	322.1

#### 4.2 Linéarité

Préparer une série de concentration, dont les valeurs : 0.1, 0.2, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200 ppb pour tous les analytes. Les échantillons sont analysés par LC/MS.

Analytes	Concentrations	R2
Cymoxanil	0,1-50	0,994
Diazinon	0,1-10	0,999
Malathion	0,1-50	0,995
Méthidathion	0,1-100	0,993
Méthomyl	0,2-50	0,982
Parathion-Méthyl	0,1-100	0,997
Penconazole	0,2-200	0,994
Phosalone	0,2-100	0,997

#### **4.4 La limite de quantification et de détection**

Préparer une concentration à 5ppb dans le mélange (acétonitrile /Eau ultra pure :1/9).

Préparer des blancs de matrice, de quatre types d'eau : (NCR, ANX, BNT et GUA) ajustés à pH :  $5 \pm 0.1$ , 0.5mL de KCl 1M et 1% du méthanol. Pré-concentrer les échantillons dans les cartouches de 20 mg de MWcnts. Suivre toutes les étapes de SPE. Avant de diluer les extraits, ajouter 25 $\mu$ L et 50 $\mu$ L de pesticides (200ppb), ensuite compléter la dilution jusqu'à 1millilitre par le mélange 1/9 acétonitrile /eau ultra pure. Enfin analyser par LC/MS.

#### **4.5 Effet de matrice**

Les blancs de matrice sont préparés à différents niveaux de concentration M1(0),M2(5- 10), M3 (10-25), M4(15-50) et M5(20-75) seul le diazinon est préparé à 0, 5, 10, 15 et 20 ppb.

Les échantillons sont pré-concentrés comme auparavant. Les extraits sont dilués par (0-0, 50-50,100-125, 150-250, 200-375) $\mu$ L de 100 ppb de diazinon et 200ppb de pesticides sans diazinon, compléter par le mélange 1/9 d'ACN/Eau jusqu'à 1mL.

les concentrations de standard sont : Sd1(5- 10), Sd2 (10-25), Sd3(15-50) et Sd4(20-75).

Le tous est analysé par LC/MS.

#### **4.6 Rendement et exactitude**

Préparer trois répliques pour chaque niveau de concentration : (5-25) et (10-50)ppb dans l'eau ultra pure et les quatre type d'eau NCR, ANX, BNT et GUA. Les trente échantillons sont préparés de la même façon, ou le pH est ajusté à  $5,0 \pm 0.1$ , en ajoutant 0.5mL de KCl 1M et 1% du méthanol. Pré-concentrer les échantillons dans les cartouches de 20 mg de MWcnts. Suivre toutes les étapes de SPE. Ensuite reconstituer l'extrait par 1 millilitre par le mélange 1/9 du l'acétonitrile /eau ultra pure.

Analyser par LC/MS.

Les concentrations 5 et 10 sont pour le diazinon.

Analytes	Eau Up		NCR		ANX		BNT		GUA	
	25	50	25	50	25	50	25	50	25	50
MET	51	54	43	50	49	52	60	53	56	58
CYM	80	59	86	57	79	71	71	68	74	68
MED	100	95	98	98	84	86	93	86	84	90
MAL	110	122	86	97	77	107	89	107	109	76
PEN	100	86	66	69	87	102	86	73	87	91
DIA	106	121	91	58	111	96	94	70	71	72
PMT	89	81	81	83	79	72	95	79	84	72
PHO	115	81	98	89	65	64	57	57	58	60

## 5. L'optimisation de la méthode MCM41

### 5.1 Synthèse de la silice poreuse MCM41

Dans un bécher de 250ml, peser 2.5g de n.hyxadecyltriméthylaminebromide (C16TMBr) 0.007mole, dissoudre dans 50 g d'eau distillée et 13.2g de l'ammoniac (32% wt, 0.25mol), ajouter 60g de éthanol absolue 1.3mol.

Ce mélange met en agitation magnétique pendant 15 min, ensuite ajouter 4.7g de TEOS (0.022mol), une fois le gel est formé laisser ce mélange sous agitation magnétique pendant 2h.

Le précipité sera lavé par 100ml de l'eau distillée et 100ml de méthanol. Le mettre à l'étuve pendant toute une nuit à 363K, et lendemain le calciner à 823K pendant 5h, puis le mettre au dessiccateur.

### 5.2 Préparation des cartouches

Les cartouches sont préparées par 50mg de MCM41.

### 5.3 Solvant d'élution

Préparer treize cartouches de 50mg de MCM41, de la même façon que la préparation des cartouches de type MWCnts. Dans des fioles de 10ml, préparer des solutions de telle façon

d'avoir une concentration de 2ppm dans un millilitre. Les solutions sont préparées par de l'eau ultra pure.

Les cartouches sont conditionnées comme suit : 5ml de solvant d'élution et 5ml de l'eau ultra pure. Connecter les solutions aux cartouches, faire percoler les solutions de tel sort d'avoir un débit de 1 ml/min, une fois les solutions sont complètement percolées; laisser les cartouches sèchent à l'air ambiant sous l'effet de la pompe de system de SPE pendant 10min ensuite les sécher sous N<sub>2</sub>. Eluer les cartouches par 2ml de solvant ou même par un mélange des solvants; la reconstitution de la concentration se fait par une dilution de 1ml de MeOH/H<sub>2</sub>O: (50/50 : V/V); pour l'injecter à HPLC.

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Analytes	Met	Cym	Med	Pmt	Mal	Pen	Dia	Pho
MeOH	21.6	24.8	80.5	79.9	34.4	70.2	64.3	63.2
ACN	22.3	27.2	101.4	105.1	36.6	94.0	57.3	70.9
DCM	21.3	29.1	69.5	62.6	19.3	71.1	40.1	52.2
n,Hexane	0	0	0	0	0	23.0	28.5	77.4
Acétone	14.8	30.0	65.1	73.6	26.8	78.4	28.5	77.4
MeOH +5% NH <sub>4</sub> OH	21.31	8.38	73.39	56.29	16.90	47.26	29.78	33.4
ACN+5% NH <sub>4</sub> OH	26.20	32.80	83.65	75.49	47.39	66.82	59.41	77.0
MeOH +10% NH <sub>4</sub> OH	15.31	14.08	51.35	49.02	50.17	56.19	62.34	52.2
ACN+10% NH <sub>4</sub> OH	20.17	19.35	44.60	22.14	54.14	63.60	23.18	49.2
Ac Acétique 2% (7ml)	8.1	6.7	91.2	92.3	90.0	91.7	71.3	85.3
Acétate ammonium 0,01M (7ml)	8.4	4.7	87.1	82.8	74.7	83.5	67.2	69.3
Ac Acétique 2% (2ml)	0	0	0	0	0	0	0	0
Acétate ammonium 0,01M (2ml)	0	0	0	0	0	0	0	0
ACN (7ml)	20	24.5	105.4	94.5	98	99.6	96.6	97.1

#### 5.4 Etude de pH

Le mode opératoire suivant est général pour la suite des études, seulement on fait varier la condition à optimiser et fixer les autres conditions.

Les cartouches sont préparés à 50mg de MCM41. Dans des fioles de 25ml, préparer des solutions de telle façon d'avoir une concentration de 2ppm dans un millilitre. Les solutions sont préparées dans l'eau ultra pure à différents pH.

Les cartouches sont conditionnées comme suit : 5ml d'acétonitrile et 5 ml de l'eau ultra pure acidifiée (pH est ajusté par HCl 1M et NaOH 1M).

Connecter les solutions aux cartouches, faire percoler les solutions de tel sort d'avoir un débit de 1 ml/min, une fois les solutions sont complètement percolées; laisser les cartouches sèchent à l'air ambiant sous l'effet de la pompe de system de SPE pendant 10min ensuite les sécher sous le nitrogène N<sub>2</sub>. Eluer les cartouches par 7ml d'acétonitile par une mélange des solvants; la reconstitution de la concentration se fait par une dilution de 1ml de MeOH/H<sub>2</sub>O Milli-Q : (50/50 : V/V); pour l'injecter à LC/DAD.

Pesticides	MET	CYM	MET	PMT	MAL	PEN	DIA	PHO
pH:2	5,51	53,60	47,70	44,39	86,09	59,88	101,67	69,16
pH:4	21,37	34,41	58,96	53,42	93,87	81,10	171,47	67,59
pH:6	11,51	15,12	43,64	36,60	77,79	76,48	167,07	65,88
pH:8	9,88	17,32	55,76	57,20	118,28	77,20	118,47	97,87
pH:10	11,03	-	39,62	57,20	26,25	78,81	123,10	83,23

### 5.5 *L'effet de sels*

Pesticides	MET	CYM	MED	PMT	MAL	PEN	DIA	PHO
0M	10,58	15,05	49,84	57,71	73,42	67,94	71,47	60,14
0,001M	14,85	16,51	68,07	62,15	60,03	66,44	59,33	71,39
0,005M	18,09	21,49	68,94	74,39	72,06	70,47	70,85	66,22
0,01M	9,53	13,48	73,02	71,91	56,59	83,07	92,15	83,24
0,02M	-	9,42	66,74	73,21	71,75	83,92	72,53	63,13

### 5.6 *L'effet du solvant organique*

Pesticides	MET	CYM	MED	PMT	MAL	PEN	DIA	PHO
Sans	49,08	83,42	74,00	71,20	72,88	82,82	66,56	67,02
ACN 2%	17,17	34,48	89,80	87,24	81,68	83,13	89,35	82,44
ACN 5%	63,44	5,22	71,82	65,31	79,70	98,76	46,71	87,51
Acétone 2%	4,41	5,36	65,65	79,17	82,11	88,93	89,96	87,33
Acétone 5%	2,40	3,07	25,20	55,05	70,36	87,94	91,23	86,43

### 5.7 La quantité de MCM41

Pesticides	MET	CYM	MED	PMT	MAL	PEN	DIA	PHO
50 (1)	13,15	18,75	72,00	77,72	81,23	84,62	77,72	59,38
50 (2)	13,18	20,74	69,60	77,01	82,33	81,86	84,65	61,21
75 (1)	27,38	35,41	74,27	70,18	69,98	76,88	56,40	48,48
75 (2)	15,24	28,90	87,66	67,64	72,35	80,62	54,98	60,82
100 (1)	28,50	48,10	95,38	89,25	86,94	88,76	80,86	65,33
100 (2)	26,70	51,18	86,80	73,29	70,90	82,03	66,84	55,84

### 5.8 Effet du volume d'échantillon

Pesticides	MET	CYM	MED	PMT	MAL	PEN	DIA	PHO
25	22,93	28,77	97,50	80,04	89,39	82,69	84,64	83,57
50	22,64	29,98	98,30	86,33	96,05	88,59	87,68	75,00
100	21,94	26,74	104,99	91,04	98,12	92,25	79,08	80,69
250	5,81	9,23	86,17	83,77	89,35	91,02	87,35	78,12

### 5.9 L'effet de l'acide humique

#### Mode opératoire

Dans des fioles de 100ml, préparer des solutions de telle façon d'avoir une concentration de 2ppm dans un millilitre. Les solutions sont préparées dans l'eau ultra pure ajuster à pH : $4\pm 0.1$  ajouter une concentration de 0.001M de KCl dans les échantillons; pour une solution ajouter 2ppm de l'acides humique et 5ppm pour la deuxième. Aussi un échantillon sans l'acide humique (M SH) pour la confirmation.

