ANNEE 2010-2011

N° D'ORDRE 1147

Produits phytosanitaires :

Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem

THESE DE DOCTORAT

(VOLUME 1)

SPECIALITE : CHIMIE ANALYTIQUE

ECOLE DOCTORALE : MATIERES, MOLECULES, MATERIAUX DES PAYS DE LOIRE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

LE : 27 JUIN 2011

A : ANGERS

PAR : YOANN FILLATRE

Devant le jury ci-dessous :

Valérie PICHON, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Guy JAMET, Ingénieur au Service Commun des Laboratoires du Minefe	Rapporteur
Bruno LE BIZEC, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire	Examinateur
Brice BONNET, Ingénieur à la société L'Oréal Paris	Examinateur
Marylène DIAS, Maître de Conférences à l'Université d'Angers	Examinateur
Pierre-Yves COMMUNAL, Professeur associé à l'Université d'Angers	Examinateur
Alain JADAS-HECART, Maître de Conférences à l'Université d'Angers	Examinateur
Loïc BEYET, Ingénieur à la société AB Sciex	Membre invité

Directeur de thèse : David RONDEAU, Professeur à l'Université de Brest

Nom et coordonnées du Laboratoire
MOLTECH ANJOU UMR CNRS 6200
UFR Sciences – 2, Bd Lavoisier 49045 ANGERS CEDEX 01

ED N°500 3MPL

ANNEE 2010-2011

N° D'ORDRE 1147

Produits phytosanitaires :

Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem

THESE DE DOCTORAT

(VOLUME 1)

SPECIALITE : CHIMIE ANALYTIQUE

ECOLE DOCTORALE : MATIERES, MOLECULES, MATERIAUX DES PAYS DE LOIRE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

LE : 27 JUIN 2011

A : ANGERS

PAR : YOANN FILLATRE

Devant le jury ci-dessous :

Valérie PICHON, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Guy JAMET, Ingénieur au Service Commun des Laboratoires du Minefe	Rapporteur
Bruno LE BIZEC, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire	Examinateur
Brice BONNET, Ingénieur à la société L'Oréal Paris	Examinateur
Marylène DIAS, Maître de Conférences à l'Université d'Angers	Examinateur
Pierre-Yves COMMUNAL, Professeur associé à l'Université d'Angers	Examinateur
Alain JADAS-HECART, Maître de Conférences à l'Université d'Angers	Examinateur
Loïc BEYET, Ingénieur à la société AB Sciex	Membre invité

Directeur de thèse : David RONDEAU, Professeur à l'Université de Brest

Nom et coordonnées du Laboratoire
MOLTECH ANJOU UMR CNRS 6200
UFR Sciences – 2, Bd Lavoisier 49045 ANGERS CEDEX 01

ED N°500 3MPL

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Docteur Monsieur Patrick BATAIL, Directeur du laboratoire MOLTECH ANJOU (UMR CNRS 6200), pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire.

Je remercie également Monsieur Pierre-Yves COMMUNAL pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein du GIRPA (Groupement Interrégional de Recherche sur les Produits Agropharmaceutiques) dont il est le Directeur.

Cette thèse a bénéficié des supports financiers de l'ANRT, de l'Oréal et de la FREDON Pays-de-Loire, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance. A ce titre, je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur Gérald GUEDON Directeur de la FREDON et Dominique JULLIEN de la société L'Oréal pour avoir mis en œuvre les financements nécessaires à la réalisation de ce projet.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame Valérie PICHON et Monsieur Guy JAMET pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être Rapporteurs de mon manuscrit et pour la compréhension et les efforts qu'ils ont consentis. Je souhaite également adresser mes remerciements à Monsieur Bruno LE BIZEC, Monsieur Brice BONNET, Madame Marylène DIAS, Monsieur Alain JADAS-HECART et Monsieur Loïc BEYET d'avoir accepté de juger mon travail.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur David RONDEAU pour avoir accepté de superviser mon travail de thèse, pour m'avoir prodigué de précieux conseils et pour avoir répondu présent lors des moments clés de ce projet. Je le remercie également pour le soutien qu'il m'a apporté afin de terminer ce travail dans les meilleures conditions.

Un grand merci à tous mes collègues de travail pour leur soutien et leur sympathie. Je citerai tout particulièrement Antoine DAGUIN, Directeur adjoint du GIRPA, pour m'avoir suivi au cours de ces années de thèse, pour la confiance qu'il m'a témoigné sur la réalisation de divers projets et, enfin, pour les discussions très enrichissantes que nous avons pu avoir durant ces trois années.

Je voudrais également adresser de vifs remerciements à Solenne, Olivier et Guillaume pour leur bonne humeur, leur disponibilité et surtout leur compréhension et leur aide de tous les instants. Une attention toute particulière à Sonia et Nathalie T. pour leurs encouragements et leur soutien quotidien depuis mon arrivée au laboratoire. Bien évidemment, je n'oublie pas Hamid, Sylvain, Lucie, Sarah, Gwenaëlle, Séverine, Aurélie, Caroline, Véronique, Anaïs, Maud, Sophie, Bertrand et toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce projet.

Comment pourais-je conclure autrement ces premières lignes qu'en adressant mes plus sincères remerciements à mes amis et ma famille, auprès de qui j'ai trouvé un soutien sans commune mesure. A ce titre, je souhaiterais dédier une pensée particulière à mes parents, mon frère et ma petite sœur, qui ont toujours répondu présents et ont été d'un grand secours moral en toutes situations.

TABLE DES MATIERES

Liste des communications écrites et orales

Liste des abréviations

Glossaire

INTRODUCTION GENERALE ____ *1*

CHAPITRE I
Etude Bibliographique
Les Huiles Essentielles et les Produits Phytosanitaires

A) **Les Huiles Essentielles** ____ **7**
I. Généralités sur les huiles essentielles ____ 8
I.1 Le matériel végétal d'origine ____ 8
I.2 Méthodes d'extraction ____ 9
I.2.1. Expression à froid ____ 10
I.2.2. Distillation ____ 11
I.2.3. Extraction micro-ondes sans solvant (SFME) ____ 13
I.2.4. Extraction par fluide supercritique (SFE) ____ 13
I.2.5. Conclusion ____ 14
I.3 Composition Chimique ____ 15
I.3.1. Les terpènes et terpénoïdes ____ 15
I.3.2. Les composés aromatiques ____ 17
I.3.3. Conclusion ____ 18
II. Les huiles essentielles : le marché et le contrôle analytique ____ 19
II.1 Les domaines d'application ____ 20
II.1.1. Parfums et Cosmétiques ____ 20
II.1.2. Santé : pharmacie et aromathérapie ____ 20
II.1.3. Agro-alimentaire ____ 21
II.1.4. Agriculture ____ 22
II.1.5. Conclusion ____ 23
II.2 Le contrôle analytique des huiles essentielles ____ 23
II.2.1. Analyse conventionnelle par chromatographie en phase gazeuse ____ 23
II.2.2. Les techniques chromatographiques avancées ____ 25
II.2.3. Le couplage entre les chromatographies gazeuse et liquide ____ 27
II.2.4. Les principaux détecteurs ____ 28
II.3 Conclusion : Adultération ____ 29

B) **Les Produits Phytosanitaires** ____ **30**
I. Généralités sur les produits phytosanitaires ____ 31
I.1 Définitions, classification et chiffres clés ____ 31
I.2 L'histoire des produits phytosanitaires ____ 36
I.3 La vie d'un produit phytosanitaire ____ 39
I.3.1. L'homologation d'une substance active : la directive 91/414/CEE ____ 39
I.3.2. Application et devenir du pesticide dans l'environnement ____ 41
II. Toxicité et sécurité du consommateur ____ 44
II.1 Toxicité pour l'utilisateur ____ 44
II.1.1. Toxicité aigüe ____ 44
II.1.2. Toxicité chronique ____ 44
II.2 Les risques pour le consommateur ____ 45
II.2.1. Définition du résidu ____ 45
II.2.2. Définition de la LMR ____ 46

II.2.3. Evaluation du risque pour le consommateur 47
II.3 Conclusion 48
III. Les pesticides dans les huiles essentielles 49
III.1 Identification des substances actives pertinentes 49
III.1.1. La réglementation 49
III.1.2. L'usage 50
III.1.3. La toxicité 51
III.1.4. Conclusion 51
III.2 Etat de l'art sur l'analyse des pesticides dans les huiles essentielles 52

CHAPITRE II
Rappel Théorique sur la Spectrométrie de Masse Couplée à la Chromatographie en Phase Liquide (LC-MS/MS)

***A)* La source d'ionisation par electrospray ESI 57**
I. L'ionisation par electrospray 58
I.1 Production de gouttelettes chargées 59
I.2 Intervention d'un processus électrochimique 60
I.3 Evaporation du solvant et fission coulombienne 63
I.4 Formation des ions en phase gazeuse 64
I.5 Poursuite de la désolvatation à l'interface pression atmosphérique-vide 64
I.6 Electrospray assisté par nébullisation pneumatique ou Ion Spray 66
I.7 Conclusion 68
II. Le couplage chromatographie liquide – source electrospray 69
II.1 Introduction à la chromatographie liquide 69
II.2 La séparation en chromatographie de partage en phase inverse 70
II.2.1. Généralités 70
II.2.2. Les mécanismes de retention en RPLC 71
II.2.3. La résolution chromatographique 72
II.3 Cahiers des charges pour un couplage LC-ESI/MS 73

***B)* La Spectrométrie de Masse 75**
I. Quelques rappels fondamentaux sur la spectrométrie de masse 75
I.1 Le spectromètre de masse 75
I.2 Les principales caractéristiques d'un analyseur 76
II. Les analyseurs à champ quadripolaire 78
II.1 Le filtre de masse quadripolaire (QMF) ou quadripôle (Q) 78
II.1.1. Expression du potentiel électrique 79
II.1.2. Equation du mouvement d'un ion 81
II.1.3. Mouvement d'un ion dans un filtre de masse quadripolaire 83
II.1.4. Mode de fonctionnement 86
II.2 La trappe d'ions linéaire 2D 88
II.2.1. Principe du piégeage d'ions dans une trappe 2D 89
II.2.2. L'éjection axiale 90
II.2.3. Le cône de réflexion 93
III. La spectrométrie de masse en tandem 95
III.1 La fragmentation par CID 96
III.2 Les modes de scans d'un spectromètre de masse hybride QqLIT 99
III.2.1. Mode « full scan » et « Single Ion Monitoring » (SIM) 100
III.2.2. Le « Product Ions Scan » (PI) et l'« Enhanced Product Ions Scan » (EPI) 101
III.2.3. Le « Selected Reaction Monitoring » (SRM) ou le « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) 102
III.2.4. Conclusion 102
III.3 Les effets matrice et la confirmation des positifs 103

CHAPITRE III
Mise au Point de la Méthode d'Analyse Multi-Résidus LC-ESI/MS/MS

***A)* Optimisation des paramètres de détection en spectrométrie de masse _____ 107**
I. Le spectromètre de masse 4000 QTrap _____ 107
II. Optimisation des rendements d'ions fragments à travers l'étude de l'ion $[M+H]^+$ de la butraline _ 110
II.1 Optimisation de l'intensité de l'ion précurseur _____ 110
II.2 Optimisation de l'intensité des ions fragments caractéristiques _____ 112
III. Bilan des paramètres de détection en mode SRM des autres pesticides _____ 115

***B)* Cahier des charges imposé par le couplage LC-MS/MS _____ 119**
I. Le temps, un facteur crucial du mode SRM classique _____ 119
II. La solution apportée par le mode Scheduled SRM _____ 122

***C)* Optimisation des conditions chromatographiques pour un couplage en mode Scheduled SRM _____ 124**
I. L'HPLC Ultimate 3000 et sa colonne chromatographique _____ 124
II. Choix des phases mobiles et du gradient d'élution _____ 125
III. Optimisation des conditions d'ionisation de la source TurboV _____ 128

***D)* Les performances du mode Scheduled SRM pour l'analyse multi-résidus LC-ESI/SRM de 242 pesticides _____ 131**
I. Protocole Expérimental _____ 131
II. Résultats et discussion _____ 133
III. Conclusion _____ 136

CHAPITRE IV
Application de la Méthode LC-ESI/sSRM à la Recherche de Pesticides dans des Huiles Essentielles Surchargées

***A)* Prétraitement d'huiles essentielles surchargées et son effet sur la quantification ____ 139**
I. Extraction sur phase solide (SPE) _____ 139
I.1 Extraction sur Oasis HLB 500 mg _____ 139
I.1.1. Protocole n° 1 : extraction SPE sans lavage _____ 140
I.1.2. Protocole n° 2 : extraction avec lavage _____ 140
I.1.3. Résultats et discussion _____ 141
I.2 Extraction sur MegaBond Elute C18 1g _____ 142
I.2.1. Protocole expérimental _____ 142
I.2.2. Résultats et discussion _____ 143
I.3 Conclusion _____ 144
II. Purification SPE dispersive : la méthode QuEChERS _____ 144
II.1 Blancs de purification _____ 145
II.1.1. Protocole expérimental _____ 145
II.1.2. Résultats _____ 146
II.2 Evaluation de la purification sur l'huile essentielle de lavandin _____ 147
II.3 Conclusion _____ 150
III. Dilution pour une injection directe des huiles essentielles _____ 150
III.1 Protocole expérimental _____ 150
III.2 Résultats et discussion _____ 151
III.2.1. Mise en évidence des effets matrice _____ 151
III.2.2. Détermination des limites de quantification dans le solvant et les huiles essentielles de citron et lavandin _____ 152
IV. Conclusion sur les méthodes de préparation des huiles essentielles _____ 155

***B)* Développement de la méthode d'analyse : étude d'une huile essentielle de lavandin suchargée en pesticides 156**
I. Optimisation des conditions d'injection d'une huile essentielle 156
I.1 Nature du solvant et volume d'injection 156
I.2 Effet de la quantité d'acide dans les phases mobiles et le solvant d'injection 159
I.2.1. Influence sur le temps de rétention 160
I.2.2. Influence sur l'aire des pics chromatographiques 162
I.2.3. Influence sur la forme des pics chromatographiques (efficacité) 163
I.2.4. Conclusion 164
II. Etude des effets matrice en LC-ESI/sSRM 165
II.1 Protocole 165
II.2 Résultats 166
III. Détermination statistique des LODs et LOQs 168
III.1 Description de la méthode à partir de l'analyse de l'acétamipride 168
III.2 Résultats 172
IV. Analyse d'échantillons réels d'huile essentielle de lavandin 174
V. Conclusion 175

***C)* Analyse d'huiles essentielles peu solubles dans le méthanol : le cas de l'huile essentielle de citron 177**
I. Mise en place d'une méthode de purification adaptée 177
I.1 Protocole 177
I.2 Résultats et discussion 178
I.3 Conclusion 181
II. Application à l'analyse d'échantillons réels 182
II.1.1. Analyse par LC-ESI/sSRM 183
II.1.2. Seconde série d'analyse : évaluation de la répétabilité du prélèvement 184
II.1.3. Conclusion 185
II.2 Analyse d'une huile essentielle d'orange 186
II.2.1. Analyse par LC-ESI/sSRM 186
II.2.2. Résultats et discussion dans le contexte d'une analyse interlaboratoire 187
II.2.3. Résultats 187
II.2.4. Conclusion 189

CHAPITRE V
Vers un Screening Plus Etendu de Pesticides dans les Huiles Essentielles, Plus Sensible et Plus Fiable

***A)* L'évaporation sous azote comme méthode ad-hoc d'enrichissement en pesticides 193**
I. Mise au point de la méthode évaporation sous azote 193
I.1 Protocole expérimental 193
I.2 Résultats et discussion 194
I.2.1. L'huile essentielle de citron 194
I.2.2. L'huile essentielle de cyprès 196
I.3 Conclusion 197
II. Quantification de 250 pesticides dans 4 huiles essentielles : comparaison des méthodes de dilution et d'évaporation sous azote 198
II.1 Protocole expérimental 198
II.2 Analyse de l'huile essentielle de citron surchargée en pesticides 200
II.2.1. Résultats et discussion 200
II.2.2. Cas des molécules de dithianon, bromoxynil et fludioxonil 204
II.2.3. Cas du thiophanate-méthyle et de l'amitraz 205
II.2.4. Bilan des limites de quantification 206
II.3 L'huile essentielle de cyprès 208
II.3.1. Résultats et discussion 208

II.3.2. Bilan des limites de quantification 208
II.4 L'huile essentielle de lavandin 209
II.4.1. Résultats et discussion 209
II.4.2. Bilan des limites de quantification 210
II.5 L'huile essentielle de mélisse 211
II.5.1. Résultats et discussion 211
II.5.2. Bilan des limites de quantification 211
II.6 Vérification de la linéarité de la réponse 212
II.7 Conclusion 213

***B)* Développement d'une méthode de confirmation en mode SRM-EPI 215**
I. Principe et spécificité du mode SRM-EPI 216
II. Optimisation des conditions de détection en mode SRM-EPI 218
II.1 Détermination de la valeur globale optimum de la DP 218
II.2 Les critètres IDA 218
II.3 Optimisation du temps d'accumulation des ions dans Q_0 220
II.4 Optimisation des énergies de collision 222
II.5 Optimisation de la vitesse d'acquisition de la trappe 2D 223
II.6 Etude de l'impact de la résolution du filtre quadripolaire Q_1 sur la concordance des spectres EPI 224
III. Résumé des principaux paramètres de la méthode SRM-EPI 228

***C)* Application à l'analyse d'échantillons d'huile essentielle 229**
I. Description de la méthodologie analytique 229
I.1 Méthodologie sur la préparation de l'échantillon 229
I.2 Analyse LC-ESI-MS/MS de 250 substances actives 230
I.2.1. Limites de quantification de 250 substances actives 230
I.2.2. Analyse par LC-ESI/sSRM et LC-ESI/SRM-EPI 231
I.2.3. Quantification des substances actives 231
II. Analyse d'échantillons réels d'huile essentielle 233
II.1 Analyse d'une huile essentielle de marjolaine d'origine « bio » 233
II.1.1. Concentration et confirmation des 12 substances actives détectées 233
II.1.2. Conclusion 240
II.2 Analyse de deux huiles essentielles de citron 242
II.2.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle de citron « bio » 242
II.2.2. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle de citron « non bio » 244
II.3 Analyse de deux huiles essentielles d'orange douce 248
II.3.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle d'orange bio 248
II.3.2. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle d'orange non biologique 249
III. Conclusion 251

***CONCLUSION GENERALE* 254**

***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES* 258**

***Abstract* 266**

***Résumé* 267**

LISTE DES COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES

Publications

Fillâtre Y., Rondeau D., Jadas-Hécart A., Communal P.-Y. Advantages of the Scheduled SRM algorithm in liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry multi-residue analysis of 242 pesticides: a comparative approach with classical selected reaction monitoring mode. *Rapid communications in mass spectrometry*, Volume 24, 31 May 2010, Pages 2463-2461.

Fillâtre Y., Rondeau D., Bonnet B., Daguin A., Jadas-Hécart A., Communal P.-Y. Multiresidue Analysis of Multiclass Pesticides in Lavandin Essential Oil by LC/MS/MS Using the Scheduled Selected Reaction Monitoring Mode. *Analytical Chemistry*. Volume 83, 1 January 2011, Pages 109-117.

Communication orale

Multi-residue Analysis of 70 Multi-Class Pesticides in Lavandin Essential Oil by LC/MS/MS using Scheduled MRM. EPRW (European Pesticides Residues Workshop) le 22 Juin 2010 à Strasbourg (France).

Posters

Advantages of the Scheduled MRM in LC-ESI-MS/MS multi-residue analysis. A comparative approach with the classical MRM mode. EC/MS/MS les 6 et 7 Octobre 2010 à Noordwijkerhoot (Pays-Bas).

Application de la LC-MS/MS et du Scheduled MRM à l'analyse multi-résidus de 70 pesticides dans l'huile essentielle de lavandin. JFSM (Journées Françaises de Spectrométrie de Masse) du 13 au 16 Septembre 2010 à Clermont-Ferrand.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN	*Acétonitrile ;*
ACTA	*Association de Coordination Technique Agricole;*
ACTEI	*Apport Court Terme Estimatif International ;*
AFNOR	*Association Française de NORmalisation ;*
AJMT	*Apport Journalier Maximal Théorique ;*
AMM	*Autorisation de Mise sur le Marché ;*
AOC	*Appellation d'Origine Contrôlée ;*
APCI	*Atmospheric Pressure Chemical Ionization ;*
API	*Atmospheric Pressure Ionization ;*
APPI	*Atmospheric Pressure PhotoIonization ;*
ARfD	*Acute Reference Dose ;*
BIRD	*Blackbody Infrared Radiative Dissociation ;*
BPA	*Bonnes Pratiques Agricoles ;*
BPP	*Bonnes Pratiques Phytosanitaires ;*
CA	*Charbon Actif ;*
CCM	*Chromatographie sur Couche Mince ;*
CD	*CycloDextrines ;*
CEM	*Channel Electron Multiplier ;*
CES	*Collision Energy Spread ;*
CI	*Chemical Ionization ;*
CID	*Collision Induced Dissociation ;*
CIP	*Carbonyl Iron Powder ;*
CL 50	*Concentration Létale 50 ;*
CP	*Chromatographie Planaire ;*
CRM	*Charge Residue Model ;*
CXP	*Cell Exit Potential ;*
DAR	*Délai Avant Récolte ;*
DBS	*Dynamic Background Substract ;*
DJA	*Dose Journalière Admissible ;*
DL 50	*Dose Létale 50*
DP	*Declustering Potential ;*
DSE	*Dose Sans Effet ;*
dw	*dwell time ;*
ECD	*Electron Capture Detector ;*
EFSA	*European Food Safety Authority ;*
EI	*Electronic Ionization ;*
EPI	*Enhanced Product Ion ;*
ESI	*Electrospray Ionization ;*
ESP	*ElectroSPray ;*
FAB	*Fast Atom Bombardment ;*
FAPAS	*Food Analysis Performance Assessment Scheme ;*
FF	*Fringing-Field ;*
FID	*Flame Ionization Detector ;*
FMC	*Food Machinery Corporation ;*
FWHM	*Full Width Half-height Maximum ;*
GB	*Gas phase Basicity;*
GC	*Gaz Chromatography ;*
GC×GC	*bidimensional Gas Chromatography ;*
GC-Es	*Gas Chromatography Enantioselective ;*
GS1	*Gaz de nebulisation ;*
GS2	*Gaz de désolvatation ;*
H ou HEPT	*Hauteur Equivalente en Plateaux Théoriques ;*
HE	*Huile Essentielle ;*
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography ;*
HR	*Haute Résolution ;*
IDA	*Information Dependent Acquisition ;*
IELC	*Ion Exchange Liquid Chromatography ;*
IEM	*Ion Evaporation Model ;*

IPRPLC	*Ion Pair Reversed Phase Liquid Chromatography ;*
IRMPD	*Infrared MultiPhoton Dissociation ;*
IS	*IonSpray voltage ;*
ISO	*International Organisation for Standardization ;*
ITD	*Ion Trap Detector ;*
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry ;*
LC	*Liquid Chromatography ;*
LC×LC	*bidimensional Liquid Chromatography ;*
LINAC	*Linear Accelerator ;*
LIT	*Linear Ion Trap ;*
LMR	*Limite Maximale de Résidus ;*
LOD	*Limit Of Detection ;*
LOQ	*Limit Of Quantification ;*
MALDI	*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization ;*
MDGC	*Multidimensional Gas Chromatography ;*
MeOH	*Méthanol ;*
MRM	*Multiple Reaction Monitoring ;*
MS	*Mass Spectrometry ;*
MS/MS	*Mass Spectrometry/Mass Spectrometry ;*
MSAE	*Mass-Selective Axial Ejection ;*
MW	*Molecular Weight ;*
ND	*Non détecté ;*
NL	*constant Neutral Loss ;*
NOEL	*No Observed Effect Level ;*
NPLC	*Normal Phase Liquid Chromatography ;*
Patm	*Pression atmosphérique*
PC	*PreCursor ion scan ;*
PEG	*PolyEthylèneGlycole ;*
PI	*Product Ion scan ;*
PLE	*Pressurized Liquid Extraction ;*
PPAM	*Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales ;*
ppm	*Partie par million ;*
PSA	*Primary and Secondary Amine ;*
PSD	*Post-source Decay ;*
QMF ou Q	*Quadrupole Mass Filter ou Quadrupole ;*
QqQ ou TQ	*Triple Quadripôle ;*
QuEChERS	*Quick Easy Cheap Efficient Rugged and Safe ;*
R	*Résolution ;*
RE	*Rapport d'extraction ;*
RIRDC	*Rural Industries Research and Development Corporation;*
RMN	*Résonnance Magnétique Nucléaire ;*
RPLC	*Reverse Phase Liquid Chromatography ;*
rpm	*rotation par minute ;*
s.a.	*Substance Active ;*
S/N	*Signal-to-Noise ratio ;*
SFE	*Supercritical Fluid Extraction ;*
SFME	*Solvent-Free Microwave Extraction ;*
SID	*Surface Induced Dissociation ;*
SIM	*Selected Ion Monitoring ;*
SPE	*Solid Phase Extraction ;*
SRM	*Selected Reaction Monitoring ;*
sSRM	*Scheduled Selected Reaction Monitoring ;*
TCD	*Thermal Conductivity Detector ;*
TOF	*Time of Flight ;*
TR	*Taux de Récupération ;*
t_R	*temps de retention ;*
TSP	*ThermoSPray ;*
TST	*Target Scan Time ;*
UE	*Union Européenne ;*
UIPP	*Union des Industrie de la Protection des Plantes ;*

GLOSSAIRE

***Absolue* :** un absolue est un produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un résinoïde par extraction à l'éthanol à température ambiante. La solution obtenue est généralement refroidie et filtrée dans le but de supprimer les cires. L'éthanol est ensuite éliminé par distillation.