Les cartouches sont conditionnées comme suit : 5ml d'acétonitrile et 5 ml de l'eau ultra pure à pH : $4\pm 0.1$  .

Connecter les solutions aux cartouches, faire percoler les solutions de tel sort d'avoir un débit de 1 ml/min, une fois les solutions sont complètement percolées; laisser les cartouches sèchent à l'air ambiant sous l'effet de la pompe de system de SPE pendant 10min ensuite les sécher sous le nitrogène N<sub>2</sub>. Eluer les cartouches par 7ml d'acétonitrile par une mélange des solvants; la reconstitution de la concentration se fait par une dilution de 1ml de MeOH/H<sub>2</sub>O Milli-Q : (50/50 : V/V); pour l'injecter à HPLC.

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant

Pesticide	MET	CYM	MED	PMT	MAL	PEN	DIA	PHO
M 2ppm	8,71	12,66	97,63	87,16	88,47	92,81	80,86	77,52
M 5ppm	6,85	7,08	99,65	81,86	82,82	88,87	81,56	84,35
M SH	21.94	26.74	91,02	94.5	99.0	96.0	92,14	97

## 6. Validation et optimisation de la méthode par LC-QqQLIT-MS/MS

### 6.1 La limite de quantification et de détection

Préparer une concentration à 5ppb dans le mélange (acétonitrile /Eau ultra pure :1/9).

Préparer des blancs de matrice, de deux types d'eau : (NCR, BNT) ajustés à pH :  $4 \pm 0.1$ , 1mL de KCl 1M. Pré-concentrer les échantillons dans les cartouches de 100 mg de MCM41. Suivre toutes les étapes de SPE. Avant de diluer les extraits, ajouter 25 $\mu$ L et 50 $\mu$ L de pesticides (200ppb), ensuite compléter la dilution jusqu'à 1millilitre par le mélange 1/9 acétonitrile /eau ultra pure. Enfin analyser par LC/MS.

### 6.2 Effet de matrice

Les blancs de matrice sont préparés à différentes niveaux de concentration M1(0), M2(5- 25), M3 (10-50) et M4(20-75) seul le diazinon est préparé à 0, 5, 10 et 20 ppb.

Les échantillons sont pré-concentrés comme auparavant. Les extraits sont dilués par (0-0, 50-125,100-250, 200-375) $\mu$ L de 100ppb de diazinon et 200ppb de pesticides sans diazinon, compléter par le mélange 1/9 d'ACN/Eau jusqu'à 1mL.

Les standards de calibration : Sd1(2-10), Sd2(5-25), Sd3(10-50), Sd4(20-75) et Sd5(50-100) sont préparés en dupliquas

Le tous est analysé par LC/MS.

### 4.6 L'ajout du standard

Préparer cinq concentrations standard Sd1(2-10), Sd2(5-25), Sd3(10-50), Sd4(20-75) et Sd5(50-100)ppb.

Deux niveaux de concentration étaient étudié 25 et 50ppb. Six échantillons sont fortifiés pour chaque type d'eau; comme suit, trois par 25ppb et les trois autres par 50ppb.

Les échantillons sont pré-concentrés en suivant la même procédure d'extraction. A la reconstitution des concentrations en ajoutant 250µL à la deuxième, 500µL à la troisième et 0 µL à la troisième concentration pour chaque niveau de concentration.

Compléter les échantillons à un millilitre du volume par 1/9 : ACN/Eau.

Les deux types d'eau ont été préparés de la même façon.

Les concentrations sont préparées à partir d'une solution mère de 100ppb.

Toutes les solutions sont analysées par LC/MS.

#### 4.6 Rendement et exactitude

Préparer trois répliques pour chaque niveau de concentration : (5-25) et (10-50)ppb dans l'eau ultra pure et les quatre type d'eau NCR, BNT. Les trente échantillons sont préparés de la même façon, ou le pH est ajusté à  $5,0 \pm 0,1$ , en ajoutant 0.5mL de KCl 1M et 1% du méthanol. Pré-concentrer les échantillons dans les cartouches de 20 mg de MWcnts. Suivre toutes les étapes de SPE. Ensuite reconstituer l'extrait par 1 millilitre par le mélange 1/9 du l'acétonitrile /eau ultra pure.

Analyser par LC/MS.

Les concentrations 5 et 10 sont pour le diazinon.

	Eau ultra pure		BNT		NCR	
	25	50	25	50	25	50
MET	-	-	-	-	-	-
CYM	15.7	17.9	15.4	10.4	20.44	20.3
MED	66.6	88.4	70.3	73.0	79.9	86.9
PMT	73.9	77.6	53.0	57	59.8	72.1
MAL	112.3	104.3	95.6	102.1	157.8	158.3
PEN	76.6	80.8	44.8	56.3	64.8	60.6
DIA	92.1	82.4	70.9	73.8	115.7	97.9
PHO	59.4	61.1	43.8	44.9	51.8	53.8

---

*Références Bibliographiques*

---

## Références Bibliographiques

- [1] J. L. Barreriro, *In Focus on Water Resource Research, First ed.*; Heikkinen, E., Ed.; Nova Science Publishers: New York (2008) pp 3-14.
- [2] S. Glassmeyer, *In Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems, First ed.*; Aga, D. S., Ed.; Taylor & Francis Group: Boca Raton, London, New York (2008) pp 3-52
- [3] C. G. Daughton, *Environmental Impact Assessment Review*, 24 (2004) 711-732.
- [4] M. J. L. de Alda, S. Diaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barcelo, *J. Chrom. A*, 1000 (2003) 503-526.
- [5] H. Karlsson, D. Muir, C.F. Teixeira, D.A. Burniston, W. M. J. Strachan, R.E. Hecky, J. M. Harve, A. Bootsma, N. P. Grift, K. A. Kidd, B. Rosenberg, *Environ. Sci. Technol.* 34. 21(2000) 4490–4495.
- [6] C. Bliefert, R. Perraud, *Chimie de l'Environnement* (2008).
- [7] a) M. Petrovic, S González, D. Barceló, TrAC, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 685-696  
b) M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 549-562  
c) T. Smital, T. Luckenbach, R. Sauerborn, A.M. Hamdoun, R.L. Vega, D. Epel, *Mutation Research* 552 (2004) 101-117.  
d) P.K. Jjemba, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 63 (2006) 113-130.
- [8] Fenet H, Gomez E, Leclerc M, Casellas C, *Environ. Risques Santé*, 5 (2006) 243-247
- [9] Andreozzi R, Marotta R, Praéxus NA, *Chemosphere*, 50 (2003) 1319-1330
- [10] Garric J et Ferrari B, comportement et impact, TSM, 99 (2004) 47-58
- [11] J. Hospitalier-Rivillon, R. Poirier, *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 69, 3 (2008) 496-505.
- [12] Décision no 2455/2001/CE du Parlement européen et du Conseil du 20 novembre 2001 établissant la liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau et modifiant la «Directive 2000/60/CE ».
- [13] Miquel la qualité de l'eau et l'assainissement en France <http://www.senat.fr/rap/102-215-2/102-215-21.pdf>
- [14] Index phytosanitaire ACTA, Association De Coordination Technique Agricole, 2006.
- [15] Ministère de la santé et de la Solidarité, Les pesticides dans l'eau potable.
- [16] A. Hercegoà, M. Dömötöravà, E. Motisová, *J. Chrom. A*, 1153 (2007) 54-73.
- [17] Rekha, S. N. Naik, R. Prasad, *J. Chrom. Health Saf* 13 (2006) 12-19.

- [18] A. Meyer, J. Chrisman, J. Costa Moreira, S. Koifman, *Environ. Res* 93 (2003) 264-271.
- [19] L. C. Sánchez-peña, B. E. Reyes, L. López Carrillo, R. Recio, J. Morán Martínez, M. E. Cebrián, B. Quintanilla Vega, *Toxicol. Appel. Pharmacol* 196 (2004) 108-113.
- [20] M. Levario Carrillo, D. Amato, P. Ostrosky-Wegman, C. González Horta, Y. Corona, L. H. Sanin, *Chemosphere* 55 (2004) 1421-1427.
- [21] E. A. Guillette, M. M. Meza, M. . Aquilar, A. D. Soto, I. E. Garcia, *Environ.Health.Perspect*, 1998, 106, 347-353.
- [22] P. Z. Ruckart, K. Kakolewski, F. J. Bove, W.E. Kaye, , *Environ.Health.Perspect* 112 (2004) 46-51.
- [23] J. G. Young, B. Eskenazi, E. A. Gladstone, A. Bradman, L. Pedersen, C. Johnson, D. B. Barr, C. E. Furlong, N. T. Holland, *NeuroToxicology* 26 (2005)199-209.
- [24] G. S. Berkowitz, J. G. Wetmur, E. B. Deych, J. Obel, R. H. Lainski, J. H. Godbold, I. R. Holzman, M. S. Wolff, *Environ.Health.Perspect* 112 (2004) 388-391.
- [25] R. M. Whyatt, V. Raud, D. B. Barr, D. E. Camann, H. F. Andrews, R. Garfinkel, L. A. Hoepner, D. Díaz, J. Dietrich, A. Reyes, D. Tang, P. L. Kinney, F. P. Perera, , *Environ.Health.Perspect* 112 (2004) 1125-1132.
- [26] A. G. Frenich, J. L. Martinez Vidal, M. C. Pablos Espada, M. D. Gil Garcia, F. J. Arrebola, *J. Chromatography*. 52 (2000) 614–620.
- [27] C. Dong, Z. Zeng, *Talanta*. 66 (2005)721–727.
- [28] M. Tankiewicz, J. Fenik, M. Biziuk, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010)1050–1063.
- [29] J. Namieśnik, J. Jaśkowski (Editors), *Zarys Ekotoksykologii, Eko-Pharma, Gdańsk, Poland, 1995*
- [30] A. Kamel, C. Byrne, C. Vigo, J. Ferrario, C. Stafford, G. Verdin, F. Siegelman, S. Knizner, J. Hetrick, *Water Res.* 43 (2009) 522
- [31] M. Jokanović, *Toxicol. Lett.* 190 (2009) 107
- [32] M. Jokanović, *Toxicology* 166 (2001) 139.
- [33] J. Haib, I. Hofer, J. M. Renaud, *J. Chrom. A*, 1020 (2003) 173-187.
- [34] O. Núñez, E. Moyano, M. T. Galceran, *Trends in Anal. Chem* 24 (2005) 683-703.
- [35] J. Wang, W. Cheung, D. Grant, *J. Agric, Food Chem* 53 (2005) 528-537.
- [36] Introduction to EC Pesticides residues legislation.  
[http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/intro\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/intro_en.pdf)
- [37] <http://www.ecologie.gouv.fr/>
- [38] Petrovic M., Barceló D. *Anal. Bioanal. Chem*, (2006) 385, 422-424.
- [39] T.A. Ternes , A. Joss, *IWA Publishing, London, England (2006)*.

- [40] A. Göbel, C.S. McArdell, A. Joss, H. Siegrist, W. Giger, *Sci. Tot. Environ.* 372 (2007) 361-371.
- [41] T. A. Ternes, R. Hirsh, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2741-2748.
- [42] B. M. Braune, P. M. Outridge, A. T. Fisk, D. C. G. Muir, P.A. Helm, K. Hobbs, P. F. Hoekstra, Z. A. Kuzyk, M. Kwan, R. J. Ketcher, W. L. Lockhart, R. J. Norstrom, G. A. Stern, I. Stirling, "Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: An overview of spatial and temporal trends" 351-352 (2005) 4-56.
- [43] P. Cuderman, E. Heath, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 1343-1350.
- [44] A. Agüera, A. R. Fernandez-Alba, L. Piedra, M. Mezcuca, M. J. Gómez, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 193-205.
- [45] T. P. Knepper, P. Eichhorn, "Surfactant metabolites in Organic Pollutants in the Water Cycle" Reemtsma T., Jekel M. (eds), Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2006)211-250.
- [46] M. Ahel, E. Molnar, S. Ibric, W. Giger, *Wat. Sci. Techn.* 42 (2000) 15-22.
- [47] H. Fromme, T. Kuchler, T. Otto, K. Pilz, J. Müller, A. Wenzel, *Water Research* 36 (2002) 1429-1438.
- [48] W. Giger, C. Schaffner, H. P. E. Kohler, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7186-7192.
- [49] C. K. Schmidt, H. J. Brauch, Wiley-VCH, Weinheim (2006) 155-180.
- [50] M. J. Moran, J. S. Zogorsk, P. J. Squillace, *Ground Water* 43 (2005) 615-627.
- [51] C. Zwiener, Reemtsma T., Jekel M. (eds), Wiley-VCH, Weinheim (2006) 251-286.
- [52] C. Svrcek, D. W. Smith, *J. Environ. Eng. Sci.* 3 (2004) 155-185.
- [53] R. Fobbe, B. Kuhmann, N. Jürge, G. Preuss, C. Skark, N. Zullei-Seibert, "Reemtsma T., Jekel M. (eds), Wiley-VCH, Weinheim,(2006) 121-154
- [54] [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)
- [55] Rapport de l'Académie nationale de Pharmacie, juin 2008.
- [56] a) M.J. Gómez, M. J. M. Bueno, S. Lacorte, A. R. Fernández-Alba, A. Agüera, *Chemosphere* 66 (2007) 993-1002.
- b) J. L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, M. Callejón, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 116-122.
- c) M. J. M Bueno, A. Agüera, M. J. Gómez, M. D. Hernando, J. F. García, A. R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 79 (2007) 9372-9384
- d) M. Farré, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, L. Tirepu, M. Vilanova, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 187-197.
- e) T. A. Ternes, M. Bonerz, T. Schmidt, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 175-185.
- f) T. A. Ternes, *Trends Anal. Chem.*20 (2001) 419-434

- g) S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zuccato, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 206-215.
- h) M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, *Talanta* 70 (2006) 678-690.
- i) D. L. Sedlak, K. Pinkston, C. H. Huang, *Denver, CO: Awwa Research Foundation* (2005)
- j) J. T. Yu, E. J. Bouwer, M. Coelhan, *Agric. Water Manage.* 86 (2006) 72-80.
- k) L. Lishman, S. A. Smyth, K. Sarafin, S. Kleywegt, J. Toito, T. Peart, B. Lee, M. Servos, M. Beland, P. Seto, *Sci. Total Environ.* 367 (2006) 544-558.
- l) C. D. Metcalfe, X. S. Miao, W, H, R, L, *Springer* (2004) pp. 67-90.
- m) S. D. Kim, J. Cho, I.S. Kim, B. J. Vanderford, S. A. Snyder, *Water Res.* 41 (2007) 1013-1021.
- [57] N. Corvaisier, synthèse bibliographique, Février (2000)
- [58] Umweltbundesamt (Hg.): Arzneimittel in der Umwelt – Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt. Texte des Umweltbundesamtes UBA Texte, Nr. 29. Berlin 2005 (abrufbar unter [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de))
- [59] Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC): Arzneimittel in der Umwelt. Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Berlin 2003 (abrufbar unter [www.blac.de](http://www.blac.de))
- [60] Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall (Hg.): Anthropogene Spurenstoffe im Wasserkreislauf – Arzneistoffe. Hefen 2008
- [61] L. B. Liu, Y. Hashi, P. Y. Qin, H. X. Zhou, M. J. Lin, *J. Chrom. B.* 845 (2007) 61-68.
- [62] E. Lacassie, M. F. Dreyfuss, J. L. Daguet, M. Vignaud, P. Marquet, G. Lachâtre, *J. Chrom. A*, 830 (1999) 135-143.
- [63] C. Soler, Y. Pícol, *Trends in Anal Chem*, 26 (2007) 103-115.
- [64] B. Alberto, C. S. Brunete, J. L. Tadeo, *Talanta*, 66 (2005) 917-924.
- [65] C. M. Torres, Y. Pico, J. Manes, *J. Chrom. A*, 754 (1996) 301-331.
- [66] C. G. Zambonin, M. Quinto, N. D. Vierito, F. Palmisano, *Food Chem*, 86 (2004) 269-274.
- [67] A. Beyer, M. Biziuk, *Food Chem*, 108 (2008) 669-680.
- [68] F. E. Ahmed, *Trends in Anal. Chem*, 20 (2000) 649-661.
- [69] J. Namiesnik, T. Gorecki, J. Polish, *of Environ Studies*, 10 (2001) 77-84.
- [70] J. M. F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 996 (2003) 133.
- [71] H. P. Li, G. C. Li, J.F. Len, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 129.

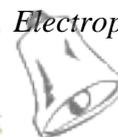
- [72] X. Guardino, J. Obiols, M.G. Rosell, A. Farran, C. Serra, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 91.
- [73] H. Sabik, R. Jeannot, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 197
- [74] M. Schellin, B. Hauser, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 251.
- [75] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 239.
- [76] M.J. Martínez Bueno, S. Uclés, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, *Talanta* 85 (2011) 157–166
- [77] I. Rodríguez, J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr A*, 985 (2003) 265–274
- [78] J. Carpinteiro, J.B. Quintana, E. Martinez, I. Rodríguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Anal Chimica Acta* 524 (2004) 63–71.
- [79] L. Tong, P. Li, Y. Wang, K. Zhu, *Chemosphere* 74 (2009) 1090–1097
- [80] J. Wu, X. Qian, Z. Yang, L. Zhang, *J. Chromatogr A*, 1217 (2010) 1471–1475.1
- [81] M. J. García-Galána, M. S. Díaz-Cruza, D. Barceló, *Talanta* 81 (2010) 355–366.
- [82] L. Bijlsma, R. Serrano, C. Ferrer, I. Tormos, F. Hernández, *Sci Total Environment* 487 (2014) 703-709.
- [83] A. Mendoza, J.L. Rodríguez-Gil, S. González-Alonso, N. Mastroianni, M. López de Alda, D. Barceló, Y. Valcárcel, *Envir Inter* 70 (2014) 76-87.
- [84] J. Hernández-Borges, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, M.Á. Rodríguez-Delgado, *J. Chromatogr. A* 1070 (2005) 171.
- [85] J. Hernández-Borges, M. Á. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 948.
- [86] K. Jinno, Y. Han, H. Sawada, M. Taniguchi, *Chromatogra* 46 (1997) 309.
- [87] L. Hou, X. Wen, C. Tu, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 163.
- [88] L. Zhu, H.K. Lee, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3065.
- [89] D. Figeys, Y. Zhang, R. Aebersold, *Electrophoresis* 19 (1998) 2338.
- [90] C. Z. Dong, Z.R. Zeng, M. Yang, *Water Res.* 39 (2005) 4204.
- [91] Gilson, *The Gilson Guide for SPE automation*.
- [92] C. S. McArdell, A.C. Alder, A. Göbel, D. Löffler, M. J. F. Suter, T. A. Ternes, A. Joss. *Analytical Methods*. 3 (2006) 55-105.
- [93] E. M. Golet, A. C. Alder, A. Hartmann, T. A. Ternes, W. Giger. *J. Anal. Chem.* 73 (2001) 3632-3638
- [94] E. M. Thurman, M. S. Mills. *Wiley-Interscience* (1998).

- [95] M. J. Gómez, M. Mezcua, M. J. Martínez, A. R. Fernández-Alba, A. Agüera. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86 (2006) 3-13.
- [96] W. M. A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2006) 881.
- [97] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 882.
- [98] K. A. Mortier, K.E. Maudens, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, D.L. Deforce, C. H. Van Peteghem, A.P. De Leenheer, *Journal of Chromatography, B* 779 (2002) 321.
- [99] B. K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3019.
- [100] A. Agüera, S. López, A.R. Fernández-Alba, M. Contreras, J. Crespo, L. Piedra, *Journal of Chromatography A* 1045 (2004) 125.
- [101] N. Gilart, F. Borrull, N. Fontanals, R.M. Marcé. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 1 (2014) e8–e18.
- [102] F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollón, S.C.G.N. Braga. *Trends in Analytical Chemistry*, 43 (2013) 14-23
- [103] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 608 (2008) 61.
- [104] N. Luque, S. Rubio, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 74.
- [105] S. Gangula, S.Y. Suen, E.D. Conte. *J. Microchem.* 95 (2010) 2-4. 105
- [106] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, *Nature (London)* 359 (1992) 710.
- [107] S. Rubio, D. Pérez-Bendito. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (7+8) (2003) 470-485.
- [108] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Retroff, F. Schuth, G. D. Stucky. *Nature* 368 (1994) 317-320
- [109] Q. Huo, D. I. Margolese, G. D. Stucky, *Chem. Mater* 8 (1996) 1147.
- [110] P. T. Tanev, T. J. Pinnavia, *Science* 267 (1995) 865.
- [111] S. A. Bagshaw, T. J. Pinnavia, *Angew. Chem. Int. Ed* 35 (1996) 1102.
- [112] a) D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G.D. Stucky. *Science*. 279 (1998) 548.
- b) D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998), 6024.
- [113] M. Grün, A.A. Kurganov, S. Schacht, F. Schüt, K.K. Unger, *J. Chromatogr. A.* 740 (1996) 1.

- [114] a) K. Nakanishi, R. Takahashi, T. Nagakane, K. Kitayama, N. Koheiya, H. Shikata, N. Soga, *J. Sol.-Gel Sci. Technol* 17 (2000) 191.
- b) K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, *J. Sol.-Gel Sci. Technol* 13 (1998) 163
- [115] a) L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Pitarch, M. Ibáñez, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3078
- b) N. Fontanals, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 1286 (2013) 16
- c) M. A. Sousa, C. Gonçalves, E. Cunha, J. Hajslová, M.F. Alpendurada, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 807.
- d) L. H. M. L. M. Santos, P. Paíga, A.N. Araújo, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, *J. Chromatogr. B* 930 (2013) 75).
- [116] a) N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull. *J. Chromatography A*, 1152 (2007) 14–31
- b) N. Gilart, F. Borrull, N. Fontanals, R.M. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 1 (2014) e8–e18).
- [117] J. He, M.M. Giusti, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7914].
- [118] I. Carpinteiro, B. Abuín, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2471.
- [119] a) C. Emotte, O. Heudi, F. Deglave, A. Bonvie, L. Masson, F. Picard, A. Chaturvedi, T. Majumdar, A. Agarwal, R. Woessner, O. Kretz, *J. Chromatogr. B* 895 (2012) 1.
- b) M. E. Lame, E.E. Chambers, M. Blatnik, *Anal. Bioanal. Chem.* 419 (2011) 133.
- [120] M. Lavén, T. Alsberg, Y. Yu, M. Adolfsson-Erici, H. Sun, *J Chromatogr A* 1216 (2009) 49-62.
- [121] R. Curl, H. Kroto, R. Smalley, *Nature* 318 (1985) 162.
- [122] S. Iijima, *Nature* 354 (1991) 56.
- [123] a) S. Iijima, T. Ichihashi, *Nature* 363 (1993) 603.
- b) D.S. Bethune, C.H. Klang, M.S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vasquez, R. Beyers, *Nature* 363 (1993) 605.
- [124] a) Y. D. Tretyakov, E. A. Goodilin, *Russ. Chem. Rev.* 78 (2009) 801–820.
- b) L. He, C-S. Toh, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 1–15.
- [125] a) M-D. J. Cheng, *Environ. Sci. Health* 39 (2005) 2691–2705.
- b) T. J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R.J. Bizios, *Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 475–483.
- c) F.-Y. Cheng, S. P-H. Wang, C-H. Su, T-L. Tsai, P-C. Wu, D-B. Shieh, J-H. Chen, P.C-H. Hsieh, C-S. Yeh, *Biomaterials* 29 (2008) 2104–2112.