***Acaricide* :** un acaricide est un pesticide destiné à éliminer les acariens.

***Adsorption* :** le phénomène d'adsorption en chromatographie liquide correspond à un soluté situé dans l'interface entre les greffons et la phase mobile.

***Adventice* :** Une adventice est, en botanique, une espèce végétale étrangère à la flore indigène d'un territoire dans lequel elle est accidentellement introduite et peut s'installer. En agronomie, ce terme désigne une plante herbacée ou ligneuse indésirable à l'endroit où elle se trouve. Il est aussi utilisé comme synonyme de mauvaise herbe.

***Bonnes pratiques agricoles* :** Les BPA constituent un ensemble de règles à respecter (la bonne pratique) dans l'implantation et la conduite des cultures de façon à optimiser la production agricole, tout en réduisant le plus possible les risques liés à ces pratiques, tant vis-à-vis de l'homme que vis-à-vis de l'environnement. En matière de protection des plantes, on peut également les nommer bonnes pratiques phytosanitaires (BPP).

***Bonnes pratiques phytosanitaires* :** voir bonnes pratiques agricoles.

***BPA critique* :** la BPA « critique » pour une substance active et une culture donnée, correspond à la pratique qui conduit au risque résidu le plus important.

***Co-élution* :** on parle de co-élution en chromatographie lorsque plusieurs composés sont élués de la colonne chromatographique avec des temps de rétention proches qui ne permettent pas de les distinguer sur le chromatogramme.

***Concentration létale 50* :** la CL 50 par inhalation est la dose ou concentration du produit qui tue 50 % des animaux d'expériences après une seule exposition dans des conditions d'études normalisées.

***Concrète* :** une concrète est un extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une matière première fraîche végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux suivie de l'élimination de ce solvant par un procédé physique.

***Corvicide* :** un corvicide est un pesticide destiné à éliminer les oiseaux ravageurs.

***Cycle Time* :** le cycle time en mode SRM est le temps mis par le spectromètre de masse pour enregistrer une fois l'ensemble des transitions SRM.

***Danger* :** un danger est ce qui est susceptible de causer un préjudice.

***Déclusterisation* :** terme utilisé pour décrire le processus qui consiste à éliminer les dernières molécules de solvant en intéraction avec les ions en phase gazeuse.

***Désolvatation* :** terme au sens plus large que la déclusterisation incluant le processus d'évaporation des gouttelettes macroscopiques.

***Dose de Référence Aigüe* :** l'ARfD représente la quantité de résidus de pesticides qu'un individu ne doit pas dépasser au cours d'un repas ou d'une journée. Elle permet de prendre en compte le risque toxicologique « court terme » pour les molécules dont l'effet toxique se manifeste rapidement dès la première ingestion. L'ARfD est établie selon une méthodologie similaire à celle décrite pour la DJA mais diffère par le fait qu'elle est le plus souvent définie à partir des études de toxicité à court terme (quelques jours à quelques semaines). Elle s'exprime en $mg/kg_{poid\ corporel}/j$.

***Dose Journalière Admissible* :** la DJA est la quantité de substance qu'un être humain peut absorber quotidiennement sa vie durant sans effet néfaste pour sa santé. Elle s'exprime en $mg/kg_{poid\ corporel}/j$. Elle est calculée en divisant la DSE par un coefficient de sécurité, en général de 100, pour tenir compte de

la variabilité inter- et intra-espèce et, parfois, de 500 ou 1000 si des doutes sur la toxicité existent ; elle sert pour l'ensemble de la population.

Dose létale 50 : la DL 50 par mode d'absorption, orale ou cutané est la dose de produit qui tue 50 % des animaux d'expériences après une seule exposition dans des conditions d'études normalisées.

Dose Sans Effet observé : la DSE est la quantité maximale de substance dont l'absorption quotidienne ne se traduit pas par des effets toxiques sur des animaux de laboratoire. Elle s'exprime en $mg/kg_{poid\ corporel}/j$.

Duty Cycle : en mode SRM, il s'agit du temps total de travail du spectromètre de masse sur une transition, c'est-à-dire l'addition du dwell time et du pause time.

Dwell time : le dwell time (dw) est le temps passé par le spectromètre de masse à enregistrer une transition.

Effet Matrice : augmentation ou suppression du signal de l'analyte causée par des composés co-élués provenant de la matrice.

Efficacité d'échantillonnage : produit de l'efficacité d'ionisation et de l'efficacité de transfert.

Efficacité d'ionisation : efficacité de création d'ion à pression atmosphérique.

Efficacité d'une colonne N : l'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée pour chaque composé par le nombre de plateaux théoriques N contenus dans la colonne. L'efficacité de la colonne sera d'autant meilleure qu'elle sera composée d'un nombre important de plateaux théoriques N et donc d'une hauteur équivalente en plateau théorique H réduite :

$$H = \frac{L}{N}$$

Efficacité de transfert : efficacité de transfert des ions entre l'atmosphère et le vide.

Facteur de capacité k' : le facteur de capacité k' d'un analyte se définit comme le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire (q_S) à la quantité de soluté dans la phase mobile (q_M) :

$$k' = \frac{q_S}{q_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M}$$

où V_S et V_M désigne respectivement le volume de phase stationnaire et le volume de phase mobile.

Fit : le *Fit* mesure la concordance entre le spectre de la librairie et le spectre inconnu. Il ne tient pas compte des pics présents dans le spectre inconnu et absents de celui de la librairie.

Fongicide : un fongicide est un pesticide destiné à lutter contre les parasites et les champignons pathogènes.

Gamme matrice : la préparation d'un point de gamme matrice consiste à mélanger 90 µL de témoin et 10 µL d'un point solvant à une concentration 10 fois supérieure à celle désirée. Par exemple, pour préparer un point de gamme matrice à 1 $\mu g.L^{-1}$, 90 µL de témoin seront mélangés avec 10 µL d'un point de gamme solvant à une concentration de 10 $\mu g.L^{-1}$.

Herbicide : un herbicide est un pesticide destiné à éliminer les adventices des cultures.

Huile essentielle : une huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière végétale botaniquement définie, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entrainant pas de changement significatif de sa composition.

Insecticide : un insecticide est un pesticide destiné à éliminer les insectes nuisibles.

Limite en m/z : elle détermine les valeurs limites (minimum et maximum) des rapports *m/z* mesurables.

Limite Maximale de Résidus : la LMR est la concentration maximale en résidus de produit phytopharmaceutique, officiellement fixée, tolérée dans une denrée alimentaire en l'état ou transformée, destinée à l'homme ou aux animaux. Elle est exprimée en en mg/kg.

Log K_{ow} : le log Kow est une mesure de la solubilité différentielle de composé chimique dans deux solvants (coefficient de partage octanol/eau). Il est égal au logarithme du rapport de la concentration de la substance étudiée dans l'octanol et l'eau. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. En effet, si le log K_{ow} est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile et inversement.

Molluscicide : un molluscicide est un pesticide destiné à éliminer les mollusques (limaces et escargots).

Nématicide : un nématicide est un pesticide destiné à éliminer les nématodes.

Partage : le phénomène de partage en chromatographie liquide correspond à un processus de transfert de type liquide-liquide où le soluté se situe davantage dans la région centrale de la phase greffée.

Pause Time : le pause time est le temps mis par le spectromètre de masse pour appliquer les paramètres de détection de la transition SRM suivante.

Persistance : la persistance est la durée pendant laquelle les résidus d'un produit phytopharmaceutique sont détectables dans l'environnement.

Pesticide de contact : un pesticide de contact est un pesticide qui agit en surface.

Pesticide systémique : un pesticide systémique est un pesticide qui agit après transfert à l'intérieur de la plante et diffusion par la sève.

Pesticide : le mot pesticide provient de l'association du mot anglais *pest* (animal, insecte ou nuisible), lequel provient du latin *pestis* (fléau, calamité) et du suffixe *–cide* ((latin *-cida*, du verbe latin *caedo, caedere*, « tuer »). Bien que communément appelé « pesticides » par le grand public, les termes utilisés par la législation française relative à la protection des cultures sont « produits phytopharmaceutiques », « produits phytosanitaires », « produits agropharmaceutiques » ou encore « produits antiparasitaires à usage agricole ». Les pesticides désignent l'ensemble des substances actives ou préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, qu'il s'agisse de plantes, de nuisibles et de champignons.

Phytopharmacie : la phytopharmacie est la science s'intéressant à la conception, au mode d'action, la préparation et la distribution des produits qui servent à traiter les plantes.

Précision sur la masse : elle détermine la précision ou, plus correctement, la justesse des rapports *m/z* mesurés, c'est-à-dire la concordance entre la masse mesurée et la masse théorique de la molécule. Elle s'exprime en partie par million (ppm) :

$$P = \frac{m_{th} - m_{mes}}{m_{th}} \times 10^6$$

Produit phytopharmaceutique : voir pesticide.

Purity : la *Purity* mesure le taux de non concordance dû aux pics additionnels présents sur l'un ou l'autre des spectres et est fonction du *Fit* et *RevFit.*

Rapport d'extraction : le rapport d'extraction est le rapport entre le volume de matrice ($V_{matrice}$) de la prise d'essai et le volume de solvant ($V_{solvant}$) dans lequel l'extrait final est repris en fin de manipulation.

$$RE = \frac{V_{matrice}\,(mL)}{V_{solvant}\,(mL)}$$

Résidus de pesticides : il s'agit d'une ou plusieurs substances présentes dans ou sur les végétaux ou produits d'origine végétale, des produits comestibles d'origine animale, ou ailleurs dans

l'environnement et constituant le reliquat de l'emploi d'un produit phytopharmaceutique, y compris leurs métabolites issus de la dégradation.

***Résolution* en masse :** elle peut être calculée à partir d'un spectre de masse en considérant un pic isolé. Elle se détermine en effectuant le rapport de la masse *m* sur la largeur à mi-hauteur du maximum δm.

$$R = \frac{m}{\delta m}$$

***RevFIT* :** le *RevFit* mesure la concordance du spectre inconnu avec le spectre de la librairie. Il ne tient pas compte des ions présents dans le spectre de la librairie et absents du spectre inconnu.

***Risque* :** le risque est la probabilité qu'un danger survienne.

***Rodonticide* :** un rodonticide est un pesticide destiné à éliminer les rongeurs.

***Sélectivité* α :** la sélectivité α (ou rétention relative) permet de caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs 1 et 2 :

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

***Spectrométrie de masse en tandem* :** c'est l'acquisition et l'étude du spectre des produits ou précurseurs électriquement chargés d'un ou de plusieurs ions de rapport *m/z* sélectionnés, ou d'ions précurseurs d'une perte de masse neutre sélectionnée.

***Substance active* :** une substance active est une substance ou micro-organisme, y compris les virus, exerçant une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux, parties de végétaux ou produits de végétaux.

***Taux de récupération* :** un taux de récupération TR consiste à doper l'échantillon avec une quantité connue d'un ou plusieurs pesticides et d'analyser l'échantillon comme un échantillon réel. On détermine ensuite la quantité de pesticides récupérés à l'issue de la préparation de l'échantillon et on la compare à la quantité initiale :

$$TR\ (\%) = \frac{Quantité\ \ finale\ en\ \ pesticide}{Quantité\ initiale\ en\ \ pesticide} \times 100$$

***Témoin* :** échantillon possédant des caractériques pré-déterminées qui subit un processus de préparation identique aux échantillons tests et qui sert de base à la comparaison.

***Toxicité aigüe* :** la toxicité aigüe est un effet résultant de l'administration d'une dose unique de la substance étudiée.

***Toxicité chronique* :** la toxicité chronique est un effet résultant de l'administration d'une dose ou de l'exposition quotidienne à une concentration de la substance étudiée pendant une durée longue, par exemple un ou deux ans.

***Toxicité subaigüe* :** la toxicité subaigüe est un effet résultant de l'administration d'une dose ou de l'exposition quotidienne à une concentration de la substance étudiée pendant une durée courte, par exemple une semaine.

***Toxicité subchronique* :** la toxicité subchronique est un effet résultant de l'administration d'une dose ou de l'exposition quotidienne à une concentration de la substance étudiée pendant une durée moyenne, par exemple trois mois.

***Transmission* :** elle correspond au rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et celui entrant dans l'analyseur.

***Vitesse de balayage* :** elle correspond au temps mis par le spectromètre pour analyser l'ensemble de la gamme de masse. Elle est généralement exprimée en $u.s^{-1}$ ou $u.ms^{-1}$.

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, environ 3000 huiles essentielles sont produites et utilisées de part le monde dans des domaines aussi variés que la cosmétique, la parfumerie, l'agro-alimentaire, la pharmacie, et l'aromathérapie. Ces huiles essentielles sont extraites des hespéridés ou des plantes aromatiques et médicinales, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit encore, par un procédé mécanique approprié sans chauffage. La culture de ces matières premières implique généralement l'application de produits phytosanitaires.[1]

Plus connus sous le nom de pesticides, ces produits sont utilisés pour la croissance, la protection et la conservation des végétaux. Très employés depuis le milieu du XX^{ème} siècle, les pesticides sont aujourd'hui au cœur d'une problématique d'ordre aussi bien environnementale, avec une contamination de la faune et de la flore, que sanitaire. En effet, de part leurs propriétés toxiques, les pesticides représentent un réel danger pour l'homme lorsqu'ils ne sont pas utilisés dans des conditions appropriées. Afin de garantir la sécurité du consommateur, une législation très stricte a été mise en place, notamment dans l'Union Européene, où la mise sur le marché des substances actives est réglementée par la directive 91/414/CEE.[2] De même, leur utilisation doit entrer dans le cadre des **bonnes pratiques phytosanitaires (BPP)**. Ces mesures ont pour but de limiter les teneurs résiduelles en pesticides en dessous d'un certain seuil réglementaire appelé « **limite maximale de résidus (LMR) »**. Dès lors, le respect des LMRs impose aux laboratoires de disposer de méthodes analytiques autorisant la détection et la quantification des pesticides. Le durcissement constant de la réglementation conduit par ailleurs les laboratoires à développer constamment des méthodes d'analyse toujours plus performantes, capables de doser un nombre de plus en plus élevé de substances actives à des limites de quantification toujours plus basses. Cependant, la quasi-totalité des mesures réglementaires et de contrôle ne concernent que les produits alimentaires. Ainsi il n'existe, à ce jour, aucune teneur limite réglementaire en pesticides dans les produits transformés tels que les huiles essentielles.

Or, au vu de l'origine et du processus de fabrication des huiles essentielles, il paraît évident que la présence de résidus de pesticides ne peut être écartée. De plus, compte tenu des domaines d'application, notamment l'aromathérapie où les huiles essentielles sont accessibles au grand public et leurs utilisations peu controlées, cette présence pourrait constituer un véritable problème de santé publique. Disposer d'une méthode sensible et spécifique pour quantifier les pesticides potentiellement présents dans ce type de matrice constitue un challenge à la fois pour les laboratoires d'analyses, mais aussi pour les professionnels impliqués dans l'utilisation et la commercialisation de ces produits.

Le contrôle analytique des résidus de pesticides dans les produits alimentaires et les matrices environnememtales est aujourd'hui bien établi et s'appuie, principalement, sur les capacités de méthodes d'analyse comme la spectrométrie de masse en tandem associée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) ou chromatographie liquide (LC-MS).[3-8]

Depuis la fin des années 1970, c'est le couplage GC-MS qui était essentiellement employé dans le domaine de l'environnement. Les pesticides séparés par chromatographie liquide étaient jusqu'alors détectés par des spectromètres UV ou des détecteurs à fluorescence.[9] Le premier souffre, malheureusement, d'un problème de confirmation dû à des spectres UV similaires de certains pesticides alors que le second, plus sensible et sélectif, est contraint à une application limitée due à la faible présence de groupement fluorophore dans les pesticides.[9] Le manque de détecteur performant applicable à une large gamme de composés et associé à la LC a été surmonté, d'une part, grâce à l'apparition du couplage entre la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la spectrométrie de masse et, d'autre part, avec la mise au point de la source electrospray. Cette avancée technologique a permis à l'analyse LC-MS de connaître un développement important à partir des années 1990 ;[10] développement qui s'est précisé grâce à l'avènement de nouvelles méthodes de spectrométrie de masse impliquant l'utilisation de dispositifs analytiques en tandem. La MS/MS ainsi nommée apporte, en plus de sa très grande sensibilité, un pouvoir d'identification et de confirmation.[11,12]

De nos jours, l'analyse de résidus de pesticides en LC-MS est effectuée principalement avec des sources ESI (Electrospray Ionization) et APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) et, plus rarement, en APPI (Atmospheric Pressure PhotoIonization). L'ESI et l'APCI n'ont cependant que rarement été comparées[13-18] et les résultats ne sont pas unanimes en faveur de l'une ou l'autre des sources. En effet, si Titato *et al.* ont obtenu de meilleurs résultats avec l'APCI sur une dizaine de pesticides,[13] Fernandez *et al.* ont trouvé une sensibilité équivalente entre ces deux sources sur cinq pesticides.[14] D'un autre coté, Jansoon *et al.* ont constaté une meilleure sensibilité en ESI sur une cinquantaine de pesticides avec un facteur pouvant atteindre 10 ou 20.[15] En comparant ces deux sources sur 75 pesticides de différentes classes, Thurman *et al.* se sont aperçus que l'APCI était généralement plus sensible mais que le développement des conditions analytiques était plus simple en ESI.[16]

En fait, il faut savoir que si la GC-MS s'adresse plus particulièrement aux composés apolaires et semi-polaires, volatils et semi volatils, la LC-MS/MS est plus adaptée aux pesticides polaires et semi-polaires, non volatils et thermolabiles.[19] En revanche, les avantages de la LC-MS/MS en termes de gamme de pesticides analysables, de sensibilité et de

sélectivité sont évidents, de même que la capacité à analyser une quantité plus importante de molécules au cours d'une même analyse.[20] Etant donné le nombre conséquent de substances actives concernées par notre étude et la diversité des propriétés physico-chimiques, notamment en termes de polarité (Figure 1), la LC-MS/MS s'avère être la technique la plus à même de répondre à notre problématique.

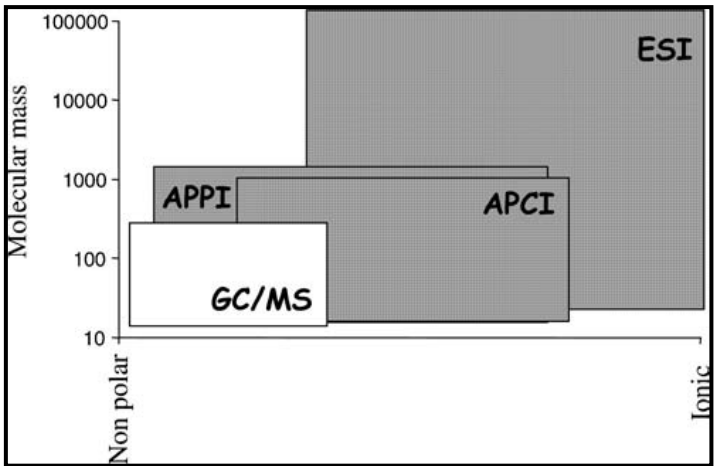


Figure 1. Champs d'application des sources d'ionisations de la LC-MS (ESI, APCI, APPI) et de la GC-MS en fonction de la polarité et de la masse de la molécule[21]

Concernant la préparation de l'échantillon, les méthodes classiques d'extraction des pesticides dans les matrices environnementales parmi lesquelles l'extraction sur phase solide (SPE),[22-25] l'extraction avec liquide sous pression (PLE),[26-28] ou encore la récente méthode normalisée QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)[6,29-33] ne semblent pas adaptées à l'extraction des pesticides des huiles essentielles. En effet, contrairement aux matrices alimentaires, les huiles essentielles, en plus d'être caractérisées par un milieu fortement apolaire, sont déjà issues d'un procédé d'extraction (principalement l'hydrodistillation). Par conséquent, les pesticides susceptibles de se retrouver dans ces extraits possèdent certainement des propriétés physico-chimiques proches des constituants de l'huile essentielle.[34] Au vu du nombre et de la gamme de polarité des substances actives concernées, il apparaît compliqué d'établir une méthode de préparation capable d'extraire sélectivement environ 300 pesticides, ou de purifier efficacement l'extrait sans perdre de molécules d'intérêt. La méthode envisagée est une dilution de l'échantillon d'huile essentielle suivie d'une injection directe en LC-MS/MS. Cette technique de « dilution-injection » a déjà été appliquée avec succès pour l'analyse des pesticides dans l'eau potable.[35] Elle nécessite cependant un système LC-MS/MS moderne et performant.

Dans ce contexte, il était intéressant de développer une nouvelle méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la

spectrométrie de masse en mode tandem. C'est pourquoi, le Groupement Interrégional de Recherche sur les Produits Agropharmaceutiques (GIRPA) a acquis un système analytique composé d'un spectromètre de masse 4000 QTrap (AB Sciex) couplé avec une chaîne HPLC Ultimate 3000 (Dionex) pour proposer la mise au point d'une méthode d'analyse orgininale applicable à la détection de pesticides dans différents types d'huiles essentielles.

Au préalable, il fut nécessaire de réaliser une étude bibliographique liée à ces deux grands domaines industriels que sont la production et l'utilisation d'huiles essentielles et de produits phytosanitaires. Etant généralement peu associés dans les champs d'application de l'analyse chimique, le résultat de cette étude bibliographique est reporté dans un premier chapitre que relativement conséquent du fait de la pluridisciplinarité des domaines concernés.

Comme celui-ci a mis en évidence le besoin de disposer d'une méthode analytique efficace pour le contrôle des pesticides dans les huiles essentielles, le deuxième chapitre s'intéresse aux aspects du couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. Cette technologie s'est avérée être la plus prometteuse pour le développement de la méthode d'analyse multi-résidus. Notons que ce chapitre s'intéresse plus particulièrement au principe de fonctionnement des sources electrospray et des analyseurs à champs quadripolaire puisque c'est ce type de dispositif qui a été utilisé pour la présente étude.

Le troisième chapitre décrit le développement et la mise au point de la méthode d'analyse multi-résidus LC-ESI-MS/MS sur un spectromètre de masse 4000 QTrap. Il traite de l'optimisation des paramètres de détection en spectrométrie de masse, de l'optimisation des conditions de séparation en chromatographie liquide et de l'évaluation d'un tout nouveau mode d'acquisition : le Scheduled Selected Reaction Monitoring (sSRM).

Ensuite, le chapitre quatre se focalise sur l'influence de la matrice dans la problématique de l'analyse de pesticides dans les huiles essentielles. Après avoir déterminé la méthode de préparation des échantillons la plus adaptée, l'étude de deux huiles essentielles, celles de citron et de lavandin, a permis de mettre en évidence et de résoudre les principaux problèmes posés par ces matrices.

Les conclusions de cette partie, associées à la méthode instrumentale mise au point dans le troisième chapitre, ont permis d'envisager une finalisation de ce travail en proposant un screening plus étendu de pesticides dans les huiles essentielles. Le but étant de proposer une méthode toujours plus sensible et plus fiable, les potentialités du couplage des modes d'acquisition Selected Reaction Monitoring et Enhanced Product Ion (SRM-EPI) ont alors été testées pour la recherche de 250 pesticides dans les huiles essentielles.