- d) Y-C. Chung, I. H. Chen, C-J. Chen, *Biomaterials* 29 (2008) 1807–1816.
- e) C. Deng, J. Chen, X. Chen, C. Xiao, L. Nie, S. Yao, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008)1272–1277.
- [126] K. Yoshimatsu, L. Ye, J. Lindberg, I.S. Chronakis, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008)1208–1215.
- [127] E. Engel, A. Michiardi, M. Navarro, D. Lacroix, J.A. Planell, *Trends Biotechnol.*26 (2008) 39–47.
- [128] R.W. Murray, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1723–11723.
- [129] H. Liu, T.J. Webster, *Biomaterials* 28 (2007) 354–369.
- [130] I. Willner, B. Willner, *Nano Lett.* 10 (2010) 3805–3815.
- [131] R.W. Murray, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2688–2720
- [132] M. Valcarcel, S. Cardenas, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martinez, R. Lucena, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 34–43.
- [133] Y-q. Cai, Y-e. Cai, S-f. Mou, Y-q. Lu, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 245–247.
- [134] C. Xiao, S. Han, Z. Wang, J. Xing, C. Wu, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 121–130.
- [135] P-R. Sudhir, H-F. Wu, Z-C. Zhou, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7380–7385.
- [136] A. Kabir, C. Hamlet, K. Soo Yoo, G.R. Newkome, A. Malik, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 1–11.
- [137] J. Kiyokatsu, Y. Kunihiro, C.F. John, R.B. Wilton, *J. Microcolumn Sep.* 4 (1992)187–190.
- [138] H. Ming-Feng, H. Chih-Ching, C. Huan-Tsung, *Electrophoresis* 24 (2003)2896–2902.
- [139] T. Mari, Y. Katsuyama, K. Nogami, H. Nagata, K. Wakuda, M. Fujimoto, Y.Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba, *Lab Chip* 5 (2005) 199–204.
- [140] D. Gomes, S.P. Nunes, K-V. Peinemann, *J. Membr. Sci* 246 (2005) 13–25.
- [141] a) J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, M. Musameh, *Anal. Chem.* 76 (2004) 298–302.
- b) S. Sotiropoulou, V. Gavalas, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Biosens. Bioelectron.*18 (2003) 211–215.
- c) K. Glynou, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos, V. Syriopoulou, *Anal Chem.* 75 (2003) 4155–4160.
- d) J. Park, S. Kurosawa, J. Watanabe, K. Ishihara, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2649–2655.
- e) V. Bavastrello, E. Stura, S. Carrara, V. Erokhin, C. Nicolini, *Sensor Actuators B* 98 (2004) 247–253.
- f) H.J. Haick, *D. Phys, Appl. Phys.* 40 (2007) 7173–7186.

- [142] a) M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4788.  
 b) A. Merkoci, *Microchim. Acta* 152 (2006) 157.  
 c) M. Valcárcel, B.M. Simonet, S. Cárdenas, B. Suárez, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1783.  
 d) M. Trojanowicz, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 480.
- [143] a) W. Zhang, Y. Xie, X. Ai, F. Wan, J. Wang, L. Jin, J. Jin, *J. Chromatogr. B* 791 (2003) 217.  
 b) W. Zhang, F. Wan, Y. Xie, J. Gu, J. Wang, K. Yamamoto, L. Jin, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 207.  
 c) X. N. Cao, J.H. Li, H.H. Xu, J.R. Zhan, L. Lin, K. Yamamoto, L.T. Jin, *Chromatographia* 59 (2004) 167.  
 d) J. Xu, Y. Wang, Y. Xian, L. Jin, K. Tanaka, *Talanta* 60 (2003) 1123.  
 e) J. M. Xu, Y.P. Wang, Y.Z. Xian, L.T. Jin, *Chem. Res. Chin. Univ.* 20 (2004) 529.
- [144] a) A. Srivastava, O.N. Srivastava, S. Talapatra, R. Vajtai, P.M. Ajayan, *Nat. Mater.* 3 (2004) 610.  
 b) M. Majumder, N. Chopra, R. Andrews, B.J. Hinds, *Nature* 438 (2005) 44.  
 c) P. Nednoor, N. Chopra, V. Gavalas, L.G. Bachas, B.J. Hinds, *Chem. Mater.* 17 (2005) 3595.  
 d) F. Peng, C. Hu, Z. Jiang, *J. Membr. Sci.* 297 (2007) 236.  
 e) O. Sae-Khow, S. Mitra, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 3713.
- [145] C. Basheer, A.A. Alnedhary, B.S.M. Rao, S. Valliyaveetil, H.K. Lee, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2853.
- [146] Y. Li, Y. Chen, R. Xiang, D. Ciuparu, L.D. Pfefferle, C. Horváth, J.A. Wilkins, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1398
- [147] a) Q.L. Li, D.X. Yuan, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 203.  
 b) M. Karwa, S. Mitra, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2064.  
 c) M. Stadermann, A.D. McBrady, B. Dick, V.R. Reid, A. Noy, R.E. Synovec, O. Bakajin, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5639.  
 d) L.M. Yuan, C.X. Ren, L. Li, P. Ai, Z.H. Yan, M. Zi, Z.Y. Li, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6384.
- [148] a) Z. Wang, G. Luo, J. Chen, S. Xiao, Y. Wang, *Electrophoresis* 24 (2003) 4181.  
 b) Y. Moliner-Martínez, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 28 (2007) 2573.  
 c) B. Suárez, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 28 (2007) 1714.



- d) Y. Moliner, S. Cárdenas, B.M. Simonet, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 30 (2009) 169.
- e) Y. Moliner-Martínez, M. Barrios, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 128.
- f) X. Xiong, J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, J.R. Delanghe, X. Shen, Y. Yang, *Electrophoresis* 27 (2006) 3243.
- [149] L. Sombra, Y. Moliner-Martínez, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 29 (2008) 3850.
- [150] a) Y. Gholipour, H. Nonami, R. Erra-Balsells, *Anal. Biochem.* 383 (2008) 159.
- b) M.V. Ugarov, T. Egan, D.V. Khabashesku, J.A. Schultz, H. Peng, V.N. Khabashesku, H. Furutani, K.S. Prather, H.W.J. Wang, S.N. Jackson, A.S. Woods, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6734.
- c) S. Xu, Y. Li, H. Zhou, J. Qiu, Z. Guo, B. Guo, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6191.
- d) W.T. Jia, H.X. Wu, H.J. Lu, R.F. Cai, P.Y. Yang, *Acta. Chim. Sin.* 66 (2008) 1681.
- e) C.H. Wang, J. Li, S.J. Yao, Y.L. Guo, X.H. Xia, *Anal. Chim. Acta* 604 (2007) 158.
- f) S. Ren, L. Zhang, Z. Cheng, Y. Guo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 333.
- [151] R. Q. Long, R.T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2058.
- [152] a) X. Liu, Y. Ji, Y. Zhang, H. Zhang, M. Liu, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 10.
- b) M. A. Salam, R. Burk, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1060.
- c) M. Jiménez-Soto, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5626.
- d) S. Zhu, W. Niu, H. Li, S. Han, G. Xu, *Talanta* 79 (2009) 1441.
- e) Q. Li, X. Wang, D. Yuan, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1305.
- f) W. Du, F. Zhao, B. Zeng, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3751.
- g) O. Sae-Khow, S. Mitra, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2270.
- h) Q. L. Li, D.X. Yuan, Q.M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 283.
- i) A.H. El-Sheikh, J.A. Sweileh, Y.S. Al-Degs, A.A. Insisi, N. Al-Rabady, *Talanta* 74 (2008) 1675.
- j) Y.S. Al-Degs, M.A. Al-Ghouti, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 88 (2008) 487.
- k) Q.X. Zhou, G.H. Xie, J.P. Xiao, W.D. Wang, Y.J. Ding, *Chin. Chem. Lett.* 19 (2008) 95.
- [153] L. M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 33.
- [154] G. Min, S. Wang, H. Zhu, G. Fang, Y. Zhang, *Sci. Total Environ.* 396 (2008) 79.

- [155] a) Yunhe Qu, Qian Sun, Fei Xiao, Guoyue Shi, Litong Jin, *Bioelectrochemistry* 77 (2010) 139-144
- b) D. Du, A. M. Asiri, J. Wang, Y. Lin, *Nanotechnology Applications for Clean Water* (2014) 47-62
- c) S. Li, Y. Gong, Y. Yang, C. He, L. Hu, L. Zhu, L. Sun, D. Shu, *Chemical Engineering Journal* 260 (2015) 231-239.
- d) X-Y. Song, Y-P. Shi, J. Chen, *Food Chemistry* 139 (2013) 246-252.
- e) Y-Y. Zhang, M. A. Arugula, M. Wales, J. Wild, A. L. Simonian, *Biosensors and Bioelectronics, In Press*, Available online 22 August 2014 DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.036
- [156] a) K. S. Hasheminasab, A. R. Fakhari, *Analytica Chimica Acta* 767 (2013) 75-80
- b) H. Karimi-Maleh, F. Tahernejad-Javazmi, A. A. Ensafi, R. Moradi, S. Mallakpour, H. Beitollahi, *Biosensors and Bioelectronics* 60 (2014) 1-7.
- c) U. Gianfranco Spizzirri, S. Hampel, G. Cirillo, F. P. Nicoletta, A. Hassan, O. Vittorio, N. Picci, F. Iemma, *International Journal of Pharmaceutics* 448 (2013) 115-122.
- d) M. Foldvari, M. Bagonluri, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 4(2008) 183-200
- e) A. O. Biying, K. T. Yuanting, N. S. Hosmane, Z. Yinghuai, *J. Organometallic Chemistry* 747 (2013) 184-188.
- [157] a) Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, Q. Zhou, *Anal. Chem* 75 (2003) 2517.
- b) H.Y. Niu, Y.Q. Cai, Y.L. Shi, F.S. Wei, J.M. Liu, G.B. Jiang, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 927
- [158] Y. Q. Cai, Y.E. Cai, S.F. Mou, Y.Q. Lu, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 245.
- [159] Q. L. Li, D.X. Yuan, Q.M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 283.
- [160] G. Liu, J. Wang, Y. Zhu, X. Zhang, *Anal. Lett.* 37 (2004) 3085.
- [161] C. S. Pan, S.Y. Xu, H.F. Zou, Z. Guo, Y. Zhang, B. Guo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 263.
- [162] J.X. Wang, D.Q. Jiang, Z.Y. Gu, X.P. Yan, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 8
- [163] a) W. Zhang, Y. Sun, C. Wu, J. Xing, J. Li, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2912.
- b) B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, M. Gallego, *Talanta* 79 (2009) 613.
- c) R. Jiang, F. Zhu, T. Luan, Y. Tong, H. Liu, G. Ouyang, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4641.1
- [164] a) Z. Guan, Y. Huang, W. Wang, *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 225.
- b) X.Y. Liu, Y.S. Ji, H.X. Zhang, M.C. Liu, *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 10.
- [165] G. Z. Fang, J.X. He, S. Wang, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 12.