Chapitre I

Etude Bibliographique
Les Huiles Essentielles et les Produits Phytosanitaires

En moins d'une décénnie, les huiles essentielles sont devenues des produits incontournables du marché de consommation avec des applications dans des domaines aussi variés que les industries pharmaceutiques et cosmétiques, l'agroalimentaire, l'agriculture ou encore les parfums d'ambiance et l'aromathérapie. Comme la majorité des cultures modernes, les végétaux, dont sont extraites les huiles essentielles, sont soumis à des traitements phytosanitaires. Leurs applications laissent supposer la présence de résidus de pesticides dans les huiles essentielles. L'augmentation des préocupations en termes de santé publique implique un grand intérêt envers les produits phytosanitaires. C'est pourquoi les laboratoires disposent de nombreuses méthodes analytiques afin de contrôler, dans un cadre réglementaire, leurs teneurs dans diverses matrices (eau, sols, denrées alimentaires…).

Après une présentation générale des huiles essentielles et des produits phytosanitaires permettant de définir la problématique, le lien entre ces formulations sera effectué au travers d'un état de l'art des méthodes d'analyse propres à la détection de pesticides dans les huiles essentielles.

A) Les Huiles Essentielles

Le terme « huile essentielle » est une contraction de l'expression « huile quintessentielle ». Son origine provient de l'idée aristotélicienne selon laquelle la matière est constituée de quatre éléments, à savoir : le feu, l'air, la terre et l'eau. Le cinquième élément, autrement nommé quintessence, était alors considéré comme étant l'esprit ou la force vitale. Dans le passé, les anciens assimilaient la distillation et l'évaporation, comme des procédés permettant d'extraire l'esprit de la plante. Cette pensée a traversé les âges puisque, de nos jours, le terme « spiritueux » est utilisé pour désigner les boissons alcooliques distillées telles que le rhum, le whisky et les eaux de vie. Cette dernière qualification fait une fois de plus référence au concept d'extraction de la force vitale de la plante. Au cours de la Renaissance, un médecin réformateur suisse du nom de Philippus Theophrastus Aureolus Bombastus Von Hohenheim - dit Paracelse (1493-1541) - donna un sens particulier au terme huile essentielle. Sa théorie le définit comme le dernier extrait possible le plus sublime correspondant à la « Quinta Essentia », le principe actif du médicament. L'isolation de cet extrait devrait être, selon lui, le but de la pharmacie.

L'histoire des huiles essentielles commence cependant 2000 à 3000 ans avant cette époque. Chez les Egyptiens, l'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient obtenus sous forme d'huiles distillées. L'art de la distillation, initié par les Egyptiens, Indiens et Perses, s'améliora grandement au cours du IX^{ème} siècle sous l'impulsion des Arabes avec, notamment, le développement de l'alambic attribué à Avicenne (980-1037). La science des huiles essentielles prit ensuite le large pour gagner l'Europe au cours des croisades durant le XIII^{ème} siècle. Le développement des procédés de production et des connaissances de ces extraits fut alors majoritairement mené par des pharmaciens. Durant les siècles qui suivirent, les huiles essentielles étaient principalement utilisées pour leurs vertus thérapeutiques et ne nécessitaient qu'une production minime, ce qui n'est plus le cas de nos jours.

Les huiles essentielles font désormais partie de notre quotidien, leurs utilisations s'étant généralisées dans de nombreux domaines, des industries pharmaceutiques et cosmétiques à l'agro-alimentaire, en passant par l'aromathérapie et les parfums d'ambiance, mais également en agriculture où elles sont utilisées en tant que pesticides naturels.

I. Généralités sur les huiles essentielles

Une huile essentielle ou essence se décrit communément comme un mélange de composés aromatiques extraits d'une plante. D'un point de vue réglementaire, selon la pharmacopée européenne, une **huile essentielle** est « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière végétale botaniquement définie, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».[36] Cette définition, basée sur les procédés d'extraction, est restrictive et exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants (**concrètes** et **absolues**)[37] que ceux obtenus par tout autre procédé (extraction par fluide supercritique (SFE), extraction micro-ondes sans solvant (SFME)).

La règne végétal offre une grande diversité permettant d'obtenir, aujourd'hui, 3 000 huiles essentielles parmi lesquelles environ 300 sont importantes d'un point de vue commercial.

I.1 Le matériel végétal d'origine

En pratique, les huiles essentielles sont principalement extraites de deux types de plantes : les hespéridés ou agrumes (citron, orange, bergamote…) et les plantes à parfums aromatiques et médicinales (PPAM). *A priori*, toutes les plantes possèdent la faculté de produire des composés volatils mais seulement à l'état de traces le plus souvent. La capacité à accumuler l'huile essentielle est cependant la propriété de certaines familles de plantes réparties au sein de l'ensemble du règne végétal, aussi bien représentées par la classe des gymnospermes *Cupressaceae* (bois de cèdre, genièvre) et *Pinacea* (pin et sapin) que celle des angiospermes ou plantes à fleurs. Les familles les plus importantes sont les dicotylédones comme l'*Apiacea* (anise verte, coriandre), l'*Asteracea* (camomille, absinthe), le *Genraniaceae* (géranium), l'*Illiciaceae* (anis étoilé), la *Lamiaceae* (menthe, lavande), la *Lauraceae* (camphre, cannelle), la *Myristicaceae* (noix), la *Myrtaceae* (eucalyptus, girofle), l'*Oleacea* (jasmin), la *Rosacea* (rose), la *Sandatalacea* (bois de santal) et bien sûre les *Rutacea* (citron, orange, bergamote). Les monocotylédones sont principalement représentées par les familles *Acoracea* (jonc), *Poacea* (vétiver) et *Zingiberaceae* (gingembre et cardamome).[1]

Les quantités d'huiles essentielles produites par les plantes sont minimes, entraînant des rendements d'extraction extrêmement faibles, généralement inférieurs à 2 %, mais pouvant

atteindre 50 % dans le cas de l'huile essentielle de baume.[38] Le rendement le plus faible est observé pour l'huile essentielle d'iris qui demande environ 4 kg de poudre d'iris pour obtenir 1 g d'absolue d'iris,[38] ce qui explique le tarif exorbitant de cette huile dont le prix au kilogramme atteint les 120 000 $.[1]

Selon l'espèce considérée, l'huile essentielle sécrétée par la plante est stockée dans divers organes tels que ceux illustrés dans la Figure 2.

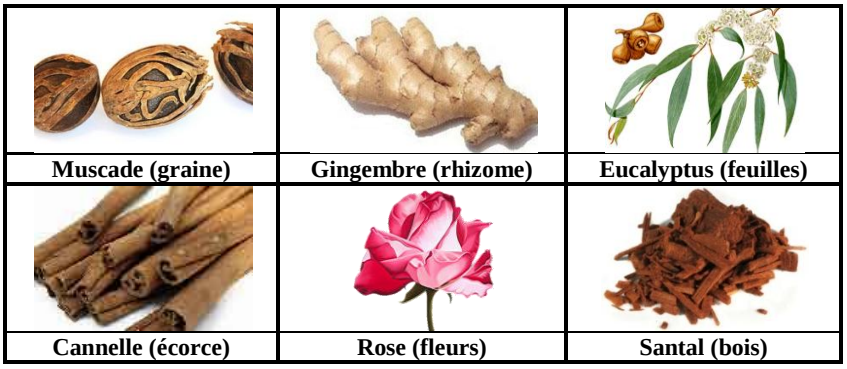


Figure 2. ***Illustration des principaux organes végétaux dont sont extraites les huiles essentielles***

Ainsi, une huile essentielle peut être extraite de racines (iris, vétiver), de bulbes (ail) ou de rhizomes (gingembre). Elle peut aussi être issue de la tige (petits grains), du bois (rose, cèdre, santal) ou encore de l'écorce (cannelle). Les feuilles (eucalyptus, citronnelle), les bourgeons (pin), la sève (myrrhe) et même les fleurs (ylang-ylang, rose), les fruits (orange) et les graines (muscade, anis) sont des sources d'huiles essentielles. Pour certaines huiles essentielles comme celles de lavande ou de sauge, c'est la plante entière qui est utilisée.

Pour certaines plantes, l'huile essentielle peut être extraite de plusieurs organes. Toutefois, si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, sa composition peut admettre des variations importantes selon sa localisation. Des différences sont ainsi notées pour les huiles essentielles extraites du bourgeon et des feuilles du girofle,[39] des feuilles et de la peau du pamplemousse[40] ou bien des racines et des feuilles du persil.[41] De même, il est important de souligner que le profil chimique d'une huile essentielle est directement relié à la procédure d'extraction employée.[42]

I.2 Méthodes d'extraction

Parmi les méthodes d'extraction disponibles, seuls deux procédés permettent d'obtenir des huiles essentielles conformes avec la pharmacopée européenne. Il s'agit de l'expression à froid et de la distillation. Leurs principes, résumés dans ce qui suit, sont décrits plus en détails dans le Handbook des huiles essentielles.[1] Bien qu'elles n'aboutissent pas à des huiles

essentielles au sens réglementaire, l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes et l'extraction en fluide supercritique sont deux méthodes d'extraction dont l'utilisation se généralise et qu'il convient donc de présenter.

D'un point de vue général, il est intéressant de noter que les huiles essentielles à notre disposition ne sont pas nécessairement identiques à celles produites par les plantes. Aussi poétique que soit l'idée qu'une huile essentielle puisse correspondre à l'esprit de la plante et donc être une réplique exacte de ce qui est présent dans le végétal, elle n'en demeure pas moins erronée, du moins le plus souvent. Les huiles essentielles subissent généralement des modifications de leur composition chimique lors du processus d'extraction causées par la chaleur ou bien par leurs interactions avec l'eau. En fait, seules les huiles essentielles issues de l'expression à froid n'ayant pas eu de contact avec le jus de fruit et protégées de l'oxydation pourraient correspondre à la véritable huile essentielle de la plante.

I.2.1. Expression à froid

Appliquée exclusivement à l'extraction des huiles essentielles d'agrumes, l'expression à froid consiste à rompre ou dilacérer les parois des sacs oléifères contenus dans le mésocarpe situé juste sous l'écorce du fruit, l'épicarpe (Figure 3).

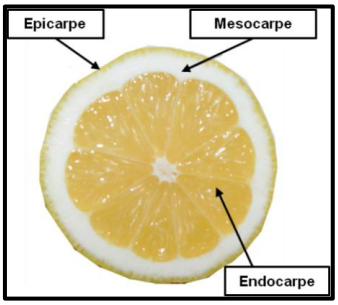


Figure 3. ***Photographie d'une coupe transversale d'un citron***

L'huile essentielle est également présente dans les cellules du jus de fruit en quantité beaucoup moins importante et avec une composition qui peut être différente de celle contenue dans les cellules du mésocarpe. Les huiles essentielles de citrus ont longtemps été extraites manuellement, la mécanisation et l'industrialisation de la technique d'expression à froid ne s'étant effectuées qu'au début du XX^{ème} siècle afin de diminuer les coûts de production et d'améliorer les rendements pour faire face à l'augmentation de la demande. Les systèmes récents comme la Food Machinery Corporation-in-line (FMC) permettent d'extraire le jus de fruit et l'huile essentielle de citrus de manière quasi-simultanée sans contact des deux. Le principe de la FMC est illustré dans la Figure 4.

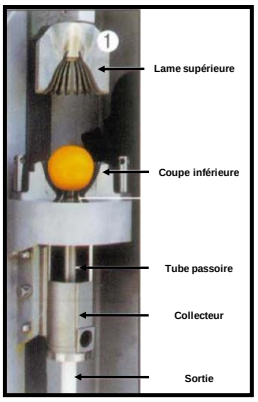


Figure 4. Photographie décrivant le principe de la FMC-in-line

Le procédé consiste d'abord à amener et fixer le fruit sur une coupe équipée de lames. Une seconde coupe, équivalente à la première, vient alors se fixer au fruit de manière à l'enfermer. Au même moment, un couteau circulaire creuse un trou à la base du fruit. L'application d'une pression sur les parois du fruit entraîne l'extraction du jus qui va être transporté jusqu'au collecteur pendant que l'huile est extraite de la peau et collectée à l'aide d'un jet d'eau. L'émulsion eau-huile est ensuite séparée par centrifugation. Cette technique présente l'avantage de pouvoir être couplée avec la production du jus de fruit qui constitue le produit commercial le plus important. C'est pourquoi l'expression à froid est la méthode de choix pour extraire les huiles essentielles de citrus, d'autant que la distillation n'est pas une technique très appropriée. En effet, la distillation produit des huiles essentielles de moindre qualité principalement due au fait d'une présence importante d'aldéhydes, composés sensibles à l'oxydation et à la chaleur. Pour les autres végétaux, la distillation à l'eau (hydrodistillation) ou par entraînement à la vapeur d'eau reste, sans aucun doute, la méthode la plus fréquente.[1]

I.2.2. Distillation

La méthode d'extraction des huiles essentielles la plus simple est l'hydrodistillation (Figure 5).

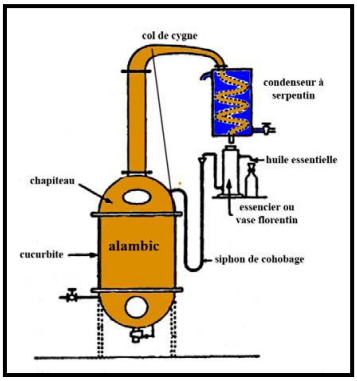


Figure 5. Représentation schématique du principe d'hydrodistillation traditionnelle

Elle consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau mis à ébullition. Les composés volatils contenus dans les cellules diffusent à travers les parois cellulaires (hydrodiffusion) sous l'action physique qu'exerce le gonflement de la matière végétale (phénomènes d'absorption d'eau ou osmotique), *via* la pression interne et l'action chimique de l'eau. Une fois diffusée en dehors des cellules, l'huile forme avec l'eau un système liquide-vapeur. La non-miscibilité des deux liquides confère au mélange la propriété d'avoir une température d'ébullition inférieure aux températures d'ébullition des deux liquides purs. Cette caractéristique explique la volatilisation des composés des huiles essentielles à une température d'environ 100°C. Une fois vaporisés, les composés sont transportés par le flux de vapeur d'eau refroidi plus loin et condensé dans un essencier ou un vase florentin. Lors de la décantation, la différence de densité entre l'eau et les composés aromatiques entraîne la formation d'une phase aqueuse et d'une phase organique : l'huile essentielle.

Cependant, le contact direct des constituants de l'huile essentielle avec l'eau occasionne des réactions chimiques conduisant à des changements dans la composition finale de l'extrait. Une attention particulière doit, notamment, être portée sur les huiles essentielles riches en esters (cas de la lavande et du lavandin) dont l'hydrolyse conduit à la formation d'alcools et d'acides. Pour éviter ce type de réactions, la matière première peut être séparée de l'eau dans la même enceinte à l'aide d'une grille, d'un panier ou, préférentiellement, dans un réservoir différent ; c'est la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (Figure 6).

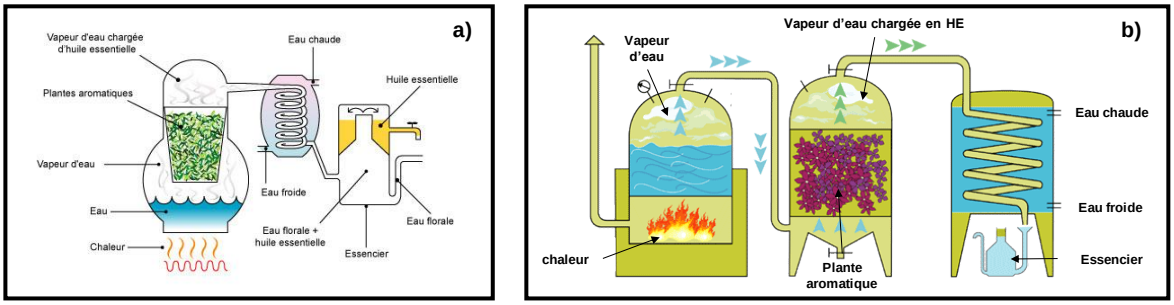


Figure 6. ***Représentation schématique du principe de la distillation par entrainement à la vapeur d'eau où le matériel végétal est séparé de l'eau, a) à l'aide d'un panier dans la même enceinte, b) dans un réservoir différent.***

Les conditions opératoires et, notamment, la durée de distillation ont une influence considérable sur le rendement et la composition de l'huile essentielle. C'est pourquoi sont développés, aujourd'hui, des modèles mathématiques qui permettent d'optimiser au mieux ces conditions afin de produire des huiles essentielles de manière reproductible.[43,44] Une amélioration significative de la durée de distillation peut être obtenue par une macération du

matériel végétal dans un bain d'ultrasons préalablement à la distillation,[45] ou bien avec l'utilisation assistée de micro-ondes.[46,47]

I.2.3. Extraction micro-ondes sans solvant (SFME)

L'emploi des micro-ondes constitue, par ailleurs, une méthode d'extraction à part entière en plein développement. La SFME est une combinaison originale des techniques de chauffage par micro-ondes et de distillation sèche.[48] Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant (Figure 7).

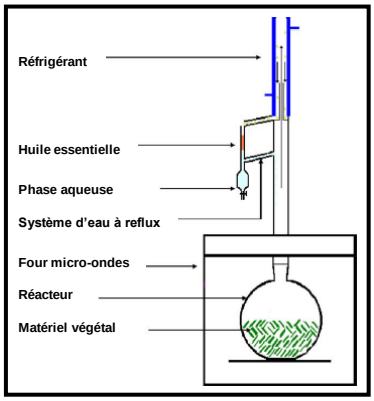


Figure 7. Description schématique du système d'extraction micro-ondes sans solvant[48]

Le chauffage interne de l'eau contenue dans la plante permet d'en dilater ses cellules et conduit à la rupture des glandes et des récipients oléifères. L'huile essentielle ainsi libérée est évaporée avec l'eau de la plante. Un système réfrigérant situé à l'extérieur du four à micro-ondes permet la condensation du distillat en continu. L'excès d'eau est réintroduit dans le réacteur de manière à restaurer la quantité d'eau initialement présente dans la plante. Comparée à l'hydrodistillation traditionnelle, la SFME se caractérise par une diminution de la consommation énergétique et des rejets en CO_2 mais, surtout, par un temps d'extraction de l'ordre de 9 fois plus rapide.[48] Dans le cas de l'extraction d'huiles essentielles provenant de plantes séchées, il est possible d'ajouter de la poudre de carbonyl de fer (CIP : Carbonyl Iron Powder) qui possède la propriété de très bien absorber les micro-ondes.[49] Les huiles essentielles issues de ce procédé sont composées d'un taux plus important de composés oxygénés, de valeurs odorantes plus significatives que les monoterpènes qui sont présents en moindre quantité.[48]

I.2.4. Extraction par fluide supercritique (SFE)

L'originalité de la technique d'extraction par fluide supercritique, dite SFE, provient de l'utilisation de solvants dans leur état supercritique, c'est-à-dire dans des conditions de

températures et de pressions où le solvant se trouve dans un état intermédiaire aux phases liquide et gazeuse et présente des propriétés physico-chimiques différentes, notamment un pouvoir de solvatation considérablement accru. Si, en pratique, de nombreux solvants peuvent être employés, 90 % des SFE sont réalisées avec le dioxyde de carbone, principalement pour des raisons pratiques.[50] En plus de sa facilité d'obtention due à ses pression et température critiques relativement basses, respectivement 74 bars et 31 °C, le CO_2 est relativement non-toxique, ininflammable, disponible à haute pureté et à faible prix et il possède l'avantage d'être éliminé aisément de l'extrait.[50] L'eau peut constituer un solvant alternatif au CO_2, par exemple dans le cas de l'extraction de l'huile essentielle de fenouil.[51] Mais, son utilisation est relativement limitée due à ses conditions d'obtention délicates (T = 374 °C ; P = 221 bars) et à la nature corrosive de l'eau.[50]

Généralement, la matière première est disposée en un lit fixe dans une enceinte d'extraction (extracteur). Le flux de solvant supercritique est alimenté, en continu ou non, à l'aide d'une pompe haute pression à débit fixe.[52] La séparation entre le solvant et le soluté pour obtenir l'extrait est réalisée par simple détente (diminution de la pression) qui ramène le solvant à l'état gazeux et fait précipiter le soluté ; cette étape peut être effectuée en plusieurs temps. Les systèmes industriels permettent un recyclage du CO_2 (Figure 8).

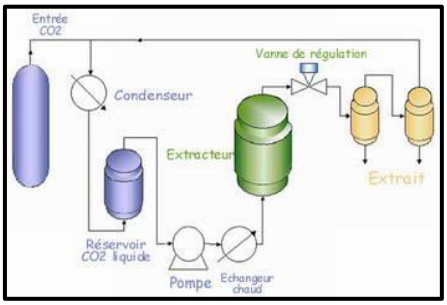


Figure 8. Représentation schématique du principe SFE

La SFE est une technique dite « verte » utilisant pas ou peu de solvant organique et présentant l'avantage d'être bien plus rapide que les méthodes traditionnelles, en offrant également la possibilité de manipuler la composition de l'extrait. Les compositions chimiques des huiles essentielles ainsi obtenues peuvent présenter des différences qualitatives[53] et quantitatives[54] avec celles issues de l'hydrodistillation.

I.2.5. Conclusion

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut être réalisée au moyen de plusieurs procédés, basés sur des techniques anciennes : l'expression à froid, l'hydrodistillation et l'entrainement à la vapeur d'eau, ou plus récentes : extraction micro-

ondes sans solvant (SFME) et extraction par fluide supercritique (SFE). Ces dernières, bien que présentant de nombreux avantages, notamment celui de réduire considérablement le temps d'extraction, ne sont pas, pour l'instant, reconnues par la pharmacopée. En effet, la composition des huiles essentielles obtenues avec ces techniques peuvent être sensiblement différentes des huiles essentielles issues de la distillation qui reste la méthode de référence. Cependant, quel que soit le procédé utilisé, l'extrait final correspond à une concentration des composés initialement présents dans la matière première.

De plus, les méthodes de production tout comme l'origine géographique, le climat, le sol, la période de récolte ou bien encore les pratiques agriculturales, peuvent avoir une influence directe sur la composition chimique d'une huile essentielle.[1]

I.3 Composition Chimique

D'un point de vue général, une huile essentielle se définit chimiquement comme un mélange complexe constitué d'environ 20-60 composés à des concentrations différentes appartenant majoritairement à deux groupes. Il s'agit des terpènes et terpénoïdes, représentant la classe la plus importante et des composés aromatiques et aliphatiques qui sont, tous, des composés de faible poids moléculaire.[55]

I.3.1. Les terpènes et terpénoïdes

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représentés et d'un intérêt chimique considérable. Bien que de structures très diverses, les terpènes ont un caractère commun : ils sont tous formés par la réunion d'unités isopréniques (Schéma 1).

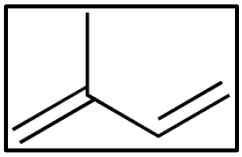


Schéma 1. Formule de l'isoprène (C_5H_6)

Une classification rationnelle est basée sur le nombre d'unités isopréniques qu'ils renferment. On définit alors les hémiterpènes (1 unité C_5), les monoterpènes (2 unités : C_{10}), les sesquiterpènes (3 unités : C_{15}), les diterpènes (4 unités : C_{20}), les sesterpènes (5 unités : C_{25}), les triterpènes (6 unités : C_{30}), les carotènes (8 unités : C_{40}) et les polyisoprènes (n unités : C_{5n}). Un terpène qui possède un oxygène est un terpénoïde. A noter que le terme terpène, anciennement employé pour caractériser l'ensemble de la classe des terpénoïdes, a une définition aujourd'hui plus restreinte et ne s'adresse qu'aux (mono)-terpénoïdes

hydrocarbonés.[1] Dans le cas des huiles essentielles, seuls sont rencontrés les terpénoïdes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, principalement les mono- et sesquiterpénoïdes et, beaucoup plus rarement, les diterpénoïdes. Les monoterpénoïdes représentent à eux seuls environ 90 % des huiles essentielles.[55]

Les terpénoïdes se caractérisent par une grande variété de structures dont certaines sont regroupées dans le Schéma 2 :

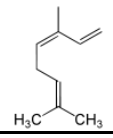
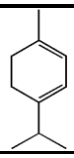
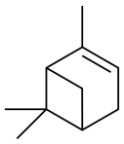
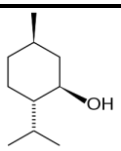
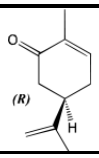
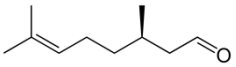
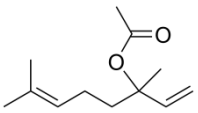
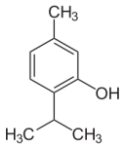
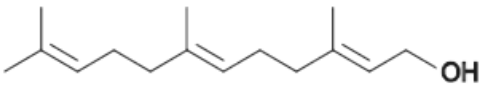
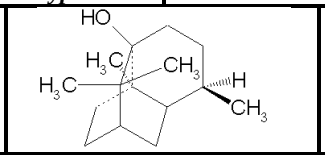
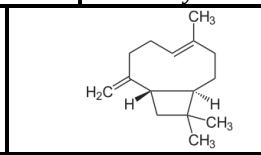
				
Ocimène	***α-terpinène***	***α-pinène***	***(+)-menthol***	***R-carvone***
				
Citronellal	***Acétate de linalyle***	***Eucalyptol***	***Ascaridole***	***Thymol***
				
Farnésole	***Patchoulol***	***β-caryophyllène***		

Schéma 2. Représentation de molécules caractéristiques des différentes structures rencontrées chez les mono- et sesquiterpénoïdes

Ces structures diffèrent par :

- le nombre de carbones qui les constituent :
  - C_{10} : monoterpènes,
  - C_{15} : sesquiterpènes,
  - C_{20} : diterpènes.
- le caractère saturé ou insaturé des liaisons ;
- l'agencement linéaire (ocimène), monocyclique (α-terpinène) ou bicyclique (pinène) des atomes ;
- la configuration spatiale (forme de chaise, bateau…) ;
- la nature du groupe fonctionnel :
  - Alcène : CH_2=CH_2,
  - Alcool R-OH (menthol),
  - Cétone : R_1-CO-R_2 (carvone),
  - Aldéhyde : R-COH (citronellal),
  - Ester : R_1-COO-R_2 (acetate de linalyl),
  - Ether : R_1-O-R_2 (eucalyptol),
  - Péroxide : R_1-O-O-R_2 (ascaridol),
  - Phénol : C_6H_6-OH (thymol).

Si les composés terpéniques sont les constituants majoritaires des huiles essentielles, les molécules aromatiques n'en demeurent pas moins des composés importants, à l'exemple du cinnamaldéhyde qui représente environ 75 % de l'huile essentielle de cannelle.[38]

I.3.2. Les composés aromatiques

Les composés aromatiques des huiles essentielles sont principalement des dérivés du phénylpropane C_6-C_3 (Schéma 3), parmi lesquels se trouvent des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des phénols (chavicol, eugenol), des dérivés méthoxy (anethol, estragol) ou methylène dioxy (myristicine, safrol).[37]

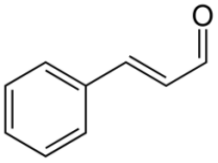
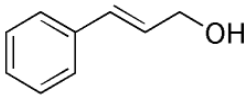
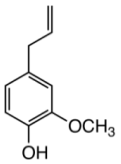
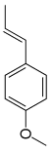
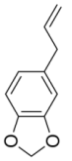
				
Cinnamaldéhyde	***Alcool cinnamique***	***Eugenol***	***Anéthole***	***Safrol***

Schéma 3. Exemples de composés aromatiques C_6-C_3 caractéristiques des huiles essentielles

Il est cependant possible de rencontrer des C_6-C_1, comme la vanilline et l'anthranilate de méthyl (Schéma 4), ainsi que des lactones qui proviennent des coumarines, ces dernières étant effectivement entraînables par la vapeur d'eau.[37]

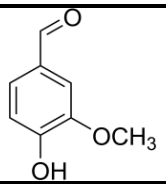
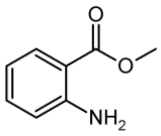
	
Vanilline	***Anthranilate de methyle***

Schéma 4. Exemples de composés aromatiques C_6-C_1rencontrés dans les huiles essentielles

Outre les terpénoïdes et les composés aromatiques, les huiles essentielles sont également constituées de nombreuses molécules d'origines diverses. Il s'agit, pour la plupart, de produits de dégradation d'acide gras et de terpènes. Si la concentration de ces composés est généralement très faible, ils peuvent cependant avoir une influence considérable à l'exemple de la β-damascenone et la β-ionone. Ces deux molécules, issues de la dégradation des terpènes, ne représentent respectivement que 0,14 % et 0,04 % de l'huile essentielle de rose (*rosa damascena*). Ils sont pourtant les contributeurs majoritaires de l'odeur de cette huile.[56]

I.3.3. Conclusion

Généralement, les huiles essentielles sont constituées par deux ou trois composés majoritaires, représentant entre 20 et 70 % de l'extrait, comme le montre le Tableau 1 pour les huiles essentielles de bergamote, lavandin grosso, citron, eucalyptus et menthe poivrée. Les autres molécules, qui peuvent être très nombreuses, ne sont présentes qu'à l'état de traces.

Huile essentielle	**Composés majoritaires**
Bergamote	• Limonène (33-42 %) • Acétate de linalyl (23-35 %) • Linalol (6-15 %) • γ-terpinène (6-10 %)
Lavandin grosso	• Acétate de linalyl (28-38 %) • Linalol (24-35 %)
Citron	• Limonène (54-80 %)
Eucalyptus	• Pipéritone (40-50 %) • α-phellandrène (20-40 %)
Menthe poivrée	• (-)-menthol (25-40 %) • (-) menthone (5-25 %)

Tableau 1. Liste non exhaustive des composés majoritaires de quelques huiles essentielles d'après J.Garnero[38]

La composition chimique particulière des huiles essentielles leur confère, outre leurs propriétés physico-chimiques, deux caractéristiques intéressantes, à savoir : un pouvoir odorant et aromatisant et des propriétés antimicrobiennes. Si la richesse en composés volatils explique leurs caractéristiques odorantes,[57] il semblerait que leurs activités antimicrobiennes soient issues principalement des phénols.[58] Ces deux spécificités, aux intérêts économiques considérables, sont à l'origine de l'engouement actuel pour ces extraits.

II. Les huiles essentielles : le marché et le contrôle analytique

Le marché des huiles essentielles est en pleine croissance et génère actuellement plusieurs milliards de dollars chaque année, le prix d'une huile essentielle se négociant entre 1,80 $/kg pour celle d'orange à 120 000 $/kg pour celle d'iris. Parmi les 300 000 espèces de plantes estimées, environ 10 % contiennent des huiles essentielles. Chaque continent et région possède sa propre flore et donc une production d'huiles essentielles caractéristiques. En revanche, si l'ensemble des pays du globe participent à la production d'huile essentielle (Annexe 1), ce marché est essentiellement dominé par cinq pays (Figure 9).

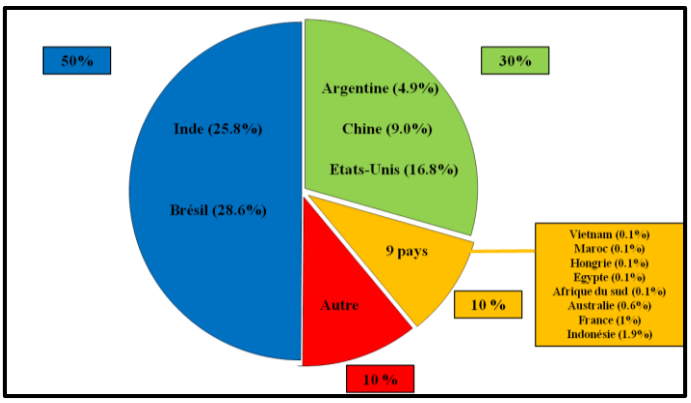


Figure 9. Diagramme illustrant la répartition mondiale de la production d'huile essentielle par pays en 2008[1]

En 2008, le Brésil et l'Inde se partageaient la moitié de ce marché avec des productions respectives de 28,6 % et 25,6 %. Suivent ensuite pour un tiers du marché les Etats-Unis, la Chine et l'Argentine avec des productions atteignant respectivement 16,8 %, 9,0 % et 4,9 %. Neuf pays avec des productions internes entre 0,1 et 2 % (France : 1 %) pèsent pour 10 % dans le marché. Enfin, les derniers 10 % se répartissent entre les autres pays du monde avec une production individuelle inférieure à 0,1 %.

Les huiles essentielles dominant le marché en termes de quantité produite sont celles d'orange (51 000 t), de menthe poivrée (32 000 t) et de citron (9 200 t). L'huile essentielle de lavandin grosso, principalement produite en France, occupe le 12ème rang avec une production annuelle de 1 100 t.[59]

L'importance et le développement du marché des huiles essentielles s'expliquent par le nombre et la diversité des domaines d'application de ces extraits. Ils induisent aussi la nécessité de proposer des méthodes de contrôle analytique garantissant leurs caractéristiques.

II.1 Les domaines d'application

La composition chimique des huiles essentielles confère à ces extraits aussi bien des propriétés odorantes et aromatiques qu'antimicrobiennes. Ces caractéristiques offrent des débouchés importants dans de nombreux domaines industriels, que ce soit dans l'industrie cosmétique, les secteurs de la santé, de l'agro-alimentaire ou de l'agriculture.

II.1.1. Parfums et Cosmétiques

Dans le domaine des parfums et cosmétiques, les huiles essentielles sont employées en tant qu'agents conservateurs grâce à leurs propriétés antimicrobiennes qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit. Cependant, c'est surtout pour leurs caractéristiques odorantes qu'elles sont utilisées, notamment dans la formulation de parfums, de produits d'entretien personnels ou ménagers.[60] Pour constater l'ampleur de leur utilisation dans ce marché, il suffit d'étudier, chez soi, la composition des produits de consommation courante tels que les shampooings, savons, eaux de toilette, liquides vaisselle ou nettoyants de surface. A noter que le terme « huile essentielle » n'est pas employé ; le Code de la santé publique (article R.5131-4 8°) impose, en effet, les mots « aroma » ou « parfum » (« fragrance » en anglais) qui englobent l'ensemble des compositions aromatiques ou parfumantes et leurs matières premières.[61] En plus des huiles essentielles, il peut s'agir de concrètes, d'absolues, mais également d'un ou plusieurs constituants extraits d'une huile essentielle, comme le limonène. Toutefois, dans le cas où la substance utilisée fait partie de la liste des 26 molécules identifiées comme étant susceptibles d'entraîner des réactions allergiques telles que le citral, le géraniol ou linalol (Annexe 2), sa dénomination (chimique, n°CAS, IUPAC) doit être inscrite parmi la liste des ingrédients.

II.1.2. Santé : pharmacie et aromathérapie

Les vertus thérapeutiques des PPAM et des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis très longtemps, notamment en Asie où ces produits naturels constituent la base de la médecine traditionnelle. Il est donc logique de retrouver les huiles essentielles dans le domaine de la santé avec des applications pharmaceutiques et aromathérapiques. En pharmacie, les huiles essentielles sont majoritairement destinées à l'aromatisation des formes médicamenteuses et à la production d'antiseptiques.[37] Le potentiel thérapeutique des huiles essentielles dépasse, cependant, ce cadre et fait l'objet de nombreuses recherches synthétisées en 2007 par Edris.[62] Ce travail met en évidence les bienfaits des huiles essentielles et de leurs

constituants volatils dans le traitement du cancer et des problèmes cardiovasculaires. De même, leurs propriétés antibactériennes et antivirales trouvent de nombreuses applications dans la lutte contre les infections bactériennes et virales, en particulier dans le milieu hospitalier. De possibles applications dans la lutte contre le stress oxydatif, le diabète, sont également exposées.[62] Enfin, la propriété des huiles essentielles à pénétrer aisément dans la peau (principalement due aux terpènes) permettrait de faciliter l'administration des médicaments par voie transdermique.[62] Si les huiles essentielles trouvent des applications importantes dans la médecine dite conventionnelle ou scientifique, leurs bienfaits constituent la base d'un autre domaine de la santé qui se rapproche plus de la médecine traditionnelle : l'aromathérapie.

D'un point de vue étymologique, l'aromathérapie se définit (*étym* : latin « aroma », grec « ἄρωμα - arôma » = arôme, aromate ; grec « θεραπεία - therapeia » = soin, cure) comme étant le soin du corps par des extraits aromatiques de plantes, ce qui la différencie de la phytothérapie qui fait usage de l'ensemble des éléments d'une plante. En fait, la définition de ce terme inventé dans les années 1920 par René-Maurice GATTEFOSSSE, considéré comme le père de l'aromathérapie, prête à discussion. Selon les auteurs, l'aromathérapie correspond à l'utilisation des odeurs et des substances volatiles pour soigner, atténuer ou prévenir les infections et les indispositions uniquement par le moyen d'inhalation.[63] Pour d'autres, l'utilisation des huiles essentielles se fait par application sur la peau au travers de massages.[64] Quoiqu'il en soit, le marché de l'aromathérapie et de ses dérivés est en pleine expansion, notamment à travers le développement de salons de massages, de bien-être et d'ouvrages consacrés à cet art. Cette pratique a d'ailleurs tendance à s'individualiser à travers la publication de guides ou manuels d'utilisation des huiles essentielles référençant l'ensemble des vertus de ces extraits, ainsi que des diverses méthodes de préparation pour les mettre en pratique chez soi.

II.1.3. Agro-alimentaire

L'ensemble des secteurs de l'agro-alimentaire sont consommateurs d'huiles essentielles : alcools, boissons non alcoolisées, confiserie, produits laitiers, produits carnés, sauces, soupes, snacks, produits de boulangerie mais également la nutrition animale.[37] Les huiles essentielles ou leurs isolats sont employés aussi bien pour leurs propriétés antibactériennes qu'aromatisantes. Les premières permettent aux huiles essentielles de jouer le rôle de conservateurs alimentaires.[65,66] Cette application, déjà bien développée se renforce ces dernières années grâce à des décisions de sécurité importante ; par exemple la

recommandation portant sur la réduction du sel dans les aliments pour limiter les problèmes cardio-vasculaires et préconisée par la World Health Organisation (WHO) en 2002.[67] Ceci engage les industriels à trouver des additifs de substitution permettant d'assurer la sécurité alimentaire.[65] De plus, la tendance actuelle à consommer du « naturel » ainsi qu'un développement du goût de l'exotisme de la part de la population poussent les industriels à utiliser de plus en plus les huiles essentielles en temps qu'additifs aromatisants. Ce retour au naturel est lié à une prise de conscience générale tournée vers la protection de l'environnement avec, entre autres, la réduction de la consommation en produits phytosanitaires de synthèse et le développement de l'agriculture biologique. Dans ce contexte, les huiles essentielles constituent, une fois de plus, une voie d'intérêt et de recherche.

II.1.4. Agriculture

La volonté de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse dans l'agriculture moderne s'est affermie ces dernières années, notamment en France avec l'intervention des politiques. Le Grenelle de l'Environnement est un bon exemple de la prise de conscience environnementale de la part des politiques et de la population en général. Cette organisation réunit des membres issus du monde politique et de la société civile, dont le but est d'établir une feuille de route en faveur de l'écologie, du développement et de l'aménagement durables. Concernant les pesticides, l'un des projets de loi vise à réduire la consommation en produits phytosanitaires de 50 % en dix ans, l'échéance étant 2018.[68]

Dans ce contexte environnemental, les pesticides naturels basés, notamment, sur les huiles essentielles représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes mais également contre les **adventices** et les champignons.[69-71] Outre leurs activités biologiques, les huiles essentielles présentent d'autres caractéristiques qui en font des produits adaptés dans la lutte contre les nuisibles.[72] Parmi celles-ci, on peut citer :

- leur prix faible et approvisionnement assurés par une production mondiale importante pour de nombreuses huiles essentielles ;
- leurs multiples modes et sites d'action sur les insectes ;
- leur faible toxicité pour les mammifères (à quelques rares exceptions près) ;
- leur faible persistance dans l'environnement due à leur volatilité (temps de demi-vie en extérieur < 24 h sur les surfaces, dans les sols ou l'eau).

II.1.5. Conclusion

Les huiles essentielles sont devenues, ces dernières années, une matière d'importance économique considérable, avec un marché en constante croissance dont les domaines d'application sont directement liés à la consommation humaine. C'est pourquoi, ces extraits font l'objet de nombreuses analyses dont les objectifs principaux sont la caractérisation des substances composant l'huile essentielle ou la découverte de nouvelles molécules, mais également le contrôle qualité et la recherche d'adultération dans un milieu où la fraude est tentante, notamment à cause des enjeux économiques.

II.2 Le contrôle analytique des huiles essentielles

Les huiles essentielles doivent répondre à des caractéristiques imposées par les lois des pays producteurs et exportateurs et par les pays importateurs. Ces critères sont définis dans des normes internationales ISO (International Organisation for Standardization) ou françaises AFNOR (Association Française de Normalisation). Ainsi sont contrôlées les propriétés organoleptiques et physiques telles que la coloration, l'odeur, la réfraction, la solubilité, le point éclair mais également les propriétés chimiques telles que les indices d'acides et d'esters. La meilleure carte d'identité qualitative et quantitative d'une huile essentielle reste cependant son profil chromatographique réalisé en chromatographie en phase gazeuse, même si d'autres techniques alternatives sont utilisées. En effet, malgré les importantes innovations instrumentales réalisées ces dernières années, la détection de tous les constituants d'une huile essentielle reste une tâche extrêmement difficile qui nécessite souvent l'emploi de plusieurs techniques analytiques complémentaires.

II.2.1. Analyse conventionnelle par chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est une technique parfaitement adaptée à l'analyse des huiles essentielles au vu de leur composition chimique, caractérisée principalement par la présence de molécules volatiles. Les analyses peuvent être réalisées sur colonnes remplies (NF T75-400)[73] ou sur colonnes capillaires (NF T75-401)[74] de polarités diverses. Les détecteurs utilisés sont généralement des détecteurs à ionisation de flamme (FID) ou à conductivité thermique (TCD) et ne fournissent pas d'informations structurales. L'attribution des pics s'effectue alors grâce au système d'indices de rétention. Il se base sur le fait que la position de chaque pic d'analyte est encadrée par le temps de rétention de deux alcanes linéaires (*n*-alcanes) aux nombres de carbones successifs. Les indices de rétention sont

calculés à partir du modèle de Kovats[75] pour des analyses en conditions isothermes[76] et du modèle de Dool et Kratz[77] pour des analyses utilisant la programmation de température.[78]

Pharmacopées et normes renseignent, à la fois, sur le chromatogramme type de l'huile essentielle obtenu en GC qui est purement informatif (Figure 10) et sur son profil chromatographique qui, lui, est normatif (Tableau 2).

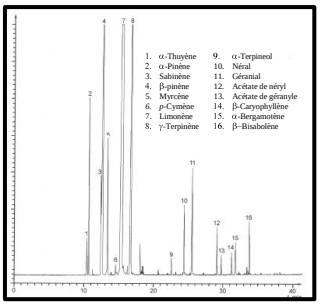


Figure 10. Chromatogramme type de l'huile essentielle de citron [Citrus Lmon (L.)Burm.f.][79]

Constituants	Type américain				Type méditerranéen				Type Equatorial	
	Type côtier		Type désertique		Espagne		Italie		Côte d'Ivoire, Brésil	
	Min (%)	Max (%)	Min (%)	Max (%)	Min (%)	Max (%)	Min (%)	Max (%)	Min (%)	Max (%)
α-Thuyène	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5
α-Pinène	1,5	2,5	1,4	2,5	1,5	3,0	1,5	3,0	1,4	3,0
Sabinène	1,5	2,5	1,3	2,5	1,5	2,5	1,5	2,5	1,4	3,0
β-Pinène	9,0	14	10,0	13,0	10,0	16,5	10,0	16,5	7,0	16,0
p-Cymène	0,05	0,35	0,01	0,35	traces	0,40	0,05	0,35	0,05	0,35
Limonène	63,0	70,0	70,0	80,0	60,0	70,0	60,0	68,0	59,0	75,0
γ-Terpinène	8,3	9,5	6,5	8,0	8,0	12,0	8,0	12,0	6,0	12,0
α-Terpineol	0,10	0,25	0,06	0,15	0,09	0,35	0,10	0,30	0,00	0,40
Néral	0,6	0,9	0,3	0,3	0,4	1,0	0,6	1,2	0,2	1,2
Géranial	1,0	2,0	0,5	0,9	0,6	2,0	0,8	2,0	0,5	2,0
β-Bisabolène	0,45	0,9	0,4	0,7	0,45	0,9	0,45	0,9	0,2	0,9
Acétate de néryle	0,35	0,60	0,30	0,50	0,30	0,60	0,20	0,50	0,10	0,50
Acétate de géranyl	0,20	0,50	0,10	0,30	0,20	0,65	0,30	0,65	traces	0,30

Tableau 2. Profil chromatographique de l'huile essentielle de citron [Citrus Lmon (L.)Burm.f.][79]

Le profil chromatographique d'une huile essentielle correspond à la liste de ses constituants sélectionnés parmi ceux qui sont représentatifs et caractéristiques. Cette liste est accompagnée des limites de concentration des constituants et éventuellement des rapports entre leurs concentrations. La qualité de l'identification peut être améliorée considérablement par l'apport d'un couplage de la chromatographie gazeuse avec la spectrométrie de masse. La combinaison de ces deux techniques permet la séparation et l'identification de molécules dans des mélanges complexes.

La spectrométrie de masse consiste à produire des ions en phases gazeuses, intacts ou dissociés en les séparant en fonction de leur rapport masse sur nombre de charge (*m/z*). La technique d'ionisation principalement utilisée dans l'analyse des huiles essentielles est

l'ionisation électronique (EI) qui permet d'obtenir des spectres de masses caractéristiques de la molécule avec un nombre important de fragments. L'ionisation chimique (CI), technique d'ionisation plus douce et complémentaire de l'EI, est également employée pour accéder à d'autres informations spectrales, notamment l'observation du pic moléculaire parfois absent des spectres obtenus en EI. En fonction du gaz ionisant utilisé, la CI permet de différencier divers isomères pinaniques[80] ou de déterminer la position de la double liaison dans des molécules dièniques conjuguées.[81]

Si la complémentarité des techniques d'ionisation peut être utile pour l'identification de molécules, l'association de plusieurs analyseurs de masse en série apporte également une aide précieuse. En effet, bien que la GC-MS soit adaptée à l'analyse de mélanges complexes, il n'est pas rare qu'un seul pic chromatographique contienne plusieurs composés (**co-élution**), ce qui complique d'autant le spectre de masse correspondant. La spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS est alors une technique de choix qui permet d'analyser, séparément, les composés contenus dans ces pics et de déterminer leur structure grâce à leur fragmentation spécifique, par exemple dans le cas complexe de l'huile essentielle de vétiver.[82]

II.2.2. Les techniques chromatographiques avancées

Un point important dans le cadre d'analyse de routine concerne la durée d'analyse qui a un impact direct sur son coût. Classiquement, la durée de séparation des composés d'une huile essentielle par GC réalisée sur une colonne capillaire standard (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) est de 40 à 50 minutes. La mise au point de colonnes de taille réduite permet désormais de faire de la « Fast-GC » et ainsi de réduire considérablement la durée d'analyse. L'emploi de ce type de colonne (10 m × 0,1 mm × 0,1 µm) dans le cadre d'analyse d'huiles essentielles de citrus par GC-FID[83] et de menthe poivrée par GC-MS,[84] a permis de diminuer le temps d'analyse respectivement d'un facteur 5 et 10, tout en conservant des données de qualités analytiques similaires (largeur de pic, résolution, sélectivité, reproductibilité).[83] Cependant, ni la séparation chromatographique sur colonne apolaire, ni la spectrométrie de masse en EI ne permettent de distinguer des molécules énantiomères dont les huiles essentielles sont généralement pourvues.