- [166] B. Suárez, B. Santos, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 127.
- [167] B. Suárez, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 203.
- [168] a) Q. Zhou, W. Wang, J. Xiao, J. Wang, G. Liu, Q. Shi, G. Guo, *Microchim. Acta* 152 (2006) 215.  
 b) Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 152.  
 c) M. Biesaga, K. Pyrzynska, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2241.  
 d) A.H. El-Sheikh, A.A. Insisi, J.A. Sweileh, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 25.  
 e) Q. Zhou, J. Xiao, Y. Ding, *Anal. Chim. Acta* 602 (2007) 223.  
 f) Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, *Microchim. Acta* 157 (2007) 93.
- [169] S. López-Feria, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7346.
- [170] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1139.
- [171] a) Z. Du, Y.L. Yu, X.W. Chen, J.H. Wang, *Chem-Eur. J.* 13 (2007) 9679.  
 b) Z. Du, Y.L. Yu, J.H. Wang, *Macromol. Biosci.* 9 (2009) 55.
- [172] Q. Wu, C. Wang, Z. Liu, C. Wu, X. Zeng, J. Wen, Z. Wang, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5504.
- [173] D. Du, M. Wang, J. Zhang, J. Cai, H. Tu, A. Zhang, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 85.
- [174] V. Pichon, *Techniques de l'ingénieur* P1420 (2006).
- [175] C.F. Poole, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 362.
- [176] R.E. Majors, *LCGC Europe* December (2001).
- [177] [http://static.coleparmer.com/small\\_images/1093700.jpg](http://static.coleparmer.com/small_images/1093700.jpg),
- [178] <http://www.restek.com/restek/images/standard/26207phsospes.jpg>,
- [179] E.M. Thurman, K. Snavelly, *trends in analytical chemistry* 19 (2000) 18.
- [180] <http://www.sigmaaldrich.com/prodimages/p/p000100.jpg>,
- [181] <http://www.waters.com/webassets/other/catalogimages/sepplates.jpg>,
- [182] M.-C. Hennion, *Journal of Chromatography, A* 856 (1999) 3.
- [183] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L.d. Alda, D. Barceló, *Journal of Chromatography, A* 1152 (2007) 97.
- [184] R. Denooz , C. Charlier. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 864 (2008) 161–167.

- [185] D. Cattaneo, F. Maggiolo, D. Ripamonti, N. Perico . *J Chromatogr Sci.*46 (2008) 485–489.
- [186] M. Subramanian, AK. Birnbaum , RP. Remmel. *Ther Drug Monit.*30 (2008) 347–356.
- [187] J. Dénes, M. Katona, A. Hosszú, N. Czuczy, Z. Takáts. *Anal Chem.* 81 (2009) 1669–1675.
- [188] B. Streeb, B. Cahay, R. Klinkenberg. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877 (2009) 2290–2300.
- [189] L. Nováková, H. Vlcková, D. Satínský, P. Sadílek, D. Solichová, M. Bláha, V. Bláha, P. Solich. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*877 (2009) 2093–2103.
- [190] Y. Takashina, T. Naito, Y. Mino, Y. Kagawa, J. Kawakami. *J Clin Pharm Ther.*34 (2009) 523–529.
- [191] A. Musenga, R. Mandrioli, I. Comin, E. Kenndler, MA. Raggi. *Electrophoresis.*28 (2007) 3535–3541.
- [192] M. Juhascik, AJ Jenkins. *J Chromatogr Sci.*47 (2009) 553–557.
- [193] R. Dams, MA. Huestis, WE. Lambert, CM. Murphy. *J Am Soc Mass Spectrom.* 14 (2003) 1290–1294.
- [194] AA. Philipp, DK. Wissenbach, SW. Zoerntlein, ON. Klein, J. Kanogunthornrat, HH. Maurer. *J Mass Spectrom.* 44 (2009) 1249–1261.
- [195] LD. Williams, LS. Von Tungeln, FA. Beland, DR. Doerge. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*798 (2003)55–62.
- [196] AH. Ewald, FT. Peters, M. Weise, HH. Maurer, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 824(2005)123–131.
- [197] FT. Musuamba, V. Di Fazio, R. Vanbinst, P. Wallemacq, *Ther Drug Monit.*31 (2009) 110–115.
- [198] JO. Svensson, M. Andersson, E. Gustavsson, O. Beck, *J Anal Toxicol.* 31 (2007) 81–86.
- [199] E. Cognard, S. Rudaz, S. Bouchonnet, C. Staub, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 826 (2005) 17–25.
- [200] YH. Wu, KL. Lin, SC. Chen, YZ. Chang, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 870 (2008) 192–202.
- [201] R. Cordero, S. Paterson, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 850 (2007) 423–431.
- [202] V. Cirimele, P. Kintz, V. Dumestre, JP. Goullé, B. Ludes, *Forensic Sci Int.* 107 (2000) 381–388.

- [203] (a) I. Tarcomnicu, AL. van Nuijs, K. Aerts, M. De Doncker, A. Covaci, H. Neels, *Forensic Sci Int.* 196 (2010) 121–127.
- (b) H. Kharbouche, F. Sporkert, S. Troxler, M. Augsburger, P. Mangin, C. Staub, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877 (2009) 2337–2343.
- (c) L. Morini, A. Zucchella, A. Polettini, L. Politi, A. Groppi. *Forensic Sci Int.* 198 (2009) 198: 23–27.
- (d) R. Paul, R. Kingston, L. Tsanaclis, A. Berry, A. Guwy. *Forensic Sci Int.* 21 (2008) 176: 82–86.
- [204] KS. Kalasinsky, MM. Dixon, GA. Schmunk, SJ. Kish, *J Forensic Sci.* 46 (2001) 728–730.
- [205] P. Kintz, J. Evans, M. Villain, C. Chatterton, V. Cirimele, *J Anal Toxicol.* 33 (2009) 553–556.
- [206] Q.L. Li, X.F. Wang, D.X. Yuan, *J. Environ. Monit.* 11 (2009) 439.
- [207] H. Katsumata, T. Matsumoto, S. Kaneco, T. Suzuki, K. Ohta, *J. Microchem.* 88 (2008) 82.
- [208] C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 907.
- [209] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122.
- [210] (a) S. D. Richardson, T.A. Ternes, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3807.
- (b) D.W. Kolpin, M. Skopec, M.T. Meyer, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, *Sci. Total Environ.* 328 (2004) 119.
- (c) T. Herberer, *Toxicol. Lett.* 131 (2002) 5.
- (d) D. Calamari, E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1241.
- (e) S.T. Glassmeyer, E.T. Furlong, D.W. Kolpin, J.D. Cahill, S.D. Zaugg, S.L. Werner, M.T. Meyer, D.D. Kryak, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5157.
- (f) N.M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8220.
- (g) N.M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 101.
- (h) D. Ashton, M. Hilton, K.V. Thomas, *Sci. Total Environ.* 333 (2004) 167.
- (i) P. H. Roberts, K.V. Thomas, *Sci. Total Environ.* 356 (2006) 143.
- (j) M.D. Hernando, M. Mezcua, A.R. Fernandez-Alba, D. Barceló, *Talanta* 69 (2006) 334.
- (k) Review of the State of Knowledge of Municipal Effluent Science and Research, Report Prepared by Hydromantis Inc. Minnow Environmental Inc., University of Waterloo, Department of Civil Engineering, May 2005.

- [211] J. Radjenović, A. Jelić, M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1685.
- [212] J. Martin, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1760.
- [213] (a) T.A. Ternes, M. Bonerz, N. Herrmann, D. Löffler, E. Keller, B.B. Lacida, A.C. Alder, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 213.
- (b) J. Dobor, M. Varga, J. Yao, H. Chen, G. Palko, G. Zaray, *J. Microchem.* 94 (2010) 36.
- (c) A. Jelic, M. Petrovic, D. Barcelo, *Talanta* 80 (2009) 363.
- (d) L. Barron, J. Tobin, B. Paull, *J. Environ. Monit.* 10 (2008) 353.
- [214] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Lavoisier*, (1991).
- [215] T. Kovalczuk, M. Jech, J. Poustka, J. Hajslova, *Anal. Chim. Acta*, 577 (2006) 8-17.
- [216] Y. Picó, C. Blasco, G. Font, *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 45-58.
- [217] C. Hongenboom, M. P. Hofman, S. J. Kok, W. M. A. Niessen, U. A. Th. Brinkman, *J. Chrom. A*. 892 (2000) 379-390.
- [218] J. Hajslová, J. Zrostíková, *J. Chrom. A*, 1000 (2003) 181-1
- [219] Y. picó, G. Front, J. C. Moltó, J. Mañes, *J. Chrom. A*, 882 (2000) 153-173.
- [220] M. Careri, A. Mangia, M. Musci, *J. Chrom. A*, 727 (1996) 153-184.
- [221] L. G. Freitas, C.W. Götz, M. Ruff, H.P. Singer, S. R. Müller, *J. Chrom. A*, 1028 (2004) 277-286.
- [222] J. Sherma, *J. AOAC International*, 80 (1997) 283.
- [223] F. E. Ahmed, *Trends in Anal. Chem* 20 (2001) 649-661.
- [224] E. Hogendoorn, P. van Zoonen, *J. Chrom. A*, 892 (2000) 435-453.
- [225] I. R. Pizzutti, A. de Kok, R. Zanella, M. B. Adaime, M. Hiemstra, C. Wickert, O. D. Prestes, *J. Chrom. A* 1142 (2007) 123-136.
- [226] C. Aguilar, F. Borrull, M. R. Marcé, *J. Chrom. A*, 805 (1998) 127-135.
- [227] J. Slobodník, A. C. Hogenboom, J. J. Vreuls, J. A. Rontree, B. L. M. van Baar, W. M. A. Niessen, U. A. Th. Brinkman, *J. Chrom. A* 741 (1996) 59-74.
- [228] J. Slobodník, B. L. M. van Baar, U. A. Th. Brinkman, *J. Chrom. A* 703 (1995) 81-121.
- [229] A. Lutz, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, *Mass Spectrom. Rev* 25 (2006) 838-865.
- [230] a) C. Lesueur, P. Knittel, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Food Control*, 19 (2008) 906-914.
- b) G. F. Pang, Y. M. Liu, C. L. Fan, J. J. Zhang, Y. Z. Cao, M. Li X, Y. Li Z, P. Wu Y, T. Guo T, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1366-1408.