Ces molécules, de même formule brute, ne se distinguent que par leur organisation spatiale et présentent donc, non seulement des propriétés physico-chimiques similaires, mais également des spectres de masse identiques. La caractérisation de ces molécules dans les huiles essentielles est réalisée par chromatographie gazeuse énantiosélective (GC-Es)[85] qui utilise des phases stationnaires chirales à base de dérivés de cyclodextrines (CD).[86] De même

que pour la GC classique, le développement de colonnes adaptées à la Fast-GC[87] permet désormais de réduire considérablement le temps d'analyse.[88]

L'arrivée de la chromatographie en phase gazeuse multidimensionnelle (MDGC) permet désormais d'effectuer les deux types de séparations décrites ci-dessus en une analyse unique. Le principe consiste à sélectionner les fractions d'intérêt à l'aide d'une première colonne chromatographique (reliée à un premier détecteur) afin de les diriger vers une seconde colonne de polarité différente (reliée à un second détecteur).[89] En combinant deux colonnes capillaires, apolaire et chirale, de taille similaire (30 m × 0,32 mm × 0,40-0,45 µm / 25 m × 0,25 mm × 0,25 µm), Mondello *et al.* ont pu déterminer la distribution énantiomérique en monoterpernes et terpénoïdes alcoolisés des huiles essentielles de citron,[90] citron vert[91] et mandarine (Figure 11).[92]

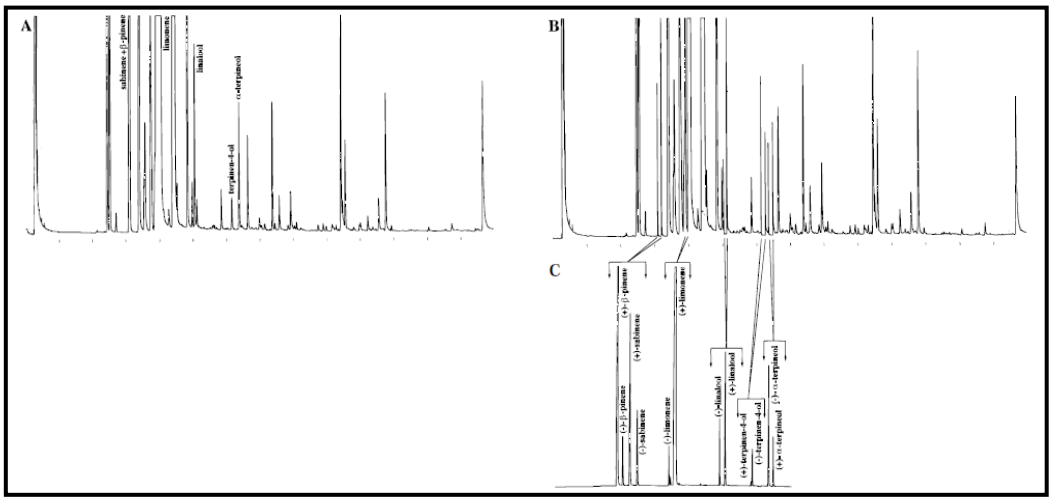


Figure 11. Chromatogrammes issus d'une séparation en phase gazeuse des constituants d'huile essentielle de mandarine A) obtenu avec la colonne SE-52 B) obtenu avec la colonne SE-52 avec 5 fractions coupées C) obtenu avec la colonne chiral MEGADEXDETTBSβ des composés transférés en GC-GC [92]

Toutefois, une telle configuration ne permet d'obtenir une analyse ^{2}D que pour quelques régions du chromatogramme. Pour atteindre une caractérisation complète d'un échantillon en ^{2}D, une approche détaillée telle que la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GC×GC) ou compréhensive GC doit être utilisée.

La GC×GC peut être définie comme « une séparation orthogonale sur deux colonnes, avec un transfert complet des solutés issus du premier système de séparation (colonne 1) dans le deuxième système de séparation (colonne 2), de telle sorte que les performances de chaque système de séparation soit préservées ».[93] Diverses combinaisons de colonnes de sélectivités

différentes peuvent être envisagées en fonction de l'objectif de l'analyse. Dans le cadre de la caractérisation complète des constituants d'une huile essentielle, la combinaison retenue est généralement une colonne apolaire (95 % Dimethylpolysiloxane/5 % Diphenyl) suivie d'une colonne polaire (PEG). L'emploi de cette technique a permis la détection de 203 composés dans l'huile essentielle de lavande dont le chromatogramme ^{2}D est présenté en Figure 12.[94]

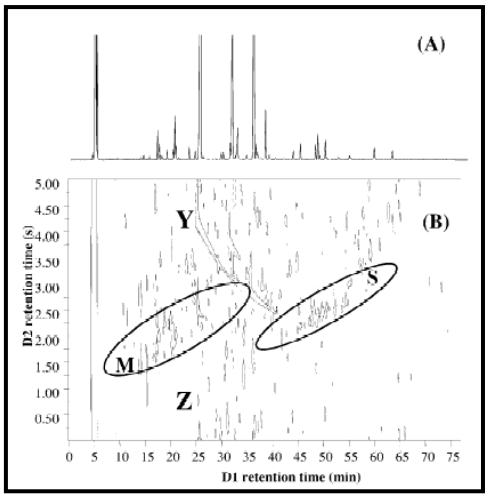


Figure 12. Chromatogramme ^{1}D (A) et ^{2}D (B) d'une huile essentielle de lavande[94]

Le chromatogramme ^{2}D permet de détecter de nombreux composés non résolus dans la première dimension à l'exemple des composés minoritaire Z et majoritaire Y. Ce profil permet également de définir des régions chimiques M (Monoterpènes) et S (Sesquiterpènes).

II.2.3. Le couplage entre les chromatographies gazeuse et liquide

La chromatographie en phase gazeuse, sous toutes ses déclinaisons couvre la grande majorité des analyses d'huiles essentielles. Cependant, la chromatographie en phase liquide présente également quelques applications dans ce domaine. Elles sont généralement limitées à l'analyse de certaines fractions ou classes de composés particuliers, par exemple la détermination des composés oxygénés (coumarines, flavonoïdes) présents dans la fraction non volatile des huiles essentielles d'hespéridés.[95-98] Elle permet également, dans certains cas, d'identifier des composés inconnus non détectables par GC.[99]

A l'image de la GC, la séparation LC peut être conduite en ^{2}D (LC×LC). La mise en place d'une séparation orthogonale faisant intervenir la chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) et phase normale (NPLC) n'est cependant pas aisée. Les difficultés proviennent de la non miscibilité des phases mobiles utilisées dans ces deux modes et de leur différence de force éluante.[100] Néanmoins, cette technique a pu être appliquée avec succès pour analyser les

composés oxygénés dans l'huile essentielle de citron[101] et les caroténoïdes dans celle d'orange sanguine.[102]

Les performances séparatives uniques des techniques de GC et LC peuvent être associées à travers leur couplage en ligne.[103] Ce couplage a démontré son utilité pour l'identification de terpènes,[104] la qualification d'excès énantiomérique,[105] mais aussi dans la détermination de composés inconnus d'une huile essentielle très complexe, celle de néroli.[106]

II.2.4. Les principaux détecteurs

Les détecteurs classiquement utilisés sont le FID[83,90,91,94,99,106-109] pour la GC et le spectromètre UV pour l'HPLC.[95-97,101] Le couplage avec la spectrométrie de masse est généralement réalisé avec un simple quadripôle.[76,82-84,88,93,96,97,99,108,110,111] Le TOF (Time of Flight),[112] le triple quadripôle (QqQ),[82] le QTOF,[113] ainsi que la LTQ-Orbitrap[99] sont également employés. L'utilisation du secteur magnétique est restreinte à l'analyse de ratio isotopique qui permet de contrôler l'authenticité de l'huile essentielle.[107,109,114] Toutefois, la réponse fournie par ces détecteurs chimiques ne permet pas d'établir une relation directe entre la concentration des composés détectés et l'activité odorante de l'huile essentielle, les composés majoritaires n'étant pas toujours les principaux responsables de l'odeur.[112] Un détecteur, que nous utilisons au quotidien, paraît tout à fait adapté à l'accomplissement de cette tâche : le nez. L'identification de l'impact des composés sur le caractère odorant de l'huile essentielle est réalisée par la technique de GC-Olfactométrie (GC-O) qui consiste à renifler les composés élués de la colonne chromatographique afin de les détecter et de les évaluer.[115] Les performances de cette technique peuvent être nettement améliorées avec l'emploi de la MDGC et GC×GC[112,115] qui permettent la séparation des composés odorants co-élués. L'emploi de la GC-O a, entre autres, permis d'établir le profil odorant des huiles essentielles de citron vert[116] et de coriandre,[117] ou de mettre en évidence les différences aromatiques entre les huiles essentielles de coriandre et coriandre sauvage[112] ainsi que de celles de deux clones de thym.[118]

Enfin, il important de mentionner les performances de la RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire) pour l'identification et l'élucidation de structures de composés inconnus. Basée sur la résonnance des atomes d'hydrogènes et de carbones, elle donne diverses informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules.[119] Bien que la RMN ^{1}H soit utilisée dans l'analyse des huiles essentielles,[98] c'est la RMN ^{13}C qui est généralement employée.[99,111,120,121] L'analyse par RMN est effectuée avec[111] ou sans[121] fractionnement préalable de l'huile essentielle. L'identification des composés est réalisée sur la base d'une

comparaison entre les spectres des composés inconnus et ceux d'une bibliothèque de référence.

De nombreuses méthodes d'analyses, principalement basées sur la séparation chromatographique, sont donc à disposition pour l'analyse des huiles essentielles mais aucune d'elles ne permet, à elle seule, de caractériser complètement une huile essentielle. C'est pourquoi, en pratique, l'emploi de plusieurs de ces méthodes est généralement observé pour l'analyse d'une huile essentielle et est fonction de l'objectif de l'analyse : caractérisation globale, caractérisation approfondie, recherche de composés inconnus, détermination énantiomérique et isotopique ou bien encore recherche des composés odorants.

II.3 Conclusion : Adultération

Le secteur analytique des huiles essentielles est en constante évolution, cherchant sans cesse à améliorer les techniques mises en place afin de caractériser au mieux chaque huile essentielle. La connaissance des constituants d'une huile essentielle permet, entre autres, d'attribuer ses propriétés à certains composants et ainsi d'en tirer partie. D'un point de vue du contrôle, la mise à disposition de toutes ces techniques permet de détecter plus aisément les adultérations des huiles essentielles. En effet, en tant que produits d'importance économique considérable, les huiles essentielles n'échappent pas aux tentatives de fraudes, notamment dans le domaine de l'aromathérapie.[122]

L'adultération d'une huile essentielle, dont le but est d'en baisser le prix, peut se présenter sous plusieurs formes.[122] L'une d'elles consiste à mélanger une huile essentielle « bio » avec une huile essentielle dite « normale » qui est issue d'une agriculture utilisant des produits phytosanitaires. L'utilisation des pesticides sur les cultures des matières premières des huiles essentielles (hespéridés et PPAM) est effectivement très courante. Ces traitements, similaires à ceux effectués sur les denrées alimentaires, peuvent occasionner la présence de résidus de pesticides dans le végétal. Etant donné les procédés de fabrication des huiles essentielles, il parait évident que la présence de résidus de pesticides dans les huiles essentielles ne peut être écartée.

B) Les Produits Phytosanitaires

Les produits phytosanitaires, plus communément nommés pesticides, sont des sujets de discussion incontournables de la société actuelle. Si, auparavant, ces termes étaient associés à la maîtrise de la production agricole et la garantie de ressource alimentaire suffisante, ils sont désormais souvent associés, à tort ou à raison, à un problème de santé publique. En l'espace de quelques années, les pesticides sont en effet passés du rang de produits révolutionnaires et bienfaiteurs au rang de produits néfastes dont il faut se débarrasser. Alors pourquoi tant de polémique sur ces produits ?

Ce qui est en cause, c'est probablement une utilisation abusive et déraisonnée de ces substances depuis le milieu du XX^{ème} siècle conduisant à une pollution généralisée de l'environnement. Depuis près de cinquante ans, ils ont été mis en évidence dans tous les compartiments de l'environnement, que ce soit dans les eaux de rivières, de pluie et nappes phréatiques, dans l'air et dans les denrées alimentaires.

Si la problématique « pesticides » est à la fois d'ordre environnemental avec la contamination de la faune et de la flore, elle est aussi d'ordre sanitaire. En effet, de par leurs propriétés toxiques, les pesticides représentent un réel danger pour l'homme lorsqu'ils ne sont pas utilisés dans des conditions appropriées. Pourtant, même s'ils sont très controversés, il semble compliqué de s'en priver dans un futur proche tant notre société dépend des pesticides, que ce soit dans l'usage agricole ou non agricole. La tendance actuelle est donc à une diminution progressive de la consommation en produits phytosanitaires (plan Ecophyto 2018) ainsi qu'à l'amélioration des pratiques agricoles parallèlement à un durcissement de la réglementation.

Pour assurer la sécurité du consommateur, la législation européenne notamment impose des limites maximales de résidus (LMR) de plus en plus faibles dans les denrées alimentaires, d'où une nécessité pour les laboratoires d'analyse de s'adapter constamment et de développer des méthodes d'analyse des pesticides toujours plus performantes. Cependant, contrairement aux denrées alimentaires et l'eau qui sont très contrôlées, il n'existe aucune réglementation en vigueur sur les teneurs résiduelles en pesticides dans les produits transformés et, en particulier, dans les huiles essentielles.

La présence de pesticides dans ces extraits ne doit pourtant pas être écartée. Elle pourrait même, au vu de leurs domaines d'application, notamment l'aromathérapie, constituer un problème de santé publique.

I. Généralités sur les produits phytosanitaires

I.1 Définitions, classification et chiffres clés

Le mot **pesticide** provient de l'association du mot anglais *pest* (animal, insecte ou nuisible), lequel provient du latin *pestis* (fléau, calamité) et du suffixe *–cide* ((latin *-cida,* du verbe latin *caedo, caedere*, « tuer »). Bien que communément appelé « pesticides » par le grand public, les termes utilisés par la législation française relative à la protection des cultures sont « produits phytopharmaceutiques », « produits phytosanitaire », « produits agropharmaceutiques » ou encore « produits antiparasitaires à usage agricole ».[123]

Selon la directive 91/414/CEE du 19/08/1991,[2] sont entendus par **produits phytopharmaceutiques** « les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et qui sont destinées à :

- protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, pour autant que ces substances ou préparations ne soient pas définies autrement ci-après ;
- exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substance nutritive (ex : régulateur de croissance) ;
- assurer la conservation des végétaux, pour autant que ces substances ou ces produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil de la Comission concernant les agents conservateurs ;
- détruire les végétaux indésirables ;
- ou détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux ».

Plus simplement, les pesticides désignent l'ensemble des substances actives ou préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, qu'il s'agisse de plantes, de nuisibles et de champignons.

L'efficacité d'un pesticide dépend donc de sa ou de ses **substances actives** qui se définissent comme étant « les substances ou micro-organismes, y compris les virus, exerçant une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux, parties de végétaux ou produits de végétaux ».[2]

Une fois le pesticide appliqué sur le végétal, il peut subsister, à plus ou moins long terme, des traces de celui-ci dans l'environnement qui sont communément appelées **résidus de pesticides**. D'un point de vue réglementaire, il s'agit « d'une ou plusieurs substances présentes dans ou sur les végétaux ou produit d'origine végétale, des produits comestibles d'origine animale, ou ailleurs dans l'environnement, et constituant le reliquat de l'emploi d'un produit phytopharmaceutique, y compris leur métabolites issus de la dégradation ». [2]

Les substances actives peuvent être classées de trois manières en fonction de leur usage, des organismes ciblés ou de leurs caractéristiques chimiques. Les trois sont utiles mais ne répondent pas aux mêmes préoccupations. Ainsi, si l'on s'intéresse aux propriétés d'un pesticide, la connaissance structurale de la molécule est indispensable pour décrire et comprendre l'essentiel du comportement de cette substance ; la classification chimique se révèle dans ce cas très utile.

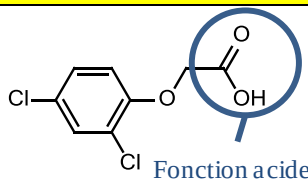
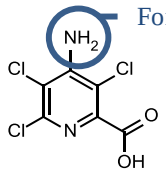
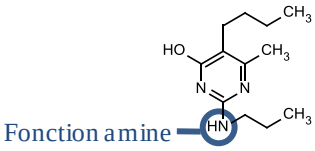
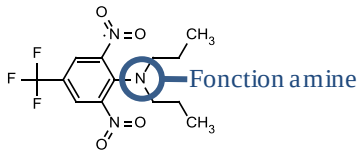
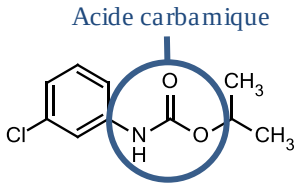
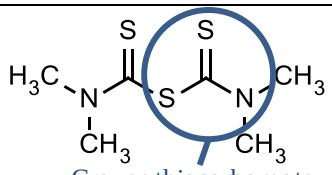
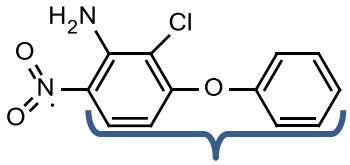
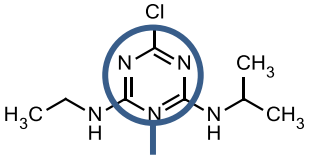
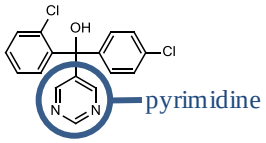
❖ **Classification chimique**

Il existe trois catégories de pesticides :

➢ les pesticides inorganiques : ils sont peu nombreux mais certains sont utilisés en très grande quantité comme le soufre ou le cuivre. Ce sont des pesticides très anciens dont l'emploi est apparu bien avant la chimie organique de synthèse (*Cf. I.2. l'histoire des pesticides*). De cette époque ne subsistent aujourd'hui : aucun insecticide, un seul herbicide employé en temps que désherbant total (chlorate de sodium) et quelques fongicides à base de soufre et cuivre comme la bouillie bordelaise ($[Cu(OH)_2]_x$, $CaSO_4$).

➢ Les pesticides organo-métalliques : ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe fait d'un métal comme le zinc ou le manganèse et d'un anion organique dithioarbamate (exemple : mancozèbe avec le zinc, manèbe avec le manganèse).

➢ Les pesticides organiques : ils sont très nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques. Selon le Pesticide Manual, une famille chimique ou classe chimique correspond à l'ensemble des molécules dérivées d'un groupe d'atomes qui constituent une structure de base.[124] Cependant, il n'existe pas de relations univoques simples entre une famille chimique et les propriétés des molécules qui ne peuvent être comprises qu'à partir de la connaissance de toute leur composition et de leur structure. Il existe actuellement plus de 80 familles ou classes chimiques dont les plus connues sont présentées dans le Tableau 3, mais leurs appellations sont parfois arbitraires et peuvent donc être différentes d'un ouvrage à un autre.

Famille chimique	Exemple	
	Formule développée	**Dénomination**
Acide carboxylique		**Nom IUPAC** : (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid **Nom commun** : 2,4D
Amine ➢ Amine primaire		**Nom IUPAC** : 4-amino-3,5,5-trichloropyridine-2-carboxylique acid **Nom commun** : picloram
➢ Amine secondaire		**Nom IUPAC** : 5-butyl-5-2-ethylamino-6-methylpyrimidin-4-ol **Nom commun** : éthirimol
➢ Amine tertiaire		**Nom IUPAC** : α,α,α-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine **Nom commun** : trifluraline
Carbamates		**Nom IUPAC** : isopropyl 3-chlorocarbanilate **Nom commun** : chlorprophame
Thiocarbamates		**Nom IUPAC** : bis (dimethylthiocarbamoyle) disulfide **Nom commun** : thirame
Diphényl éther		**Nom IUPAC** : 2-chloro-6-nitro-3-phenoxyaniline **Nom commun** : aclonifen
Hétérocylcles azotés ➢ Triazines		**Nom IUPAC** : 6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5 **Nom commun** : atrazine
➢ Pyrimidine		**Nom IUPAC** : (±)-2-4'-dichloro-a-(pyrimidin-5-yl)benzhydryl alcohol **Nom commun** : fénarimol

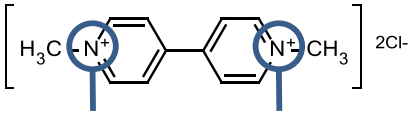
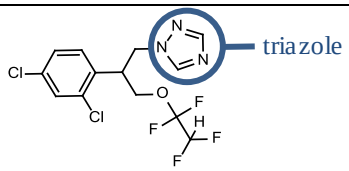
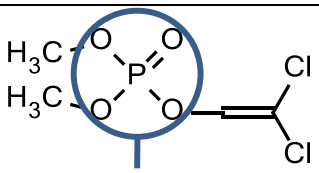
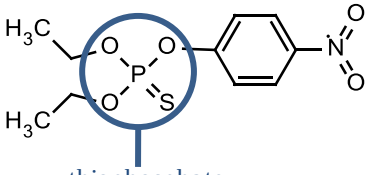
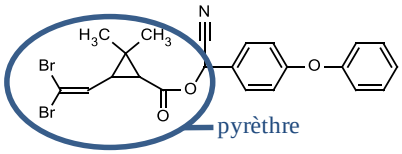
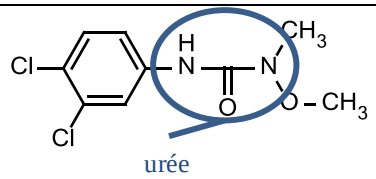
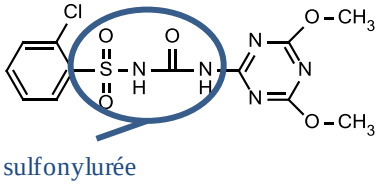
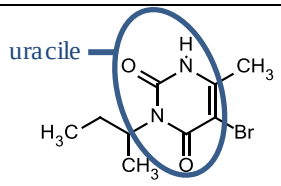
Famille chimique	Exemple	
	Formule développée	**Dénomination**
➢ Bipyridinium (ammonium quaternaire)	 ammonium quaternaire	**Nom IUPAC** : 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride **Nom commun** : paraquat
Azoles	 triazole	**Nom IUPAC** (±)-2(2,4-dichlorophenyl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl 1,1,2,2-tetrafluoroethyl ether **Nom commun** : tétraconazole
Organophosphorés	 Orthophosphate	**Nom IUPAC** : 2,2-dichlorovinyl-dimethylphosphate **Nom commun** : dichlorvos
	 thiophosphate	**Nom IUPAC** : O-O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphorothioate **Nom commun** : parathion ethyl
Pyréthrinoïdes	 pyrèthre	**Nom IUPAC** : (S)-α-cyano 3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate **Nom commun** : deltamethrine
Urées substituées	 urée	**Nom IUPAC** : 3-(3,4-dichloro)-1-methoxy-1-methylurea **Nom commun** : linuron
Sulfonylurées	 sulfonylurée	**Nom IUPAC** : 1-(2-chlorophenylsulfonyl)-3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)urea **Nom commun** : chlorsulfuron
Uraciles	 uracile	**Nom IUPAC** : 5-bromo-3-sec-butyl-6-methyluracil **Nom commun** : bromacil

Tableau 3. Principales familles chimiques de pesticides[125]

Il faut souligner la très grande diversité chimique des pesticides due, à la fois, aux éléments chimiques qu'ils contiennent mais aussi aux diverses fonctions chimiques présentes dans les molécules. Elle explique l'étendue des propriétés et des usages des pesticides.

Cependant, la compréhension de cette classification nécessite des connaissances avancées en chimie dont ne sont pas pourvus tous les utilisateurs de pesticides. Ils lui préféreront donc les classifications biologique ou par usage qui sont bien mieux adaptées à leurs activités.

❖ Classification Biologique

Selon les organismes visés, trois grandes classes de pesticides représentant 90 % des produits phytosanitaires se distinguent :

- **les insecticides,** destinés à éliminer les insectes nuisibles,
- **les herbicides**, destinés à éliminer les adventices des cultures,
- **les fongicides,** destinés à lutter contre les parasites et champignons pathogènes.

D'autres classes mineures correspondent à des substances actives destinées à combattre des cibles spécifiques : **acaricides** (acariens), **nématicides** (nématodes), **corvicides** (oiseaux ravageurs), **rodonticides** (rongeurs) et **molluscicides** (limaces et escargots).

❖ Classification selon l'usage

Les pesticides sont utilisés dans plusieurs domaines d'activités pour lutter contre des organismes vivants nuisibles. Il existe six catégories de pesticides selon leur destination de traitement, à savoir : les cultures, les bâtiments d'élevage, les locaux de stockage des produits végétaux, les zones non agricoles, les bâtiments d'habitation, l'homme et les animaux.

L'agriculture est de loin l'activité la plus consommatrice de pesticides. L'usage non-agricole ne représente en effet que 12 % du marché global et seulement entre 6 et 10 % en France.[126]

Le marché mondial des produits phytosanitaires représente environ 40 milliards de dollars en 2008 et se répartit comme suit :

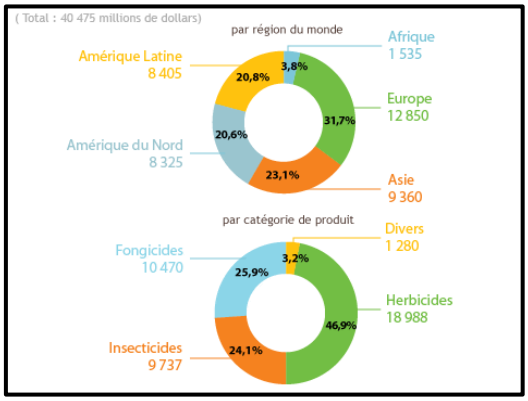


Figure 13. Illustration de la répartition du marché mondial des produits phytosanitaires en 2008[126]

L'Europe reste le continent le plus consommateur de pesticides, suivie de l'Asie, l'Amérique Latine et l'Amérique du nord. Seule l'Afrique, probablement pour des raisons économiques, n'emploi que très peu de produits phytosanitaires. Avec ses 2,076 milliards d'euros et ses 78 600 t de pesticides consommées en 2008, la France se situe au 4ème rang mondial derrière les Etats-Unis, le Brésil et le Japon en terme de quantité absolue, et au 3ème rang européen une fois cette quantité ramenée à l'hectare cultivé (5,4 kg/ha/an).[126]

Concernant les catégories de pesticides, ce sont les herbicides qui dominent le marché avec environ 47 % de part de marché. Cela est principalement dû à l'importante consommation de ces produits en Europe et Amérique du Nord où les herbicides représentent 70 à 80 % de part de marché, au contraire de sous les tropiques où les insecticides sont davantage employés (environ 50 % des produits utilisés).[126]

En 2009, le marché des produits phytosanitaires semble admettre une stabilisation, voire un léger recul en 2009 (37,860 milliards de dollars). C'est ici un fait marquant dans l'histoire des pesticides dont le marché était jusqu'alors en constante croissance.