- c) J. Fillion, F. Sauvé, J. Selwyn, *J. AOAC International* 83 (2000) 698.
- d) A. Chaves, D. Shea, D. Danehower, *Chemosphere* 71 (2008) 629-638.
- f) C. Ferrer, M. J. Gómez, J. F. García-Reyes, I. Ferrer, E. M. Thurman, A. R. Fernández-Alba, *J. Chrom. A* 1069 (2005) 183-194.
- [231] R. Botter, G. Bouchoux, *Techniques de l'ingénieur, Spectrométrie de masse*.
- [232] E. D. Hoffmann, J. Charrette, V. Stroobant, *Spectrométrie de masse, Cours et exercices corrigés, Dunod. (1999)*.
- [233] P. G. M. Kienhuis, R. B. Geerdink, *Trends in Anal. Chem.* 19 (2000) 249-259
- [234] M. Fernández, Y. Pico, J. Manes, *Chromatographia*, 54 (2001) 302-308.
- [235] J. P. Rauha, H. Vuorela, R. Kostianen, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 1269.
- [236] T. I. Kauppila, T. Kuورانne, E. C. Meurer, M. N. Eberlin, T. Tiaho, R. Kostianen, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5470-5479.
- [237] *TSQ general court.*
- [238] S. J. Gaskell, *J. Mass Spectrom* 32 (1997) 677-688.
- [239] a) M. S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 136 (1994) 167-180.  
 b) J. B. Fenn, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 4 (1993) 524-535.
- [240] *Manuel de cours dispensé par « Thermo Electron European Training Institute », TSQ Quantum Operations, Course Manual.*
- [241] E. M. Thurman, I. Ferrer, A. Fernandez-Alba, *Comprehensive Analytical Chemistry, Volume XLIII, Chapter 8 : LC-MS. I : Basic principles and technical aspects of LC-MS for pesticide analysis*
- [242] C. Soler, J. Mañes, Y. Picó, *J. Chrom. A*, 1067 (2005) 115-125.
- [243] a) A. C. Hogenboom, W. M. A. Niessen, D. Little, U. A. T. Brinkman, *Rap. Comm. Mass Spec* 13 (1999) 125-133.  
 b) I. Ferrer, J. F. García-Reyes, M. Mezcua, E. M. Thurman, A. R. Fernández-Alba, *J. Chrom. A* 1082 (2005) 81-90.
- [244] a) J. F. García-Reyes, I. Ferrer, E. M. Thurman, A. Molina-Díaz, A. R. Fernández-Alba, *Rap. Comm. Mass Spec* 19 (2005) 2780-2788.  
 b) E. M. Thurman, I. Ferrer, A. R. Fernández-Alba, *J. Chrom. A* 1067 (2005) 127-134
- [245] F. Hernandez, M. Ibanez, J. V. Sancho, O. J. Pozo, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4349-4357.
- [246] O. Núñez, E. Moyano, M. T. Galceran, *Anal. Chim. Acta* 525 (2004) 183-190.
- [247] T. Goto, Y. Ito, S. Yamada, H. Matsumoto, H. Oka, H. Nagase, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 225-232.

- [248] "CD-ROM Agilent Technologies, LC/MS Applications and Abstracts, LC/MS basis"
- [249] D. Bendz, N.A. Paxéus, T.R. Ginn, F.J. Loge, *J. Hazard. Mater.* 122 (2005) 195.
- [250] S. L. Fraker, G.R. Smith, *Environ. Toxicol.* 19 (2004) 250-358.
- [251] C. M. Flaherty, S.I. Dodson, *Chemosphere* 61 (2005) 200.
- [252] M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, R. Tauler, D. Barceló, *Talanta* 65 (2005)
- [253] F. Pomati, S. Castiglioni, E. Zuccato, R. Fanelli, D. Vigetti, C. Rossetti, D. Calamari, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2442.
- [254] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1202.
- [255] Z. L. Zhang, J.L. Zhou, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 205
- [256] H. J. Stan, T. Heberer, *Analysis* 25 (1997) M20.
- [257] T. A. Ternes, *Water Res.* 32 (1998) 3245.
- [258] S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 225.
- [259] M. Gros, T.M. Pizzolato, M. Petrovic, M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 374.
- [260] M. Packer, *Am. J. Hypertens.* 11 (1998) 23S.
- [261] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 132.
- [262] M. Farré, M. Gros, B. Hernández, M. Petrovic, P. Hancock, D. Barceló, *Rapid Commun. Mass Spectrosc.* 22 (2008) 41.
- [263] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 104-12.
- [264] R. Q. Long, R.T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2058.
- [265] C. S. Lu, Y.L. Chung, K.F. Chang, *Water Res.* 39 (2005) 1183.
- [266] H. Yan, A. Gong, H.S. He, J. Zhou, Y.X. Wei, L. Lv, *Chemosphere* 62 (2006) 142.
- [267] X. J. Peng, Y.H. Li, Z.K. Luan, Z.C. Di, H.Y. Wang, B.H. Tian, Z.P. Jia, *Chem. Phys. Lett.* 376 (2003) 154.
- [268] Z. C. Chen, L.S. Zhang, Y.W. Tang, Z.J. Jia, *Appl. Surf. Sci.* 252 (2006) 2933.
- [269] Y. Li, Y. Chen, R. Xiang, D. Ciuparu, L.D. Pfefferle, C. Horwath, J.A. Wilkins, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1398.
- [270] C. Saridara, S. Mitra, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7094.
- [271] Q. L. Li, D.X. Yuan, Q.M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 283.
- [272] Q. L. Li, D.X. Yuan, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 203.
- [273] Q. X. Zhou, W.D. Wang, J.P. Xiao, *Anal. Chim. Acta* 559 (2006) 200.
- [274] Q. X. Zhou, Y.J. Ding, J.P. Xiao, *Chromatographia* 65 (2006) 25.
- [275] Y. Q. Cai, G.B. Jiang, J.F. Liu, Q.X. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 149.

- [276] Y. Q. Cai, G.B. Jiang, J.F. Liu, Q.X. Zhou, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2517.
- [277] J. X. Wang, D.Q. Jiang, Z.Y. Gu, X.P. Yan, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 8.
- [278] Environmental Protection Agency, The Estimation Programs Interface (EPI) Suite TM Version 4.1 (2012). <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.htm>
- [279] P. Galloa, S. Fabbrocino, G. Dowlingb, M. Salini, M. Fiori, G. Perretta, L. Serpea. *J.Chromatography A*, 1217 (2010) 2832–2839
- [280] K. Pyrzynska, *Chemosphere* 83 (2011) 1407.
- [281] L.M. Ravelo-Pérez, A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2618-2641
- [282] H. Niu, Y. Cai, Y. Shi, F. Wei, J. Liu, S. Mou, G. Jiang, *Anal. Chim. Acta* 594 (2007) 81.
- [283] G. Morales-Cid, A. Fekete, B.M. Simonet, R. Lehmann, S. Cárdenas, X. Zhang, M.Valcárcel, P. Schmitt-Kopplin, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2743.
- [284] X. D. Du, Y.L. Wu, H.J. Yang, T. Yang, *J. Chromatogr. A* 1260 (2012) 25.
- [285] H. Katsumata, T. Matsumoto, S. Kaneco, T. Suzuki, K. Ohta, *Microchem. J.* 88 (2008) 82.
- [286] J. Carpinteiro, J.B. Quintana, E. Martínez, I. Rodríguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 63.
- [287] H. Bagheri, H. Piri-Moghadam, M. Naderi, *TRAC-Trend Anal. Chem.* 34 (2012) 126.
- [288] G. Fang, X. Wang, S. Wang, *Chromatographia* 72 (2010) 403.
- [289] Commission Decision (2002/657/EC) of 12th August 2002, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities* L221, Brussels, Belgium, 8–36.
- [290] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.* 65 (1993) 972-986.
- [291] J. P. Antignac, K. de Wash, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, B. Le Bizec, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 129.
- [292] D. L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam (1997) 190, 209, 436.
- [293] M. J. Martínez Bueno, M. J. Gómez, S. Herrera, M. D. Hernando, A. Agüera, A. R. Fernández-Alba, *Environ. Pollut.* 164 (2012) 267.
- [294] V. Gabet-Giraud, C. Miege, J.M. Choubert, S. Martin Ruel, M. Coquery, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 4257.

- [295] a) J. D. Cahill, E.T. Furlong, M.R. Burkhardt, D. Kolpin, L.G. Anderson, *J. Chromatogr. A* 1041(2004) 171.
- b) A.L.N. van Nuijs, I. Tarcomnicu, W. Simons, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2211.
- [296] a) N. A. Al-Odaini, M.P. Zakaria, M.I. Yaziz, S. Surif, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6791.
- b) M. Martínez Galera, P. Parrilla Vázquez, M.M. Parrilla Vázquez, M.D. Gil García, C. Ferre Amate, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1796.
- c) A. A. Salem, I. A. Wasfi, S.S. Al-Nassibi, *J. Chromatogr. B* 908 (2012) 27.
- [297] U.S. Environmental Protection Agency. Pesticide Home <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>.
- [298] J. R. Roberts, J. R. Reigart, Organophosphate Insecticides, in: Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 6th Ed., U. S. Environmental Protection Agency (2013) pp. 43-55. [http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp\\_ch5.pdf](http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch5.pdf)
- [299] H. H. Oruc, *Fungicides and their effects on animals* (2010) pp. 349-362. [http://cdn.intechopen.com/pdfs/12394/InTech-fungicides\\_and\\_their\\_effects\\_on\\_animals.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/12394/InTech-fungicides_and_their_effects_on_animals.pdf)
- [300] EU Council, *Directive on the Quality of Water Intended for Human Consumption*, 98/83/CE, European Union, Brussels, (1998)
- [301] K. Pyrzynska, *Chemosphere* 83 (2011) 1407-1413
- [302] Q. Zhou, W. Wang, J. Xiao, *Anal. Chim. Acta* 559 (2006) 200–206
- [303] Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, *Anal. Sci.* 23 (2007) 189-192
- [304] H. Niu, Y. Shi, Y. Cai, F. Wei, G. Jiang, *Microchim. Acta* 164 (2008) 431–438
- [305] Q. Zhou, Y. Ding, J. Xiao, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1520–1525
- [306] Q. Li, X. Wang, D. Yuan, *J. Environ. Monit.* 11 (2009) 439–444
- [307] K. Pyrzynska, A. Stafiej, M. Biesaga, *Microchim. Acta* 159 (2007) 293–298
- [308] S. Wang, P. Zhao, G. Min, G. Fang, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 166–171
- [309] M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, L.M. Ravelo-Pérez, M.A. Rodríguez-Delgado, *Electrophoresis* 29 (2008) 4412–4421
- [310] M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodríguez-Delgado, *Anal. Chim. Acta* 6647 (2009) 167–178
- [311] S. López-Feria, S. Cárdenas, M. Valcárcel, M., *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7346–7350

- [312] P. Zhao, L. Wang, L. Zhou, F. Zhang, S. Kang, C. Pan, *J. Chromatogr. A* (2012) 17-251
- [313] F. J. Schenck, J.E.Hobbs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (New York: Springer) 73 (1) (2004) 24–30.
- [314] *Pesticide Properties Database (PPDB)*, Agriculture and Environment Research Unit (AERU). University of Hertfordshire. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/projects/ppdb/>
- [315] S. Dahane, M.D. Gil García, M.J. Martínez Bueno, A. Uclés Moreno, M. Martínez Galera, A. Derdour, *J. Chromatogr. A* 1297 (2013) 17-28
- [316] H. Bagheri, Z. Ayazi, A. Aghakhani, *Anal. Chim. Acta* 683 (2011) 212–220.
- [317] Z. L. Zhang, J.L. Zhou, *J. Chromatogr. A*, 1154 (2007) 205–213.
- [318] R. Carabias- Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernandez, F.J. Sanchez-San Roman, M.G. Prado Flores, *J. Chromatogr. A* 950 (2002) 157.
- [319] L. Pareja, M.J. Martinez-Bueno, V. Cesio, H. Heinzen, A.R. Fernandez-Alba, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4790-4798
- [320] Commission Decision 2002/657/EC. *Off. J. Eur. Commun.* 1.221 (2002)8.
- [321] M. J. Martínez Bueno, A. Agüera, M.D. Hernando Guil, M.J. Gómez, A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5995-6002.
- [322] D. L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, *J.Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam, (1997), pp. 190, 209, 436.
- [323] X. Gwang, S. Tao, B. Xing, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 6214–6219
- [324] L. B. McCusker, F. Liebau, G. Engelhardt, *Pure and Applied Chemistry*, 73 (2001) 381-394.
- [325] A. Corma, *Chem.Rev.* 97(1997) 2373-2419.
- [326] K. K. Unger, D. Kumar, M. Grün, G. Buchel, S. Ludtke, T. Adam, K. Schumacher, S. Renker, *J.Chrom A*.892 (2000) 47–55.
- [327] J. C. Vartuli, K. D. Schmitt, C. T. Kresge, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, S. B. McCullen, S. D. Hellring, J. S. Beck, J. L. Schlenker, D. H. Olson, E. W. Sheppardt, *Chemistry of Materials*.6 (1994) 2317-2326.
- [328] J.S. Beck, J.C. Vartuli, W.J. Roth, M.E. Leonowicz, C.T. Kresge, K.D. Schmitt, C.T.-W. Chu, D.H. Olson, E.E. Sheppard, S.B. McCullen, J.B. Higgins, J.L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.*114 (1992) 10834.
- [329] T. Sano, K. Doi, H. Hagimoto, Z. Wang, T. Uozumi, K. Soga, *Chem. Commun.* 8 (1999)733.

- [330] C. G. Wu, T. Bein, *Science*. 266 **(1994)**1013.
- [331] S. Kim, J. Ida, V. V. Guliants, Y. S. Lin, *Int. J. Environ. Technol. Manage.* 4 **(2004)** 21.
- [332] C. Constantin, V. Parvulescu, A. Bujor, G. Popescu, B. L. Su, *J. Mol. Catal. A*. 208 **(2004)** 245.
- [333] X. Xu, C. Song, J. M. Andresen, B. G. Miller, A. W. Scaroni, *Int. J. Environ. Technol. Manage.* 4 **(2004)** 32
- [334] A. M. van der Heijden, T. C. Lee, F. van Rantwijk, H. van Bekkum, *Carbohydr. Res.* 337 **(2002)**1993.
- [335] R. Schmidt, M. Stöcker, E. Hansen, D. Akporiaye, O.H. Ellestad, *Microporous Mater.* 3**(1995)**443.
- [336] P. J. Branton, P.G. Hall, K.S.W. Sing, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **(1993)** 1257-1258.
- [337] Q. Huo, D.I. Margolese, U. Ciesla, D.G. Demuth, P. Feng, T.E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi, B. F. Chmelka, F. Schüth, G.D. Stucky, *Chem. Mater.* 6 **(1994)** 1176- 1191.
- [338] D. M. Antonelli, J.Y. Ying, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*18 **(1995)** 34.
- [339] M. Grün, I. Lauer, K.K. Unger, *Adv. Mat.* 9 **(1997)** 254.
- [340] K. Schumacher, M. Grün, N. v. Döhren, K.K. Unger, poster presentation, 2nd SFC User Meeting, Siegen, October **(1997)**.
- [341] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J .S. Beck. *Nature*, 359 **(1992)** 710-712
- [342] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Retroff, F. Schuth, G. D. Stucky. *Nature* 368 **(1994)** 317-320
- [343] M. Grün, K. Klaus Unger , A. Matsumoto , K. Tsutsumi, *J. Microporous and Mesoporous Materials* 27 **(1999)** 207–216.
- [345] O. Franke, G. Schulz-Ekloff, J. Rathousky, J. Stárek and A. Zukal. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, **(1993)**724-725.
- [346] P. I. Ravikovitch, S. C. O. Domhnaill, A.V. Neimark, F. Schüth and K.K. Unger. *Langmuir* 11**(1995)**4765-4772.
- [347] a) B. Jiménez, J.C. Moltó, G. Font, *Chromatogr* 41 **(1995)** 318.  
 b) B. Jiménez, J.C. Moltó, G. Font, *LC.GC* 14 **(1996)** 968  
 c) S. Wang, M.J. Santos-Delgado, L.M. Polo-Díez, *Chem. Anal.* 14 **(1995)** 84.
- [348] J. C. A. De Wuilloud, R.G. Wuilloud, B.B.M. Sadi, J. A. Caruso. *Analyst*, 128 **(2003)** 453.

- [349] N. Li, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A*. 921 (2001) 255.
- [350] E. Achterberg, C. Braungart, R. Sandford, P. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 440 (2001) 27.
- [351] C. Zwiener, F.H. Frimmel, *Anal. Bioanal. Chem.* 378(2004) 862.
- [352] M. J. Avena, A.W.P. Vermeer, L.K. Koopal, *Colloids Surf.* 151 (1999) 213.
- [353] H.T. Lin, M.C. Wang, G.-C. Li, *Chemosphere* 56 (2004) 1105.
- [354] R. Kostianen, T. Kauppila, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 685
- [355] A. Garrido Frenich, J. L.Martinez Vidal, J.L. Fernandez Moreno, R. Romero Gonzalez, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4798–4808.
- [356] I. R. Pizzutti, A. deKok, M.Hiemstra, C.Wickert, O.D.Prestes, *J.Chromatogr.A* 1216 (2009) 4539–4552.

---

*Annexe*

---

## **I. Introduction**

Il existe plusieurs définitions et façons de calculer les différents paramètres liés à la validation d'une méthode. À l'intérieur du suivi de la qualité des activités de laboratoire, il devient essentiel d'uniformiser ces définitions ainsi que les méthodes de calcul utilisées.

La validation d'une méthode d'analyse entraîne la détermination de plusieurs paramètres : la limite de détection d'une méthode (LDM), la limite de quantification d'une méthode (LQM), la limite de linéarité (LL), la fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité), la justesse, la sensibilité, et finalement, la récupération. L'annexe I illustre les formules de calcul qui sont utilisées pour la détermination des différents paramètres et l'annexe II les représente graphiquement. Quelques paramètres de la validation peuvent ne pas s'appliquer à certaines méthodes.

## **II. Description d'une méthode d'analyse**

- ✓ Schéma général représentant les principales étapes d'une analyse
- ✓ Définir une méthode d'analyse consiste à décrire chacune de ses étapes, indissociables les unes des autres, en précisant pour chacune d'elles les opérations élémentaires qu'il faut réaliser
- ✓ Il existe de très nombreuses méthodes de mesure. Le choix de l'une d'entre elles va guider le choix de la méthode de traitement qui sera préalablement appliquée à l'échantillon analytique (= prise d'essai)

Le traitement de l'échantillon analytique constitue en règle générale l'étape clef de la méthode d'analyse : elle contient la majeure partie de l'erreur analytique et représente un facteur limitant en termes de rapidité et d'automatisation.

## **III. Performances et critères de choix d'une méthode d'analyse**

- Limites de détection et de quantification
- Justesse et fidélité (répétabilité) ; exactitude et reproductibilité
- Domaine de linéarité et sensibilité
- Robustesse
- Spécificité, rapidité et aptitude à l'automatisation
- Coût (investissement et fonctionnement).

#### **IV. Validation d'une méthode d'analyse**

1. Préparation d'un Echantillon de Référence Interne du Laboratoire (ERIL)
2. Estimer le biais
  - a. par rapport à une méthode de référence
  - b. par rapport à un échantillon de référence
  - c. au moyen d'une analyse inter-laboratoires
3. Eliminer le biais —> Recherche des causes d'erreurs
  - a. Eviter les erreurs liées à la réponse instrumentale
  - b. S'affranchir des effets de matrice : méthode des ajouts dosés et des dilutions
  - c. Optimiser la méthode de traitement de l'échantillon analytique.

#### ***Application***

ERIL + méthode validée —> mise en place d'un *contrôle interne de la qualité des mesures*, en construisant une carte de contrôle et en utilisant l'échantillon ERIL.

### **I. La validation de la méthode analytique**

#### ***III.1 La limite de détection d'une méthode (LDM)***

La limite de détection d'une méthode est la plus basse concentration pour un composé analysé dans une matrice réelle qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode complète, incluant les extractions chimiques et le prétraitement, produit un signal détectable avec une fiabilité définie statistiquement différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions.

La détermination de la LDM s'effectue selon les étapes suivantes :

L'estimation de la LDM;

L'établissement de la LDM;

L'évaluation du ratio de conformité.

### ***1.1 Estimation de la limite de détection d'une méthode (LDM)***

L'estimation de la LDM s'effectue selon l'une des façons suivantes :

- 1) La concentration indiquée dans la littérature pour une méthode équivalente;
- 2) La concentration correspondante à un rapport signal/bruit de 3:1 dans la matrice appropriée.
- 3) La concentration équivalente à 3 fois l'écart type d'un étalon à bas niveau dans un solvant approprié;
- 4) La concentration correspondante à la limite instrumentale de détection (LID).

La LID est la plus basse concentration d'un composé analysé dans l'eau « pure » ou dans un solvant approprié sans la présence de matrice qu'un instrument analytique puisse détecter avec une fiabilité définie. Cette fiabilité est statistiquement différente de la réponse du bruit de fond obtenu par l'instrument.

La limite instrumentale de détection est établie par l'addition du composé analysé dans l'eau « pure » ou dans le solvant approprié (solution étalon) de façon à obtenir une concentration finale du composé analysé correspondant à environ 5 fois la LID estimée. Cette solution est introduite directement dans le système instrumental pour l'analyse. Par la suite, l'écart type est calculé sur les 10 *réplicas* et la LID égale 3 fois l'écart type.