I.2 L'histoire des produits phytosanitaires

De tout temps, l'homme a essayé de protéger ses cultures et ses récoltes vis-à-vis de divers ennemis, mais il est souvent resté désarmé contre ces fléaux. Le soufre était utilisé comme fumigène dès la Grèce Antique et les produits arsenicaux dans la lutte contre les sauterrelles dans l'Egypte Antique. Vers le XVIème siècle, les propriétés insecticides du tabac (nicotine) et des racines de Derris et Lonchocarpus (pyrèthre) sont signalées.

L'utilisation plus généralisée des pesticides a suivi les progrès de la chimie minérale. Au XIXème siècle, les traitements fongiques à base de soufre ou de sels de cuivre permettent d'endiguer de graves épidémies qui atteignent des productions agricoles vitales comme la pomme de terre (mildiou de la pomme de terre : *Phytophtora infestans*) en 1845, de la vigne (oïdium : *Uncinula necator* ; blackrot : *Guignardia bidwelii ;* Mildiou : *Plasmapora viticola*) ou encore des céréales (rouille : *Puccinia*). C'est d'ailleurs à cette époque que fut mise au point la célèbre bouillie bordelaise par A. Millardet (1838-1902). Pendant cette période, les insectes ravageurs ont principalement été combattus avec des composés à base d'arsenic notamment l'arséniate de plomb et l'acéto-arséniate de plomb pour lutter respectivement contre l'Eudémis de la vigne en France (1881) et en Algérie (1888) ainsi que le doryphore au USA (fin XIXème siècle).

La **phytopharmacie** n'a véritablement évolué qu'après la première guerre mondiale, parallèlement au développement de la chimie organique. Les premiers insecticides organiques sont d'origine naturelle et sont extraits de fleurs séchées de Chrysanthemum (pyréthrine 1924) ou de racines de diverses plantes des genres *Derris*, *Lonchocarpu* et *Tephrosia* (roténone 1930). C'est en 1930, date du brevet du premier herbicide de synthèse, le dinitro-orthocrésol (DNOC), que débute réellement l'ère des produits phytosanitaires de synthèse avec la mise au point des pesticides de 1ère génération. L'année 1943 voit la commercialisation du dichloro-diphényl-trichloroéthane ou DDT (interdit en France en 1972), un insecticide développé pour lutter contre les ravageurs des cultures et les insectes vecteurs de maladies. Il fera figure pendant de nombreuses années de chef de file de la première grande famille de pesticides : les organochlorés (aldrine, dieldrine, lindane). Une seconde grande famille ne tardera pas à apparaître : les organophosphorés (malathion, parathion). Leurs propriétés insecticides avaient été mises en évidence durant la seconde guerre mondiale à travers le perfectionnement de gaz de combat tels que le gaz sarin.

Après 1950, les effets conjugués du redressement économique, de l'évolution de la structure de l'exploitation agricole et d'une industrie chimique en plein essor entraînent une augmentation considérable du nombre de pesticides de synthèse avec, notamment, le développement de nouvelles familles de pesticides telles que les ammoniums quaternaires (diquat, paraquat), les urées substituées (diuron, linuron) ou encore les triazines (atrazine, simazine).

La période 1970-1980 signe l'arrivée de la la 2ème génération de pesticides caractérisée par une diminution des doses employées et une meilleure efficacité. Parmi ces nouvelles familles se trouvent les pyréthrinoïdes photostables (deltaméthrine) pour les insecticides et les sulfonyls urées (chlorsulufuron) pour les herbicides. C'est également à cette période que la famille des phosphonate est mise sur le marché avec dans ses rangs un herbicide très célèbre : le glyphosate (Roundup).

Les années 1980 marquent un tournant dans la manière de concevoir un produit phytosanitaire de synthèse, c'est le début des pesticides de 3ème génération. Jusqu'alors, les substances actives étaient issues du hasard, suite à des tests biologiques généraux et au criblage d'un grand nombre de molécules. Elles sont désormais basées sur une recherche biorationnelle. En effet, grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la biochimie moléculaire et de l'informatique, il est désormais possible de relier l'activité d'une formule chimique avec sa structure moléculaire. La recherche biorationnelle permet d'obtenir de nouvelles substances actives plus efficaces avec une réduction des doses appliquées, plus

sélectives des organismes visés, occasionnant donc moins de risque pour les organismes non-cibles et assurant ainsi un meilleur respect de l'environnement.

L'usage des produits phytosanitaires a connu un très fort développement au cours des décennies passées, les rendant quasiment indispensables à la plupart des pratiques agricoles, quel que soit le niveau de développement économique des pays. De 1945 à 1985, la consommation de pesticides a doublé tous les dix ans.

Si les pesticides ont constitué un énorme progrès dans la maîtrise des ressources alimentaires et l'amélioration de la santé publique (en particulier dans la lutte contre les insectes, vecteurs des maladies), le revers de la médaille est apparu rapidement. En effet, des phénomènes de résistance chez les insectes, puis des troubles de la reproduction chez les oiseaux ont montré de façon spectaculaire les limites et les dangers de ces substances pour l'environnement, pour les écosystèmes mais aussi pour la santé humaine.

Cependant, il faut se rappeler que, d'une part, l'augmentation des rendements des terres agricoles a permis de limiter la déforestation, les experts estimant que leur utilisation, en 50 ans, a permis de préserver 50 % de la surface de la forêt actuelle. D'autre part, leur utilisation a également permis d'éradiquer un grand nombre de maladies parasitaires très meurtrières, ou d'en limiter la propagation. A ce titre, le DDT est d'ailleurs toujours préconisé pour lutter contre le paludisme.

	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…		Organochlorés** Organophosphorés
1950-1960	Triazines Urées substituées Carbamates…	Dithiocarbamates Phtalimides	Carbamates
1960-1970	Dipyridyles Toluidines…	Benzimidazoles	
1970-1980	Amino-phosphonates Propionates…	Triazoles Dicarboximides Phosphites Morpholines Phénylamides	Pyréthrinoïdes Benzoyl-urées (régulateur de croissance)
1980-1990	Sulfonyl urées…	Diéthofencarbe	Imidachlopride
1990-2000	Isoxaflutole Carfentrazone	Strobilurines SDN	Fipronil

*Les derniers usages de colorants nitrés ont été interdits en 2000
**Avec l'interdiction du diénochlore (2002) et de l'endosulfan (2005), tous les organochlorés ont été retirés du marché européen.

***Tableau 4. Evolution des découvertes des substances actives*[127]**

I.3 La vie d'un produit phytosanitaire

La vie d'un produit phytosanitaire peut se décomposer en trois temps : la conception et l'homologation de la substance active, l'application du pesticide et enfin ce qu'il en reste après son utilisation.

I.3.1. L'homologation d'une substance active : la directive 91/414/CEE

Avant la mise sur le marché d'une nouvelle molécule, il faut en moyenne une dizaine d'années d'études représentant un investissement d'environ 200 millions d'euros par les industriels.[128] La conception d'un produit phytosanitaire doit nécessairement prendre en compte deux séries d'objectifs.

- Objectif n° 1 : Efficacité/Spécificité

La toxicité doit être élevée pour la cible (efficacité) mais nulle ou en tout cas la plus faible possible pour l'homme, les animaux domestiques, la faune, les insectes auxiliaires et pollinisateurs, les plantes cultivées (spécificité).[127]

- Objectif n° 2 : Persistance

La persistance du produit doit être suffisante pour éviter les traitements multiples mais compatibles avec les problèmes d'environnement pour éviter les phénomènes de concentration dans la chaîne alimentaire ainsi que les limitations à la rotation des cultures.[127]

Les conditions drastiques imposées par la directive 91/414/CEE pour l'homologation d'une substance active ne permettent la commercialisation que d'une molécule sur environ 150 000 synthétisées.[128]

Adoptée le 15 juillet 1991 par le Conseil des Ministres, la directive 91/414/CEE concerne « l'autorisation, la mise sur le marché, l'utilisation et le contrôle à l'intérieur de la Communauté de produits phytopharmaceutiques présentés sous leur forme commerciale, et la mise sur le marché à l'intérieur de la Communauté et le contrôle des substances actives destinées à un usage défini à l'article 2 point 1 ».[2] Ce texte vise à homogénéiser les critères d'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité des préparations phytosanitaires. Ainsi toute nouvelle substance active doit répondre au texte de la directive et toutes les molécules autorisées dans un ou plusieurs Etats membres de l'Union Européenne avant le 25 juillet 1993 (date d'application française) doivent être réexaminées.

La directive est composée de 24 articles informant les Etats membres de l'ensemble des objectifs retenus et de 6 annexes détaillées ci-après :

- l'Annexe I référence la liste des substances actives autorisées au niveau européen ;
- l'Annexe II détaille le contenu du dossier nécessaire à l'inscription d'une substance active à la liste de l'Annexe I : dossiers toxicologique, écotoxicologique, biologique ;
- l'Annexe III donne la marche à suivre pour constituer les dossiers toxicologique et biologique en vue d'obtenir l'homologation des produits formulés ;
- l'Annexe IV contient les informations sur la nature des risques particuliers (phrases de risque R) ;
- l'Annexe V donne des conseils de prudence, les phrases de précaution particulières ;
- l'Annexe VI spécifie les principes uniformes pour l'évaluation des préparations.

Pour qu'une matière active puisse être employée dans la Communauté Européenne, celle-ci doit être inscrite sur la liste des substances actives reconnues par la Communauté Européenne : la liste positive communautaire située en Annexe I de la directive 91/414/CEE. En revanche, pour les spécialités commerciales (produits formulés), l'autorisation de vente est accordée au niveau de chaque Etat. La demande d'inscription d'une matière active sur la liste positive doit être présentée avec des dossiers toxicologique, écotoxicologique et biologique, conformes aux exigences de l'Annexe II de la directive. Celle-ci doit être accompagnée des dossiers écotoxicologique et biologique conformes aux exigences de l'Annexe III pour au moins une spécialité commerciale. La procédure d'inscription s'effectue au niveau communautaire sur proposition du Comité Phytosanitaire Permanent, présidé par la Commission. La Figure 14 illustre la procédure d'homologation dans l'Union Européenne :

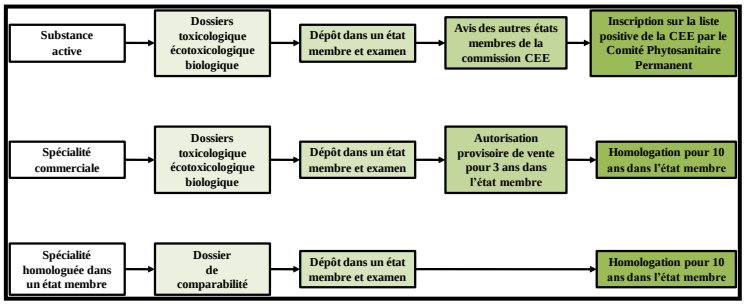


Figure 14. Description schématique de la procédure d'homologation européenne des produits phytosanitaires

L'homologation est la garantie que le produit est efficace, sélectif, non phytopathogène vis-à-vis de la culture concernée et qu'il présente un risque clairement évalué vis-à-vis de l'applicateur, de la santé humaine et de l'environnement. Cette garantie est assurée par l'ensemble des études requises par les Annexes II et III à travers la constitution de trois dossiers :

- Le dossier toxicologique : il évalue les effets les plus divers du produit pour l'homme, les risques encourus par le manipulateur et le consommateur. Ainsi, les **toxicité aigüe**, **subchronique** et **chronique** sont calculées sur la base de nombreuses études (cancérogènes, tératogènes, reprotoxiques…) effectuées chez des animaux tests.
- Le dossier écotoxicologique : il recense le comportement et le devenir des produits dans les différentes composantes de l'environnement, le sol, l'air et l'eau ainsi que les effets de ces composés sur la faune et la flore.
- Le dossier biologique : il apporte la preuve de l'efficacité, de la sélectivité et de l'innocuité du produit vis-à-vis de la culture concernée.

Si la substance active et le produit formulé répondent à l'ensemble de ces critères, l'homologation est accordée par l'Union Européenne et une autorisation de mise sur le marché (AMM) est délivrée par l'Etat ; le pesticide peut enfin être commercialisé.

❖ **Remarque sur le programme de révision des substances actives déjà existantes**

Concernant les substances actives actuellement sur le marché, la directive prévoit un programme d'évaluation de ces substances étalé sur douze ans à compter de l'entrée en vigueur de la directive (1993). En réalité, ce programme d'évaluation a pris fin en mars 2009. Sur quelques 1 000 substances actives présentes sur le marché dans au moins un État membre avant 1993, 26 %, soit environ 250 substances, ont passé avec succès l'évaluation de sécurité harmonisée de l'UE. En revanche, la majorité des substances (67 %) ont été éliminées en raison de dossiers non déposés, incomplets ou retirés par l'industrie. Approximativement, 70 substances ont échoué à la révision et ont été retirées du marché étant donné que l'évaluation réalisée ne révélait pas une utilisation sûre concernant le respect de la santé humaine et de l'environnement.[129]

I.3.2. Application et devenir du pesticide dans l'environnement

Une bonne mise en œuvre du produit phytosanitaire doit viser quatre buts :

- être efficace et rentable pour la protection des cultures ;
- ne pas occasionner de dégâts à la culture protégée, aux cultures voisines et aux cultures suivantes ;
- éviter l'intoxication des hommes : l'applicateur, les autres opérateurs, les voisins, les consommateurs… ;

➢ limiter la pollution de l'environnement en général et, en particulier, l'impact sur la faune auxiliaire et sur les animaux domestiques.

Ces quatre objectifs sont indissociables. L'efficacité et la prévention des accidents de toutes sortes vont de pair et passent par une utilisation correcte des produits. Pour aider les utilisateurs dans l'emploi des produits phytosanitaires, il existe des guides relatifs aux **Bonnes Pratiques Phytosanitaires (BPP)**.[130] Le respect de ces règles assure une efficacité optimale des préparations pharmaceutiques ou des autres techniques de protection des plantes, tout en réduisant le plus possible les risques liés à leur emploi. Elles impliquent, entre autres, de respecter la dose d'emploi, le nombre d'applications, ainsi que le délai d'emploi avant récolte (DAR)[123] définis dans les **Bonnes Pratiques Agricoles (BPA)**. De plus, les utilisateurs sont contraints depuis le 12 septembre 2006[131] de respecter des contraintes de type météorologique (force du vent), de temps (délai avant récolte) et de distance par rapport à des zones critiques comme des points d'eaux.

Lorsque le produit phytosanitaire est appliqué sur l'organisme cible (adventice, insecte…), il doit passer les membranes externes et les couches de protection, ce qui implique une certaine liposolubilité du composé. Les modes d'actions des pesticides sont très variés.[132] Ils peuvent aussi bien agir sur le système nerveux, inhiber la synthèse de molécules essentielles au bon fonctionnement de l'organisme (acides aminés, lipides, stérols) ou encore influer sur le système respiratoire.

Pour agir, les substances actives doivent atteindre leur cible qui peut être située en surface ou à l'intérieur de l'organisme cible. Se distinguent alors les produits de contacts et les produits systémiques.

➢ **Les pesticides de contacts** agissent en surface. Les herbicides provoquent des nécroses et brûlent les tissus des plantes, tandis que certains insecticides agissent par contact avec le tégument, par inhalation au niveau du tube respiratoire, ou par ingestion au niveau de l'appareil digestif.

➢ **Les pesticides systémiques** agissent après transfert à l'intérieur de la plante et diffusion par la sève. Ces produits, d'action plus lente mais plus durable, doivent être hydrosolubles. Arrivé sur le site d'action, le produit parvient à un récepteur où se manifeste son action toxique proprement dite.

Dispersé au moment de l'application ou libéré lors de la destruction de l'organisme, le produit phytosanitaire se retrouve dans l'environnement et peut être transporté dans l'atmosphère, les eaux souterraines et les eaux superficielles entrainant ainsi leur pollution tel qu'illustré dans la Figure 15.

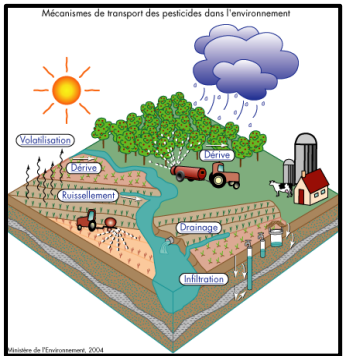


Figure 15. Illustration des mécanismes de transports des pesticides dans l'environnement

L'importance des processus de transfert est de l'ordre (par rapport aux quantités appliquées) de:[125]

- ruissellement et érosion : 0 à 5 % ;
- lixiviation : 1 à 5 % ;
- volatilisation : 0 à 90 % ;
- absorption par les plantes : 1 à 10 %.

Il peut également, en fonction de sa biodisponibilité, être absorbé par les organismes vivants sur lesquels il peut avoir des effets toxiques recherchés ou non souhaités.

Le niveau de contamination de l'environnement par le pesticide va dépendre de sa **persistance**, c'est-à-dire la durée pendant laquelle les résidus d'un produit phytopharmaceutique sont détectables. Cette durée va être fonction des phénomènes de dégradation du pesticide qui peuvent avoir deux origines : abiotique (sans intervention d'organismes vivants) telle que l'hydrolyse, la photodégradation et les réactions d'oxydo-réduction, ou biotique (intervention d'organismes vivants).

La persistance des produits phytopharmaceutiques est un problème important comme le montre le cas des pesticides organochlorés. En effet, ces derniers, à l'image du DDT sont peu ou pas du tout métabolisables par les être vivants, ni dégradables dans l'environnement. Il en résulte une contamination et une concentration dans les chaînes alimentaires, phénomène d'importance considérable puisque des résidus organochlorés sont retrouvées jusque dans les graisses des phoques et des morses d'Alaska.[133] La prise en compte de ces problèmes a amené à concevoir des molécules de moindre persistance afin de limiter cette concentration le long des chaînes alimentaires. L'homme étant lui-même au bout d'une chaîne, quels risques encourt-t-il ?

II. Toxicité et sécurité du consommateur

Le problème de toxicologie humaine relatif aux produits phytosanitaires concerne à la fois les manipulateurs et les consommateurs. Pour qu'un pesticide soit mis sur le marché selon la directive 91/414/CEE, il faut qu'il n'entraîne « aucun effet nocif sur la santé humaine » lorsqu'il est utilisé et appliqué dans le cadre de bonnes pratiques. Les nombreuses études de toxicité menées au cours de l'homologation conduisent à établir différents critères de toxicité spécifiques à chaque produit et définis dans le glossaire fourni en tête du présent manuscrit.

II.1 Toxicité pour l'utilisateur

Différents types de toxicité sont définis suivant leur mode de détermination.

II.1.1. Toxicité aigüe

La **toxicité aigüe** est déterminée par le calcul des **DL 50** orale, DL 50 cutanée, **CL 50** et par l'évaluation du pouvoir irritant pour la peau, les yeux et le pouvoir de provoquer une sensibilisation de la peau. Les substances sont ensuite classées selon leur caractère très toxique, toxique ou nocif (Tableau 5).

Catégorie	DL 50 orale rat (mg/kg)	DL 50 cutanée rat ou lapin (mg/kg)	CL 50 inhalation rat (mg/litre/4heures)
Très toxique	< 25	< 50	< 0,5
Toxique	25-200	50-400	0,5-2
Nocive	200-2000	400-2000	2-20

Tableau 5. Catégorie de toxicité aigüe[127]

II.1.2. Toxicité chronique

La **toxicité chronique** est évaluée à partir des données expérimentales de santé chronique obtenues chez l'animal et exigées lors du dossier d'homologation. L'étiquetage intègre ces critères par les symboles T(toxique), T+(très toxique), Xn(nocif), Xi(irritant) et les phrases de risques R40 à R43, R45 à R49 et R60 à R64 (Annexe 3) définies dans l'arrêté du 20 avril 1994.[134] Cependant, certains effets à long terme tels que les cancers, les troubles de la fertilité, les malformations, les maladies neurologiques, les effets sur le système immunitaire sont très difficiles à appréhender et nécessitent des études épidémiologiques.

Des phrases de risques existent pour les substances cancérogènes (R45, R49 et R40), mutagènes (R46 et R60), reprotoxiques (R60 et R62) et tératogènes (R61 et R63). Ces phrases de risques font référence à la classification des composés CMR (Cancérogène, Mutagène,

Reprotoxique) en trois catégories où *x* est soit cancérogène, mutagène, reprotoxique ou tératogène en fonction des quatre classements respectifs :

- catégorie 1 : substance que l'on sait être *x* pour l'homme ;
- catégorie 2 : substance devant être assimilée à des substances *x* pour l'homme, d'après des études à long terme sur l'animal ou d'autres informations appropriées ;
- catégorie 3 : substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets *x* possibles.

L'utilisateur de produits phytopharmaceutique n'est cependant pas le seul exposé. Le consommateur, dans une moindre mesure, l'est également, notamment au travers de son alimentation.

II.2 Les risques pour le consommateur

Après application, les produits phytosanitaires évoluent quantitativement et qualitativement au cours du temps. La quantité de substances actives ou de ses produits de transformation présente dans le végétal à la récolte constitue le résidu. Son importance dépend tout d'abord de la nature du produit utilisé mais aussi d'un certain nombre de conditions extérieures comme le climat, les conditions d'utilisation, la dose et, plus particulièrement, le **délai avant récolte** (DAR). Le résidu à la récolte constitue le passif du traitement phytosanitaire et, afin de garantir la sécurité du consommateur, il est nécessaire de passer par un certain nombre d'étapes avant de délivrer l'AMM d'une substance active. Ainsi, il faut pouvoir :

- proposer une définition du résidu dans les produits végétaux et éventuellement dans les produits animaux si la culture est destinée à l'alimentation animale ;
- fixer une LMR pour les cultures bénéficiant d'une autorisation d'usage de la substance active ;
- s'assurer que les LMRs proposées sont compatibles avec la santé du consommateur en réalisant une évaluation du risque.

II.2.1. Définition du résidu

La première étape est de connaître le devenir de la substance active après qu'elle ait été appliquée sur une culture. En effet, comme expliqué précedemment, une fois appliquée sur le végétal, la substance active est susceptible de se dégrader sous l'influence de facteurs physiques (température, rayonnement UV, eau) ou biologiques (métabolisation). Pour connaître le devenir de la substance active dans la plante, des « études de métabolisme » sont

réalisées dans des conditions représentatives des pratiques agricoles, en utilisant la substance active radiomarquée (^{14}C).

Ces études ont pour objectifs :

- d'estimer la répartition des résidus dans la plante ;
- d'estimer les teneurs en résidus totaux dans les diverses parties de la plante et plus particulièrement dans les parties consommées ;
- et surtout, d'identifier et de quantifier les métabolites et produits de dégradation qui peuvent apparaître après traitement.

En général, la substance active appliquée, appelée aussi molécule mère reste le composé majoritaire dans la plante et le résidu est défini comme la substance active elle-même.

II.2.2. Définition de la LMR

Le devenir de la substance active étant connu, il est maintenant possible de mettre en place des essais en plein champ, qui vont permettre de définir les teneurs maximales en résidus admises dans une culture traitée. L'élaboration de ces LMRs est une procédure qui se déroule en deux étapes distinctes correspondant à :

- la définition de la Bonne Pratique Agricole (BPA) critique,
- la mise en place des essais résidus.

La BPA « critique » pour une substance active et une culture donnée, correspond à la pratique qui conduit au risque résidu le plus important. Elle correspond, en général, à l'usage qui nécessite par ordre d'importance :

- le délai avant récolte le plus court,
- la dose par hectare la plus élevée,
- le nombre maximum d'applications par saison.

Telle qu'elle est établie, la LMR apparaît comme une norme agronomique, reflet d'une utilisation de la substance active conforme à une bonne pratique agricole et non pas une norme toxicologique. Un dépassement de la LMR doit avant tout être interprété comme un non-respect d'une pratique agricole (en général un non respect du délai avant récolte). Les définitions de résidus et les LMRs sont consultables sur la base de données européenne des pesticides : http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm.

II.2.3. Evaluation du risque pour le consommateur

Il s'agit maintenant de vérifier que les LMRs établies restent dans les limites compatibles avec la santé du consommateur.

❖ **A long terme (risque chronique)**

Pour une substance active, les évaluations ont pour principe de vérifier que les quantités de résidus qu'un individu est susceptible de retrouver quotidiennement dans son alimentation ne dépassent pas les normes de référence toxicologique que sont la **dose journalière admissible** (DJA) et la **dose de référence aigüe** (ARfD).

L'exposition à long terme théorique d'un consommateur à un pesticide est évaluée par le calcul d'un **Apport Journalier Maximum Théorique** (AJMT) qui permet de vérifier que la quantité potentiellement ingérée chaque jour par un consommateur est inférieure à la DJA. L'AJMT calculé en faisant la somme des consommations moyennes individuelles journalières multipliées par les LMRs peut être résumé par l'équation suivante :

$$AJMT\ (mg/kg/j) = \frac{\sum (Consommation\ moyenne\ \ journalière \times LMR_{produit\ A})}{(Poids\ Corporel)} \qquad (1)$$

Ce calcul est clairement maximaliste car il est basé sur l'hypothèse que tous les aliments présentent des teneurs en résidus équivalentes aux LMRs. En réalité, il faut considérer que seul un faible pourcentage des aliments affiche de telles teneurs. En 2008, selon l'EFSA (European Food Safety Authority), 3,5 % des 70 000 échantillons analysés sur environ 200 types d'aliments excédaient les LMRs, contre 4,2 % en 2007.[135]

❖ **A court terme (risque aigu)**

Pour les molécules présentant un effet toxique immédiat (ex : pesticide anticholinestérasique), il est nécessaire de compléter l'évaluation à long terme par une évaluation de l'exposition au risque aigu. Dans son principe, il s'agit de vérifier que la quantité de résidus ingérée au cours d'un repas ou d'une journée est inférieure à l'ARfD. Cette évaluation se fait par le calcul de **l'Apport Court Terme Estimatif International** (ACTEI) qui prend en compte le niveau de consommation non plus moyen, comme dans le cas de l'AJMT, mais extrême au percentile 97,5, ainsi qu'un facteur de variabilité *v* qui tient compte de l'hétérogénéité liée à l'échantillonnage :

$$ACTEI = \frac{U \times HR \times v \ + [(C^{97,5} - U) \times HR]}{Poids\ Corporel} \quad (2)$$

U le poids de l'unité (ex : la pomme), $C^{97,5}$ la consommation au percentile 97,5,
v le facteur de variabilité (5 ou 7), HR la teneur maximum observée lors des essais et PC le poids corporel.

II.3 Conclusion

La sécurité du consommateur est assurée par le fait que les LMRs élaborées pour une substance active conduisent à des niveaux d'ingestion en résidus qui restent en deçà des valeurs toxicologiques de références que sont la DJA et l'ARfD. Cependant, l'ensemble de ces calculs sont basés exclusivement sur l'alimentation. Mais dans le cas de l'utilisation de produits issus de ces mêmes cultures et destinés à un autre usage, comme la fabrication d'huiles essentielles par exemple, il n'existe, aujourd'hui, aucune teneur limite réglementaire en pesticides.

Pourtant, quel que soit le procédé d'extraction considéré, le niveau en résidus de pesticides présent initialement dans le matériel végétal est extrait dans un volume d'huile essentielle beaucoup plus petit et conduit donc à une concentration du pesticide dans l'huile essentielle. En conséquence, même de faibles teneurs en pesticides dans le végétal pourraient conduire à des concentrations bien plus élevées dans l'huile essentielle. Avec des rendements en huiles essentielles généralement de l'ordre de 1 à 5 %, une contamination du végétal par exemple avec 1 $mg.kg^{-1}$ d'un résidu de pesticide pourrait conduire théoriquement à une concentration de 20 à 100 $mg.kg^{-1}$ dans l'huile essentielle, en supposant un facteur de concentration de ce composé de 100 %. Ainsi, si le rapport de l'EFSA ne fait état que de 3,5 % des échantillons dépassant la LMR, il indique aussi que 35,7 % des échantillons contenaient des résidus de pesticides à des teneurs supérieures à la limite de quantification mais inférieures à la LMR. A supposer que ces échantillons soient à l'origine de la production d'huiles essentielles, les concentrations en pesticides pourraient être non négligeables. De même, parmi les denrées étudiées, 3 % des échantillons d'oranges et 2 % des échantillons de mandarines contenaient des pesticides à des teneurs excédant la LMR. Etant donné l'importance de la production d'huile essentielle, notamment d'orange, il apparaît nécessaire de disposer d'une méthode de contrôle des résidus de pesticides dans les huiles essentielles, à défaut pour l'instant, d'avoir des limites réglementaires.

III. Les pesticides dans les huiles essentielles

La recherche de pesticides dans les huiles essentielles est une problématique récente qui provient essentiellement de deux phénomènes. En premier lieu, il s'agit de l'augmentation de la consommation des huiles essentielles dans les différents domaines de l'industrie ainsi que le développement de nouveaux marchés comme l'aromathérapie. En second lieu, il faut signaler que l'une des principales tendances de la société actuelle est de conduire une politique de qualité de plus en plus drastique sur les produits de consommation en vue de rassurer et de garantir la sécurité du consommateur.

Cependant, préalablement au développement et à la mise en place d'une méthode multi-résidus de produits phytosanitaires dans les huiles essentielles, il faut dans un premier temps identifier les substances actives pertinentes parmi les 1 000 existantes, puis dans un second temps, réaliser un état de l'art des méthodes d'analyse des pesticides dans les huiles essentielles.

III.1 Identification des substances actives pertinentes

Dans le cadre de la mise en place d'une méthode d'analyse multi-résidus de pesticides dans les huiles essentielles, la première étape fut d'établir la liste des substances actives à rechercher. Les molécules furent sélectionnées selon trois critères principaux :

- la réglementation : substances actives autorisées ou non ?
- L'usage : sur quels types de cultures sont-elles employées ?
- La toxicité.

III.1.1. La réglementation

III.1.1.1. Dans l'union européenne

La mise sur le marché de produits phytopharmaceutiques est réglementée dans l'Union Européenne par la Directive 91/414/CEE.[2] Seuls sont autorisés les produits phytopharmaceutiques dont les substances actives figurent sur la liste de l'Annexe I. Si le programme de révisions des substances actives est désormais clôturé (mars 2009), ce n'était pas le cas lors des débuts de cette étude (janvier 2008). A cette date, beaucoup de substances étaient encore en cours d'évaluation.

Ainsi, les substances ont été classées suivant deux catégories :

- Usage autorisé : substance inscrite sur l'Annexe I ou en cours d'évaluation,
- Usage interdit : substance exclue de l'Annexe I.

L'objectif de ce projet est de développer une méthode d'analyse capable de doser les résidus de pesticides dans les huiles essentielles produites en Europe mais également de contrôler celles provenant de l'importation. Il ne serait donc pas judicieux de se limiter exclusivement aux substances autorisées dans l'Union Européenne.

La seconde étape fut donc d'étudier la réglementation des pesticides à l'étranger, en particulier chez les principaux producteurs d'huiles essentielles.

III.1.1.2. A l'étranger

Les recherches se sont principalement concentrées sur les principaux producteurs d'huiles essentielles qui sont le Brésil, l'Inde et la Chine. Les Etats-Unis, ayant une réglementation assez proche de l'UE, n'ont pas fait l'objet de recherche. La recherche de données réglementaires précises s'est malheureusement révélée infructueuse pour la Chine ; en revanche des données ont pu être trouvées pour le Brésil et l'Inde.

En Inde, les pesticides sont légiférés par « Central Insecticides Act 1968 ».[136] Le 26 février 2006, 206 pesticides étaient ainsi autorisés parmi lesquels certains sont interdits dans l'UE (atrazine, benfuracarbe…).

Au Brésil, environ 420 substances actives autorisées sont référencées sur le site « ANVISA » (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).[137] De même que pour l'Inde, un nombre important de ces substances ne sont plus permises en Europe.

Enfin, le site internet « fluoridalert »[138] a également permis d'obtenir des données sur l'utilisation de pesticides fluorés dans le monde et de déterminer ceux bannis en Europe et encore utilisés à l'étranger (chlorfluazuron, dichlofluanide…).

Après l'aspect réglementaire, les conditions d'emplois des pesticides sont un critère déterminant quant à leur sélection.

III.1.2. L'usage

Le type de cultures traitées apparaît comme le critère le plus pertinent pour sélectionner les substances actives d'intérêt. Les molécules retenues en priorité sont donc celles dont l'utilisation porte plus particulièrement sur les végétaux dont sont issues les huiles

essentielles, c'est-à-dire les plantes à parfums, aromatiques et médicinales, les cultures florales et les hespéridés. Ces données ont été renseignées à l'aide de l'index phytosanitaire ACTA,[139] le manuel des pesticides[124] et le site internet e-phy[140] sous label du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.

Enfin, il a été décidé de prendre en compte les substances actives les plus dangereuses (toxicité élevée) pour la santé humaine même si ce ne sont pas celles qui présentent le plus de risque. En effet, **un danger** est ce qui est susceptible de causer un préjudice ou un effet nocif alors que **le risque** est la probabilité que ce danger survienne.

III.1.3. La toxicité

Cette recherche s'est essentiellement basée sur un rapport publié par GREENPEACE en février 2008.[141] Cette étude, fondée sur les données toxicologiques (toxicité aigüe, chronique ; effets carcinogènes, mutagènes…) a permis de classer l'ensemble des substances actives (1134) en trois listes.

- Liste noire : pesticides particulièrement dangereux. Elle comprend 327 substances actives représentant 29 % de l'ensemble des substances référencées, parmi lesquelles il est important de noter que 168 étaient autorisées (en 2008) par l'UE.

- Liste grise : pesticides ne présentant pas de caractères dangereux particuliers. Cette liste comprend 243 substances actives, soit 21 % des substances étudiées.

- Liste jaune : pesticides pour lesquels peu de données sont disponibles. 564, soit 50 % des substances examinées n'ont pu être évaluées du fait du manque de données. Il est par conséquent impossible d'apprécier leur danger.

III.1.4. Conclusion

D'autres informations, permettant de vérifier la pertinence de la liste obtenue à partir du croisement de ces trois types de données, sont venues compléter les critères de sélection définis ci-dessus pour minimiser le risque d'écarter des molécules d'intérêt. Elles concernent les pesticides référencés dans la Pharmacopée Européenne[142] et le codex alimentarius dont la présence dans le screening est indispensable.[143] Les autres données proviennent de la recherche bibliographique avec, notamment, la liste des pesticides communément utilisés

dans l'industrie des huiles essentielles en Australie, définie par le RIRDC (Rural Industries Research and Development Corporation).[34]

Dans le cas de la présente étude, deux listes ont pu être établies. La première présente un screening relativement large, regroupant les 300 molécules les plus pertinentes (Annexe 4). La seconde, appelée « liste prioritaire » concerne 74 substances actives (s.a.) qui sont, *a priori*, les plus susceptibles d'être détectées dans les huiles essentielles. Ces dernières sont référencées par l'ACTA[139] ou le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche[140] comme étant appliquées sur les cultures de PPAM ou faisant partie de la liste des pesticides utilisés dans l'industrie des huiles essentielles.[34]

Liste prioritaire de 74 substances actives				
2,4D	Carbétamide	Diquat	Méfénoxam	Propazine
Abamectine	Chloridazone	Diuron	Métamitrone	Propiconazole
Acephate	Chlorprophame	Ethofumesate	Métazachlore	Propyzamide
Acétamipride	Chlorpyrifos	Fluazifop-p-butyl	Méthomyl	Prosulfocarbe
Acibenzolar - S- méthyl	Chlopyralid	Flurochloridone	Monocrotophos	Pymétrozine
Aclonifen	Cycloxydime	Fluroxypyr	Napropamide	Quizalofop-p-éthyl
Amidosulfuron	Cyhalothrine-λ	Haloxyfop	Norflurazon	Sethoxydim
Asulam	Cyromazine	Iprodione	Oryzaline	Simazine
Azoxystrobine	Dicamba	Isoproturon	Oxadiazon	Sulfosulfuron
Bentazone	Deltaméthrine	Isoxaben	Oxyfluorfene	Tau-fluvalinate
Bifenthrine	Difénoconazole	Lénacile	Paraquat	Tebuconazole
Bromacil	Dichlobenyl	Linuron	Pendiméthaline	Terbacil
Butraline	Diflufénicanil	Mancozèbe	Pirimicarbe	Triclopyr
Carbaryl	Dimethenamid	MCPA	Procymidon	Trifluraline
Carbendazime	Dimethoate	Mecoprop	Prometryn	

Tableau 6. Liste prioritaire de 74 s.a. à rechercher dans les huiles essentielles

La liste des substances actives à rechercher dans les huiles essentielles ayant été établie, il faut désormais déterminer la méthode analytique la plus à même de détecter ces composés. Pour ce faire, il est primordial de réaliser un état de l'art des méthodes d'analyse de pesticides dans les huiles essentielles.

III.2 Etat de l'art sur l'analyse des pesticides dans les huiles essentielles

Les capacités de la spectrométrie de masse en tandem associée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) ou chromatographie liquide (LC-MS), pour la détermination d'une multitude de pesticides dans les produits alimentaires et les matrices environnementales, sont aujourd'hui bien établies.[3-8] La sensibilité et sélectivité des techniques MS/MS se sont nettement améliorées avec le développement du mode d'acquisition appelé « Selected

Reaction Monitoring » (SRM) qui aide à réduire les interférences potentielles dues à la matrice.[20,144] Dans le domaine d'analyse multi-résidus de pesticides, les analyseurs de type triple quadripôle (QqQ)[23,145-148] et trappe d'ions (ITD)[24,25,28,149,150] utilisent largement le mode SRM, de même que les analyseurs hybrides quadripôle-trappe d'ions linéaire (QqLIT).[32,151,152] En réalisant deux analyses avec des injections distinctes, Greunlich et Alder ont démontré la capacité des instruments LC-MS/MS modernes à détecter 300 pesticides dans l'eau potable à des concentrations très faibles, ceci sans étape de préconcentration ou purification.[35] Avec la possibilité de créer manuellement des périodes SRM qui se chevauchent sur la base des temps de rétention des analytes, Kmellár *et al.* et Hiemstra and de Kok ont donné à la LC-MS/MS la capacité de détecter respectivement 160 et 171 pesticides multi-classes dans différents types de légumes.[33,153] Dans le cadre du développement d'une méthode d'analyse sur une matrice huileuse, Hernando *et al.* ont été capables de détecter 100 pesticides dans l'huile d'olive par LC-MS/MS.[32] Cependant, l'huile d'olive est exclusivement obtenue à partir de procédés mécaniques et/ou physiques mais sans traitement supplémentaire.[154]

Dans le cas des huiles essentielles, le challenge ne concerne pas seulement la détection et la quantification d'une grande variété de pesticides. Il consiste également à comprendre les effets de la préconcentration et de l'isolement des pesticides de la matrice puisque les constituants des huiles essentielles présentent des propriétés physico-chimiques similaires à ceux des pesticides. Dans ce contexte, relativement peu d'articles ont été publiés sur l'analyse des pesticides dans les huiles essentielles. Les exemples publiés dans la littérature couvrent des matrices aussi différentes que les huiles essentielles de citrus (citron ou bergamote)[155-157] ou les huiles essentielles distillées de menthe poivrée, persil, ou fenouil.[34,158-160] Cependant, le nombre de pesticides ciblés dépasse rarement dix et est généralement limité à une ou deux catégories de pesticides, *i.e.* les organochlorés,[155-157] les organophosphorés,[157] ou les pesticides acides.[34] Par exemple, Garland *et al.* ont établi un guide pour la détermination de diverses classes de pesticides dans plusieurs huiles essentielles. Cependant, jamais plus de dix pesticides ne sont analysés simultanément.[34] De même, le travail de Barrek *et al.* présente l'analyse multi-résidus de vingt-deux pesticides au moyen des couplages GC-MS (12 pesticides) et LC-MS (10 pesticides) dans les huiles essentielles de citrus.[156]

Concernant la sensibilité de ces méthodes, les limites de détection (LOD) sont souvent supérieures à 20 $\mu g.L^{-1}$ pour les composés les plus sensibles. La meilleure LOD atteinte est 0,5 $\mu g.L^{-1}$ pour la propazine[34] dans l'huile essentielle de persil mais, dans la même méthode, une LOD de 200 $\mu g.L^{-1}$ est obtenue pour le tébuconazole[34] indiquant la grande disparité des limites de détection lorsque les pesticides sont analysés dans ce type de matrice.

Préalablement à l'analyse, la préparation de l'échantillon, constituée généralement de procédés d'extraction ou de purification, est limitée dans le cadre des huiles essentielles. Les méthodes développées proposent des extractions sur phase solide (SPE) sur colonne de silice,[155] sur des cartouches de type « Florisil »[156,159] ou « Bond Elute »,[34] des extractions liquide/liquide,[34,159] ou encore une séparation par chromatographie échangeuse d'ions.[34] La dernière solution consiste à injecter directement l'huile essentielle après une dilution dans le solvant d'injection.[34,157,160]

L'état de l'art réalisé sur l'analyse des pesticides dans les huiles essentielles témoigne de la difficulté du sujet par le peu de références bibliographiques existantes (environ une dizaine) et le manque de performance des méthodes analytiques proposées, aussi bien en termes de nombre de pesticides analysés (pas plus de douze simultanément) qu'en termes de limite de détection. Il est donc nécessaire de mettre au point une méthode d'analyse multi-résidus, capable de détecter un screening plus large de pesticides avec un seuil de détection plus bas, pour disposer d'une méthode de contrôle efficace des pesticides dans les huiles essentielles.

D'un point de vue analytique, deux méthodes de choix basées sur une séparation chromatographique couplée à une détection par spectrométrie de masse dominent l'analyse des pesticides dans les matrices environnementales : la GC-MS et la LC-MS/MS. Si la GC-MS fut la première des deux techniques à démontrer ses performances dans ce domaine, la LC-MS/MS a rapidement comblé son retard ces dernières années pour finalement s'imposer aujourd'hui comme la technique de choix dans l'analyse des pesticides.

Chapitre II

Rappel Théorique sur la Spectrométrie de Masse Couplée à la Chromatographie en Phase Liquide (LC-MS/MS)

Le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem est devenu une technique analytique de référence dans le domaine de l'analyse de résidus de pesticides.

Ce chapitre, composé de deux parties, se consacre dans un premier temps au fonctionnement de la source electrospray et de ses variantes Ion Spray, dont la mise au point est à l'origine d'un couplage plus aisé de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse. Cette dernière technique fait l'objet de la seconde partie qui s'attachera à expliquer le fonctionnement d'un spectromètre de masse à champ quadripolaire et des possibilités offertes par ces instruments dans le cadre de la spectrométrie de masse en tandem.

A) La source d'ionisation par electrospray ESI

Les premiers couplages entre la LC et la MS furent réalisés au moyen d'interface TSP (Thermospray) et FAB (Fast Atom Bombardment). Mais la vraie percée de la LC-MS dans le milieu de l'analyse environnementale arriva avec le développement de l'electrospray (ESP).[10] Si l'ESP fut introduit en 1968 par Dole *et al.*,[161] son couplage expérimental avec la MS n'eut lieu qu'en 1984.[162,163] Depuis lors, cette technique ainsi que les sources à pressions atmosphériques (API) n'ont cessé d'évoluer[164] pour atteindre le degré d'utilisation que nous connaissons aujourd'hui.

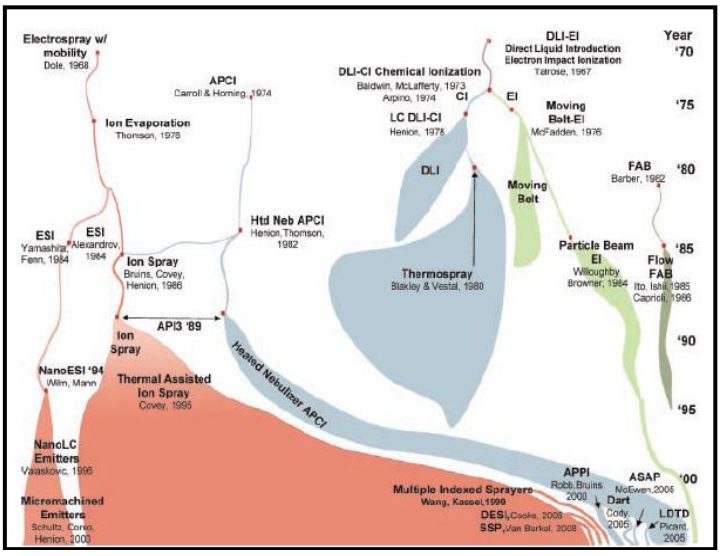


Figure 16. Histoire des sources à pressions atmosphérique[164]

Le principe de ces sources consiste à former un spray continu, issu d'un effluent de chromatographie liquide ou électrophorétique. Les ions préexistants en solution, ou formés ultérieurement en phase gazeuse, sont extraits dans un processus d'ionisation à pression atmosphérique à travers plusieurs étapes de pompages dans le vide du spectromètre de masse. Les quatre avantages significatifs à l'origine de l'incroyable succès des techniques API sont :[165]

- les techniques API peuvent soutenir des débits compatibles avec la LC ;
- les techniques API sont adaptées à l'analyse de composés non-volatils, de polarités moyennes à très polaires et à la détection de composés thermiquement instables ;
- les techniques API sont d'une sensibilité qui approche celles obtenues en GC-MS ;
- les techniques API sont très robustes et faciles d'utilisation.

Dans le domaine des résidus de pesticides, le choix entre les interfaces ESI et APCI n'est pas aisé, d'autant que les conditions analytiques ne sont pas toujours optimales pour les deux techniques.[16] Cependant, au vu du nombre d'applications,[5,21] l'ESI reste l'interface la plus universelle et est considérée comme le « golden standard » de la LC-MS.[21] Le Tableau 7 présentent les possibilités de couplage entre les sources d'ionisation ESI et APCI et la LC.

Mode	ESI	APCI	Commentaires
RPLC	+++	++	Formation d'ions en solutions possible ; volatilité de l'échantillon normalement limité ; évaporation de la phase mobile dépendant du pourcentage d'eau ; utilisation d'additifs pour les phases mobiles.
NPLC	+	+++	Normalement, pas de formation d'ions en solution (miscibilité limité avec les phases non aqueuse), échantillon plus volatil qu'en RPLC.

Tableau 7. Comparaison des compatibilités des sources API-MS avec la RPLC et la NPLC adapté[166]

De plus, si auparavant, la limitation en termes de débit due à la source ESI (~0,2 $mL.min^{-1}$) pouvait poser des problèmes de couplage avec la LC, ou du moins des contraintes d'optimisation, l'évolution de la géométrie[164,167] et de la technologie des sources à pression atmosphérique autorise désormais à combiner l'ESI avec des débits classiques d'HPLC de l'ordre de 1 $mL.min^{-1}$.[165] Ces interfaces portent généralement le nom de « Pneumatically assisted electrospray » ou « Ion Spray ».[168]

L'interface de choix pour le couplage de la LC avec la MS dans le domaine de l'analyse multi-résidus de pesticides reste donc l'ESI. Il ne faut cependant pas délaisser totalement l'APCI qui constitue une véritable méthode complémentaire de l'ESI sur une gamme assez large de pesticides. Elle peut présenter moins d'**effets matrice**[17] et permettre d'accéder à l'analyse de composés plus apolaires. Un dernier point important concerne le changement de source ESI/APCI qui est généralement très aisé sur les spectromètres de masse modernes.