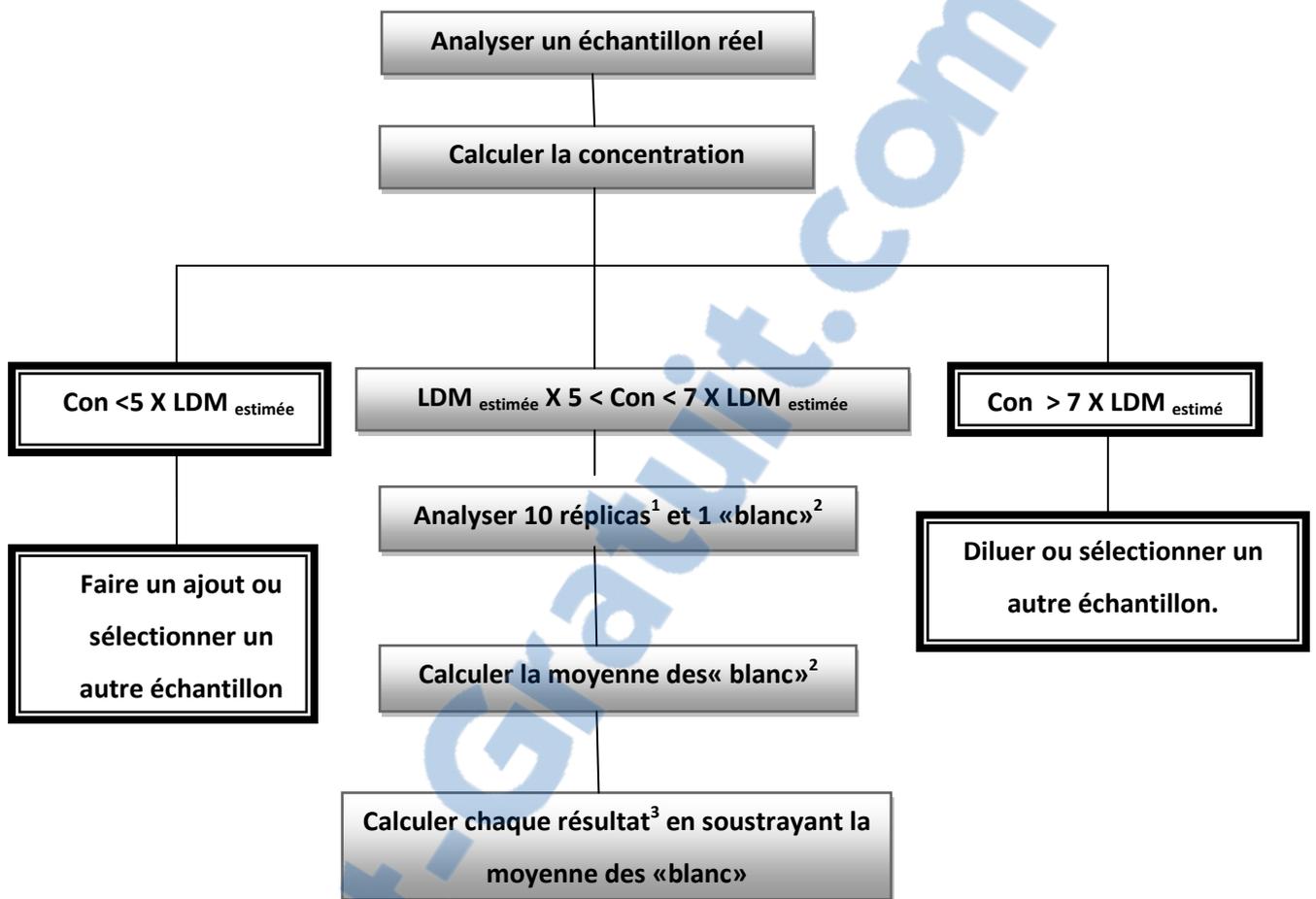
### ***1.2 Établissement de la limite de détection d'une méthode (LDM)***

Il existe deux façons de calculer la LDM :

- 1) sur une courte période à l'aide d'échantillons;
- 2) sur une longue période à l'aide de duplicata.

#### ***1.2.1 Sur une courte période à l'aide d'échantillons***

À partir de la limite de détection estimée (LDM estimée), procéder aux étapes suivantes :



- 1) Pour certains paramètres en chimie organique, il faut utiliser 10 échantillons identiques puisque l'analyse requiert quelquefois tout l'échantillon (exemple : huiles et graisses).
- 2) Si le blanc de méthode est nécessaire pour calculer la concentration du composé d'intérêt, utiliser alors le même nombre de blancs que de réplique.
- 3) Si un ou des résultats diffèrent grandement des autres valeurs, effectuer un test statistique de rejet reconnu de façon à éliminer les valeurs aberrantes. Reprendre les analyses de façon à obtenir 10 résultats valides.

À partir des résultats obtenus, calculer :

Moyenne arithmétique des répliques

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Écart type des *réplicas*

$$S_{(n)} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\bar{X} - x_i)^2}}{n - 1}$$

Où

$\bar{X}$ : Moyenne arithmétique d'une série de mesures;

$x_i$ : mesures individuelles;

$n$ : nombre de mesures;

$S$ : écart type d'une série de mesures.

### 1.2.2 *Sur une longue période à l'aide de duplicata*

Utiliser les résultats d'analyse des duplicata journaliers pour l'année en cours. La concentration des duplicata, dans une matrice enrichie ou une matrice naturelle selon le besoin, doit être entre 5 et 7 fois la limite de détection estimée.

À partir des différences entre duplicata, (40 paires au minimum doivent être utilisées) calculer la variance ( $S^2$ ) et l'écart type  $S$  :

Variance

$$S^2 = \frac{\sum d^2}{2K}$$

Ecart type

$$S = \sqrt{S^2}$$

Où

$d$  : différence entre les paires de duplicata;

$K$  : nombre de paires de duplicata;

$S$  : écart type des duplicata.

### 1.2.3 Méthode de calcul de la limite de détection d'une méthode (LDM)

$$LDM = 3 \times S$$

Où

LDM : limite de détection de la méthode;

$S$  : écart type des *réplicas*.

*Note : Lors de l'analyse d'échantillons, la LDM reportée doit tenir compte du facteur de dilution et de tous les chiffres significatifs appropriés.*

### 1.3 Méthode de calcul du ratio de conformité (R)

Le calcul du ratio de conformité nous permet de déterminer la validité d'une démarche pour l'établissement d'une limite de détection. En général, si le résultat du calcul pour un ratio R qui sert à l'établissement d'une limite de détection n'est pas supérieur à 4, il faut recommencer la procédure d'établissement de la limite de détection avec un échantillon qui a une concentration plus haute.

$$R = \frac{\bar{X}}{LDM_{calculée}} = \frac{\bar{X}}{3S}$$

Où

$R$  : ratio de conformité.

$\bar{X}$  : Moyenne arithmétique des  $n$  *réplicas*.

$S$  : écart type des  $n$  *réplicas*.

LDM : limite de détection de la méthode.

### 1.3.1 Interprétation de la valeur du ratio de conformité (R)

Si  $4 < R < 10$ ,

- La concentration utilisée est adéquate.

Si  $R < 4$ ,

- Ce ratio indique que la limite réelle de détection de la méthode est plus élevée que la limite de détection estimée lors des essais. Reprendre les essais en révisant la limite de détection estimée et la concentration de l'échantillon utilisé.

Si  $R > 10$ ,

- Ce ratio indique que la limite réelle de détection de la méthode est plus basse que la limite de détection estimée lors des essais.

*Note : Bien que la concentration de l'échantillon doive se situer entre 5 et 7 fois la LDM estimée, le ratio de conformité de la moyenne des 10 replica sur la LDM calculée peut être acceptable s'il est supérieur à 4.*

## III.2 LIMITE DE QUANTIFICATION D'UNE MÉTHODE (LQM)

La limite de quantification d'une méthode est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

C'est la concentration équivalente à 10 fois l'écart type obtenu lors de l'établissement de la LDM.

$$\text{LQM} = 10 \times s$$

Où

LQM : limite de quantification d'une méthode;

s : écart type.

*Note : Lors de l'analyse d'échantillons, les résultats d'analyse inférieurs à la limite de quantification doivent être interprétés en considérant que l'incertitude associée à la mesure est plus grande.*

### III.3 LIMITE DE LINÉARITÉ (LL)

La limite de linéarité est le plus haut niveau fiable de mesure qu'on puisse utiliser en tenant compte de tous les facteurs à considérer dans une méthode.

L'étendue de concentration des étalons qui se situe entre la LQM et la LL est la zone quantifiable utilisée dans une méthode d'analyse. Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,995 pour respecter le critère de la limite de linéarité.

### III.4 FIDÉLITÉ

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises ( $n = 10$  *replica*) dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répliquabilité, de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

### III.5 Répliquabilité

La répliquabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même appareil, même jour. La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0.975,n-1)} \times S_1}{\sqrt{n}}$$

Où  $S_1$  : écart type d'une série de mesures se référant à la répliquabilité.

### III.6 Répétabilité

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour. La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0.975;n-1)} \times S_2}{\sqrt{n}}$$

Où  $S_2$  : écart type d'une série de mesures se référant à la répétabilité.

### III.7 Reproductibilité

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour. La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0.975;n-1)} \times S_3}{\sqrt{n}}$$

Où  $S_3$  : écart type d'une série de mesures se référant à la reproductibilité.

### III.8 Justesse

La justesse à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur certifiée par un organisme reconnu et le résultat moyen qui serait obtenu en appliquant dix fois le procédé expérimental ( $n = 10$  *réplica*). La justesse se mesure, à un niveau donné de concentration, dans la zone quantifiable pratique de la méthode. Elle s'exprime par l'erreur relative.

#### III.8.1 Méthode de calcul de la justesse

Dans la zone quantifiable de la méthode, appliquer 10 fois le procédé expérimental ( $n = 10$  *réplica*) sur un échantillon dont la valeur suggérée est fourni par un organisme reconnu (matériau de référence).

***La justesse % = 100 - |Erreur relative%|***

$$\text{Erreur relative}\% = \frac{V_0 - V_s}{V_s} \times 100$$

Ou

$V_0$  : moyenne des valeurs observées.

$V_s$  : valeur suggérée.

### **III.9 Sensibilité**

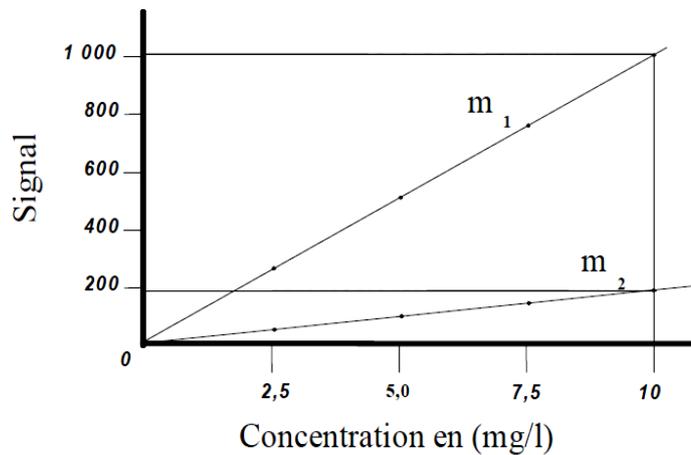
La sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variable de la grandeur mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément à doser.

#### ***III. 9.1 Méthode de calcul de la sensibilité***

Lorsque l'on réfère à des paramètres qui ont une courbe d'étalonnage linéaire, on peut exprimer la sensibilité comme étant la pente moyenne d'un minimum de deux courbes; autrement, on l'exprime par le rapport entre le signal obtenu et la concentration d'un étalon à l'intérieur de la plage pratique de la courbe, voir le graphique suivant :

$$\mathbf{Pente} = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

Sensibilité = Pente



*Figure 1 : le signal en fonction de la concentration.*

### III.11 POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION

Le pourcentage de récupération permet d'identifier, pour un échantillon donné ou un type de matrice donné et à un niveau de concentration donné, la présence d'interférence potentielle lors du processus d'analyse.

Le taux de récupération correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon fortifié et la concentration mesurée du même échantillon non fortifié, divisée par la concentration de la substance ajoutée. Ce rapport tient compte de la transformation chimique qui s'est produite, s'il y a lieu. Un minimum de cinq essais est demandé pour l'évaluation d'une méthode d'analyse.

#### III.11.1 Méthode de calcul de la récupération

Dans la zone quantifiable de la méthode, analyser cinq échantillons réels. Ajouter une concentration d'au moins 50% et d'au plus 100% de la concentration réelle de la substance à doser.

$$\text{Récupération}\% = \frac{C_f - C}{C_a} \times 100$$

Où

$C_f$  : concentration mesurée d'un échantillon fortifié;

$C$  : concentration mesurée d'un échantillon non fortifié;

$C_a$  : concentration de la substance ajoutée.

*Note : En l'absence de contaminants dans les échantillons réels, le pourcentage de récupération peut être calculé en ajoutant à ces derniers une concentration de la substance à doser se situant entre 3 et 10 fois la LDM.*