I. L'ionisation par electrospray

Le principe de l'electrospray est basé sur la génération d'ions en phase gazeuse à partir d'un analyte dissous dans une solution perfusant à travers un fin capillaire métallique. Celui-ci, maintenu à une certaine valeur de potentiel par rapport à une contre-électrode perçée, permet l'échantillonage des ions produits (Figure 17). Une différence de potentiels de valeur adéquate et la présence d'un gaz coaxial au capillaire, permettent de disperser l'analyte chargé dans des fines gouttelettes qui vont subir une succession d'évaporation de solvant et de fissions coulombiennes pour, finalement, conduire à la production d'ions en phase gazeuse.[169]

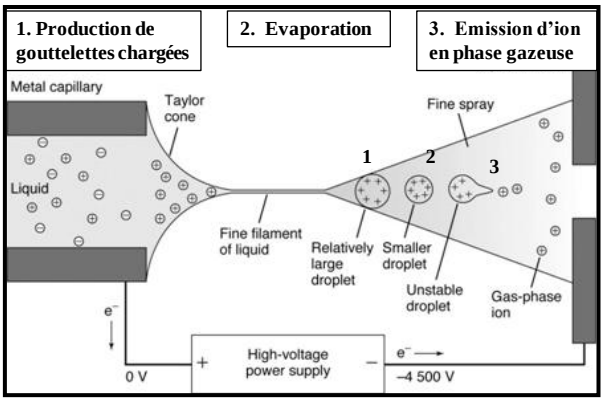


Figure 17. Illustration schématique du principe d'ionisation par electrospray

Comme le montre la Figure 17, le processus dans sa globalité se résume en trois étapes principales, toutes se déroulant à pression atmosphérique :[166]

1. production de gouttelettes chargées à l'extrémité du capillaire ;
2. rétrécissement des gouttelettes par évaporation du solvant et désintégrations répétées et successives des gouttelettes conduisant à des gouttelettes hautement chargées et de tailles réduites ;
3. émission d'espèces ioniques solvatées en phase gazeuse à partir d'une gouttelette de petite taille selon un mécanisme encore sujet à discussion.

I.1 Production de gouttelettes chargées

L'analyte en solution est introduit dans la source à travers un capillaire métallique porté à un potentiel de 2 à 5 kV (positif ou négatif) par rapport à une contre-électrode éloignée de 1 à 5 cm. Sous ces conditions se crée un champ électrique intense E_c au niveau de la pointe du capillaire dont la valeur peut être déterminée par l'équation (3) :

$$E_c = \frac{2V_c}{r_c} \ln\left(\frac{4d}{r_c}\right) \quad (3)$$

où V_c est le potentiel du capillaire, r_c le rayon externe du capillaire et d sa distance par rapport à la contre électrode.[170]

Sous l'influence du gradient de champ électrique à l'extrémité du capillaire, une séparation des charges se produit. Dans le cas d'un champ positif, les anions vont migrer vers les parois du capillaire alors que les cations vont se propager vers le ménisque de la gouttelette formée à la pointe.[167] En présence d'un champ électrique suffisant, le liquide

émerge de l'extrémité du capillaire sous la forme d'un cône, communément appelé « cône de Taylor » (Figure 18).

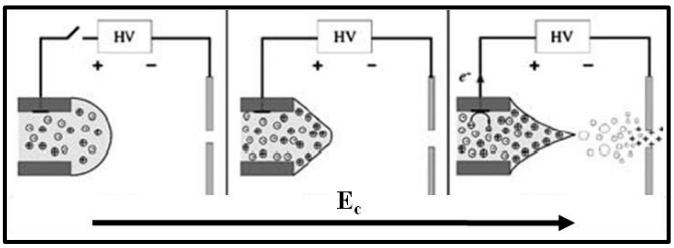


Figure 18. Evolution de l'interface avec une augmentation de E_c adapté[169]

Quand les forces de répulsions électrostatiques approchent la tension de surface du cône de Taylor, les gouttelettes chargées sont expulsées de la pointe sous la forme d'un spray. La taille des gouttelettes, qui dépend du débit de phase mobile et du diamètre du capillaire, est un point critique quant à l'efficacité de l'ionisation.[167] Une fois expulsées du capillaire, les gouttelettes contenant l'excès de charges suivent les lignes de champ électrique à pression atmosphérique vers la contre-électrode. Les trajectoires sont cependant affectées par les effets de charges d'espace et les flux de gaz.

I.2 Intervention d'un processus électrochimique

Les réactions électrochimiques qui se déroulent à l'interface conducteur-solution, à l'intérieur ou très près de la sortie du capillaire ESI, font partie intégrante de la production et du chargement des gouttelettes ESI. Interrogé sur le débat concernant l'importance de l'électrochimie en ESI, le pionnier de l'ESI-MS, John FENN déclara « the idea that electrochemical reactions might be taking place in an ES source… was too obvious to mention ».[171]

La source d'ionisation peut, en effet, être considérée comme une cellule électrochimique constituée d'une anode, l'émetteur ou le capillaire, et d'une cathode, la contre-électrode. La conduction à travers la cellule est soutenue par le mouvement des ions dans la solution puis dans la phase gazeuse avant d'atteindre la contre-électrode. Dans ce flux électrochimique, l'étape limitante est l'éjection des gouttelettes, conditionnée par le courant de l'electrospray i_{ES} qui a pour expression simplifiée dans le cas de solutions suffisamment conductrices (4) :[169]

$$i_{ES} = f\ \varepsilon_r\ (\gamma \kappa \nu_f \varepsilon_r)^{1/2} \qquad (4)$$

où $f(\varepsilon_r)$ est une fonction dépendante de la constante diélectrique du solvant, γ est la tension de surface du solvant, κ la conductivité de la solution et ν_f est le débit. La loi de la continuité du

courant impose que le courant de Faraday i_F, associé à l'oxydation des espèces de la solution électrolyte à l'anode, soit toujours égal au courant du spray i_{ES} (5).[169]

$$i_F = i_{ES} \tag{5}$$

Pour soutenir l'accumulation et la perte d'un excès d'ions de même polarité dans les gouttelettes chargées et pour autoriser un courant à travers le circuit, des réactions hétérogènes de transferts d'électrons (produisant le courant de Faraday) doivent se dérouler à l'interface métal/solution dans l'émetteur et à la contre-électrode.[171] Les électrolytes avec le plus faible potentiel d'oxydation seront oxydés en premier. Puis, si le courant n'est pas suffisant, les composés avec un potentiel supérieur subiront l'oxydation de manière à garder un courant constant.[166,169,171,172]

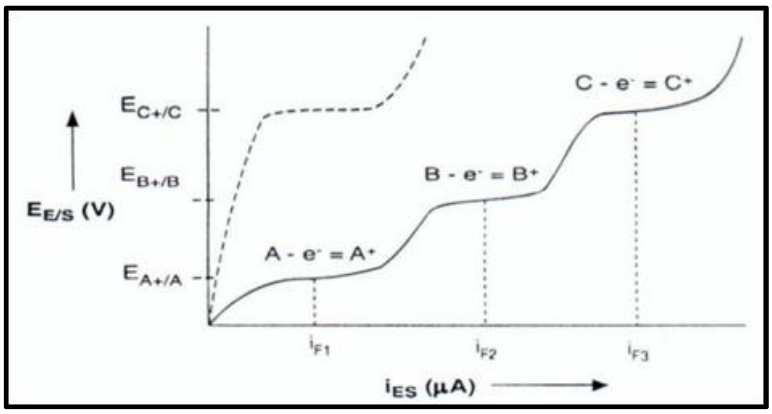


Figure 19. Illustration schématique, basée sur les réactions se produisant dans une source ESI montrant l'interdépendance du potentiel à l'interface électrode/solution $E_{E/S}$, dans le capillaire comme une fonction du courant i_{ES} et de la composition des espèces électroactives en solution. Trait plein : trois électrolytes A, B et C avec des potentiels $E_{A+/A} < E_{B+/B} < E_{C+/C}$ sont présents en solutions à concentrations égales. Trait rayé : seule l'espèce électroactive C est présente en solution.[166]

La concentration de l'excès de charges dans les gouttelettes chargées [Q] (mol.L^{-1}) peut être calculée à partir de la première loi de l'électrolyse de Faraday :[171]

$$Q = \frac{i_F}{(F\nu_f)} = \sum_i n_i c_i \tag{6}$$

où F est la constante de Faraday (96 485 C.mol^{-1}), ν_f est le débit volumétrique de la solution, i est le nombre de réactions d'électrolyse différentes, n_i l'équivalent molaire en électrons engagés dans la production d'une mole du produit de l'électrolyse de l'espèce i, et c_i la concentration de l'espèce produite. Cette relation illustre le fait que la concentration de l'espèce produite c_i sera minimisée en cas de débit important ν_f, d'un faible courant et d'un nombre élevé de réactions parallèles. L'impact de l'électrochimie sur la solution sera d'autant plus grand que le débit sera faible.[171]

Toutefois, dans la majorité des expériences, les réactions chimiques impliquent les espèces de la phase mobile (solvant et additifs) présentes à haute concentration et/ou le capillaire lui-même (corrosion de l'acier inoxydable). Les analytes classiquement sujets à l'analyse en ESI sont en effet considérés comme des électrolytes « spectateurs ».[166] De plus, beaucoup d'analyses sont conduites à des débits de l'ordre de 10 µL.min^{-1} à 1 mL.min^{-1} limitant donc le temps disponible pour que des réactions électrochimiques homogènes aient lieu avec les espèces diluées.[171] Par exemple l'eau qui est un solvant utilisé très couramment en ESI donne lieu à de nombreuses réactions électrochimiques (Tableau 8).

Oxydation (ESI+)	**E^0 (V) vs SHE**	**Réduction (ESI-)**	**E^0 (V) vs SHE**
$4OH^- = 2H_2O + O_2 + 4e^-$	0,4	$O_2 + 4H^+ + 4e^- = 2H_2O$	1,23
$2OH^- = H_2O_2 + 2e^-$	0,88	$O_2 + 2H^+ + 2e^- = H_2O_2$	0,70
$2H_2O = O_2 + 4H^+ + 4e^-$	1,23	$2H_2O + O_2 + 4e^- = 4OH^-$	0,40
$2H_2O = H_2O_2 + 2H^+ + 2e^-$	1,77	$2H_2O + 2e^- = H_2 + 2OH^-$	0,07
$OH^- = OH^* + e^-$	1,89	$2H^+ + 2e^- = H_2$	0,00
		$O_2 + 2H_2O + 2e^- = H_2O_2 + 2OH^-$	-0,13
		$O_2 + e^- = O_2^-$	-0,33

Tableau 8. Réactions électrochimiques de l'eau en ESI[171]

La production de protons due à l'oxydation de l'eau peut induire des changements importants dans la solution à l'extrémité du capillaire, notamment une diminution considérable du *pH*. En effet, la concentration de protons produits par cette réaction peut être déterminée par :

$$\left[H^+\right] = \frac{i_{ES}}{nF\nu_f}. \tag{7}$$

Les protons produits électrochimiquement vont être à l'origine d'un changement de *pH* qui peut être exprimé tel que :

$$\Delta pH_{\max} = -\log\ [H^+]_{initial} + [H^+]_{elec}\ - pH_{initial} \tag{8}$$

Les équations (7) et (8) montrent que l'amplitude de variation du *pH* (ΔpH_{max}) est directement reliée à la grandeur i_{ES} et inversement proportionnelle au débit ν_f. Par exemple, pour la pulvérisation d'un analyte en solution aqueuse à $pH_{initial}$ = 7 et en supposant un courant i_{ES} de 0,1 µA, le *pH* de la solution résultant dans le capillaire pour des débits de 10, 1,0 et 0,1 µL.min^{-1} serait respectivement de 5,2, 4,2 et 3,2.[166] La variation de *pH* a une influence sur la formation des ions et facilite, notamment, la formation d'ions $[M+H]^+$.

I.3 Evaporation du solvant et fission coulombienne

Sous l'effet conjugué des gaz séchant et de nébulisation, du chauffage de la source et du gradient de pression, le solvant de la gouttelette s'évapore (désolvatation) et conduit à une réduction de sa taille et donc à une augmentation des répulsions électrostatiques des charges à l'intérieur de celle-ci. Lorsque la gouttelette atteint un certain rayon, les répulsions coulombiennes égalent les forces cohésives de la tension de surface du liquide. Le résultat de cette instabilité est la fission de la gouttelette qui libère un jet de gouttelettes filles de plus petites tailles. Ce phénomène, appelé « fission Coulombienne » se produit lorsqu'est atteinte la limite de Rayleigh, définie par l'équation (9) :[172]

$$Q_{Ry} = 8\pi(\varepsilon_0 \gamma R^3)^{1/2} \tag{9}$$

où Q_{Ry} est la charge de la gouttelette, γ la tension de surface du solvant, R le rayon de la gouttelette et ε_0 la permittivité électrique.

La fission de la gouttelette, qui peut être de type « régulière » ou « irrégulière », donne respectivement des gouttelettes filles de tailles équivalentes ou non. Elle se produit à chaque fois que la limite de Rayleigh est atteinte, conduisant ainsi à la création de gouttelettes de plus en plus petites (Figure 20).

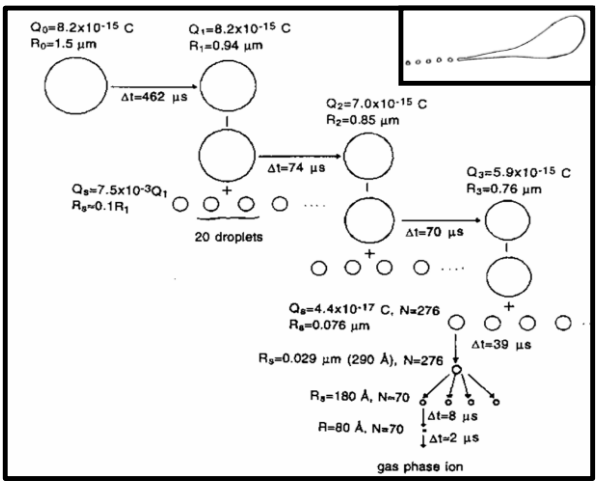


Figure 20. Représentation schématique de « l'histoire » d'une gouttelette[173] (insert : fission irrégulière) ; N est le nombre de charges élémentaires dans la gouttelette, R le rayon de la gouttelette en µm, Δt est le temps nécessaire à l'évaporation du solvant pour atteindre la fission.

Le processus répété de fission Coulombienne des gouttelettes parentes, conduisant à des gouttelettes filles de plus en plus petites, mènera finalement à de très petites gouttelettes chargées, précurseurs des ions en phase gazeuse. Le mécanisme par lequel ces ions sont produits à partir de la gouttelette finale est décrit selon deux théories.

I.4 Formation des ions en phase gazeuse

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation des ions en phase gazeuse à partir de gouttelettes très petites et très chargées. Proposé en 1968 par Dole *et al.*, le premier mécanisme, du nom de « Charged Residue Model » ou CRM, s'adresse aux analytes de haut poids moléculaire.[161]

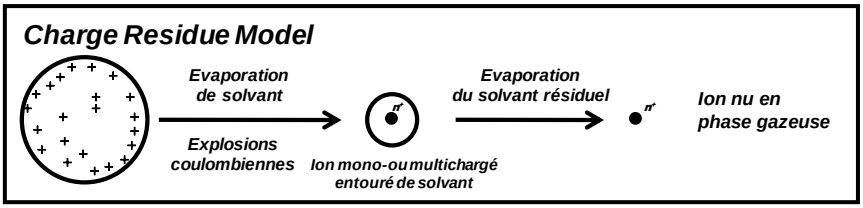


Figure 21. Représentation schématique du modèle CRM

L'hypothèse de ce modèle consiste à considérer que pour des macromolécules, lorsque de petites gouttelettes sont formées au cours du processus d'évaporation et d'explosions coulombiennes, certaines de ces gouttelettes ne seront formées que d'une molécule d'analyte associée à une ou plusieurs charges en surface. L'évaporation du solvant résiduel va conduire à la formation d'un ion en phase gazeuse dont la charge proviendra des charges qui étaient à la surface de la gouttelette disparue.[172]

Contrairement au CRM, le second modèle, IEM pour « Ion Evaporation Model » d'Iribarne and Thomson (1976), tente d'expliquer la formation d'ions en phase gazeuse issus de molécules de faible poids moléculaire.[174]

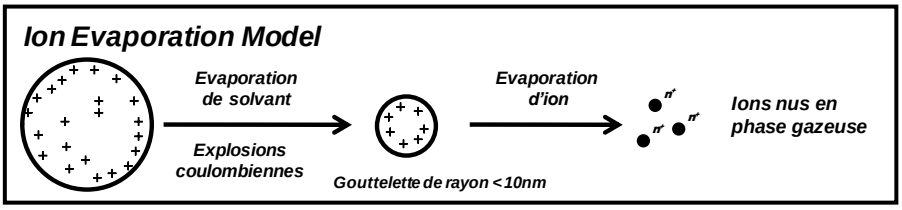


Figure 22. Représentation schématique de l'IEM

L'IEM est basé sur le principe selon lequel l'ion sera directement émis en phase gazeuse à partir d'une gouttelette, lorsque la réduction de celle-ci, par les processus d'évaporation de solvant et de fission coulombienne, conduira à une gouttelette de rayon inférieur à 10 nm.[172]

I.5 Poursuite de la désolvatation à l'interface pression atmosphérique-vide

Une fois en phase gazeuse, des réactions, notamment de transfert de proton peuvent avoir lieu. Elles dépendent de la basicité en phase gazeuse (GB) des espèces. Ainsi, si *GB(B)* > *GB(A)*, la réaction suivante pourra avoir lieu sans nécessité d'énergie d'activation :

$$AH^+ + B \rightarrow A + BH^+ \quad (10)$$

Par conséquent, des analytes évaporés à l'état neutre peuvent se charger à travers des réactions de transfert de proton à partir du moment où ils ont une basicité en phase gazeuse assez élevée.[175]

Les ions sont produits en phase gazeuse sous la forme de clusters, associant l'espèce ionique d'intérêt et des molécules de solvant. Il reste, enfin, à les acheminer vers l'analyseur au moyen d'une interface permettant de passer de la pression atmosphérique de la source au vide poussé du spectromètre de masse, tout en continuant le processus de désolvatation.

Les ions créés dans la source doivent effectivement être transportés d'une pression atmosphérique dans un vide poussé de l'ordre de 3.10^{-5} Torr. A la fin du processus d'ionisation, il reste généralement quelques molécules de solvant ou clusters liés aux ions en phase gazeuse qu'il faut éliminer avant l'entrée dans l'analyseur. La **déclusterisation** est un terme utilisé pour décrire le processus consistant à éliminer les dernières molécules de solvant en intéraction avec les ions en phase gazeuse. A noter que la **désolvatation** est un terme plus large incluant le processus d'évaporation des gouttelettes macroscopiques.[164] Cette étape est réalisée en séchant les ions grâce à l'application d'un gaz séchant à contre courant (Schéma 5) et d'une température adaptée en fonction du débit de phase mobile.

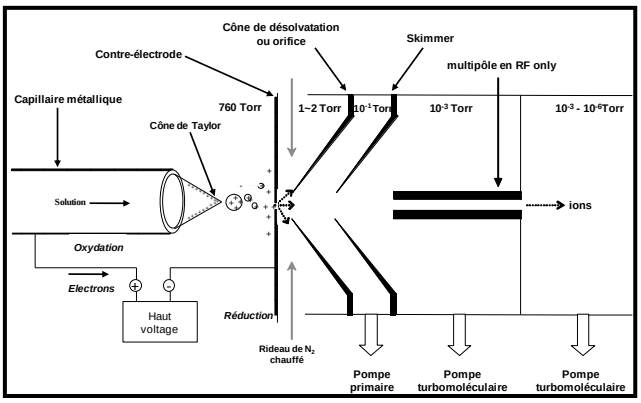


Schéma 5. Schéma de l'interface P_{atm}-vide d'une source ESI

Cependant, la déclusterisation complète n'est pas toujours achevée dans la partie à pression atmosphérique. De plus, une éventuelle reclusterisation peut avoir lieu avec les molécules de solvant neutres, dans la région où les ions sont en expansion supersonique (Figure 23) du fait de leur passage à travers l'orifice de petit diamètre.[176] Pour éviter ce phénomène, un gaz circule à contre-courant entre l'orifice et le skimmer et une tension de déclusterisation DP (Declustering Potential) est appliquée entre l'orifice et le skimmer de manière à éliminer ces clusters par dissociation induite par collision (CID).

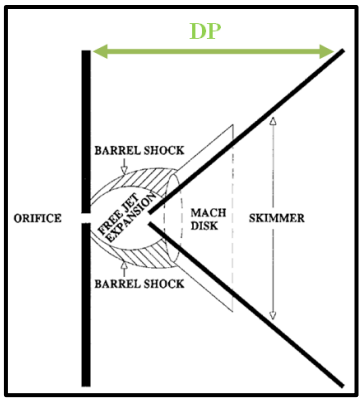


Figure 23. Structure du jet supersonique

La Figure 23 montre la structure en tonneau du jet en expansion qui se termine sous la forme d'un disque de Mach. Le skimmer est généralement placé à l'intérieur de ce disque de manière à optimiser la focalisation et la déclusterisation des ions.[164] Les ions sont ensuite refocalisés par le champ radiofréquence du guide d'ion multipolaire (quadripôle, hexapôle, octopôle) qui va les diriger vers l'analyseur. L'ensemble de ces étapes permet de passer progressivement de la pression atmosphérique à un vide poussé, avec l'aide de pompes primaire et turbomoléculaires disposées aux endroits adéquats de l'analyseur (Schéma 5).

I.6 Electrospray assisté par nébullisation pneumatique ou Ion Spray

Actuellement, la dénomination « electrospray » laisse sous entendre, par abus de langage, l'utilisation d'une assistance mécanique à la nébulisation et implique l'emploi d'un gaz coaxial pour la formation du spray. Le développement de variantes à la source electrospray provient de la volonté de disposer d'interfaces compatibles pour le couplage avec la chromatographie liquide. C'est-à-dire des sources capables d'accepter une gamme élargie de débits (dizaines à centaines de millilitres par minute) et qui soient tolérantes au changement de composition de la phase mobile. Comme il a été montré précédemment, le débit a un impact direct sur la taille des gouttelettes. Par conséquent, à débit élevé, les gouttelettes formées seront de tailles considérables. Le processus conduisant ces gouttelettes macroscopiques à la formation d'ions en phase gazeuse totalement désolvatés n'est pas encore entièrement connu.[164] Les deux principaux modèles (CRM et IEM) concluent sur la formation d'ions en phase gazeuse contenant probablement un nombre de molécules de solvants attachées. Si les techniques à haut et bas débits partagent le même mécanisme d'ionisation et de chargement des gouttelettes, elles diffèrent dans le processus de création des gouttelettes. En effet, pour des faibles débits, la production de gouttelettes chargées passe par

l'intermédiaire d'un cône de Taylor, ce qui n'est plus le cas à haut débit où il est davantage question de jet dynamique (Figure 24).[164]

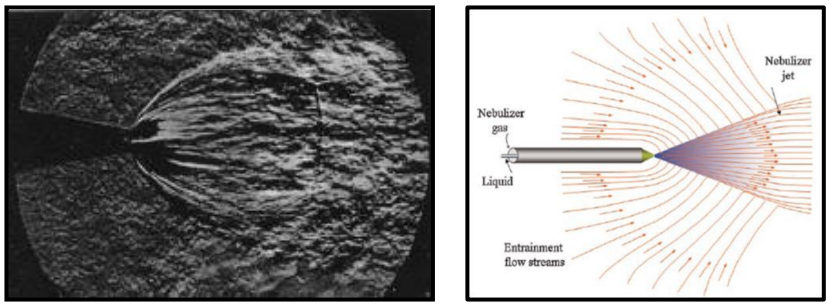


Figure 24. Photographie (à gauche) et schéma (à droite) d'un jet d'air provenant d'un nébuliseur et montrant la structure de Mach[164]

La majorité des nébuliseurs atteignent aujourd'hui des vitesses de gaz de l'ordre de 100 à 300 $m.s^{-1}$ (Mach 1) sur des distances inférieures à 3 mm conduisant à des accélérations moyennes de 340 000 g. A un tel débit, les forces turbulentes aérodynamiques correspondantes à l'interface liquide-gaz provoqueraient la rupture de n'importe quel liquide en populations de gouttelettes chargées de tailles variables (submicrons à plusieurs dizaines de microns). La région la plus intéressante est celle qui est située la plus proche de l'extrémité du jet, car c'est à cet endroit que se situe la densité la plus importante de gouttelettes de petites tailles.[164]

A ces vitesses, plus de 20 L d'air sont consommés par minute, ce qui présente une excellente opportunité de transférer une large quantité de chaleur aux gouttelettes et ainsi obtenir une désolvatation rapide et efficace. En effet, avec 10 à 20 $L.min^{-1}$ d'air chauffé à 800°C, 1 $mL.min^{-1}$ d'eau serait complètement désolvaté sur quelques centimètres.[164] Si en première approximation, de telles températures pourraient laisser supposer l'occurrence de dégradations thermiques, celles-ci restent rares. En effet, les modèles analytiques prévoient que la température à l'intérieur de la gouttelette n'est pas beaucoup plus élevée que la température ambiante. Ainsi une gouttelette chauffée à 750°C n'atteindra qu'une température d'environ 44°C en son sein.[164]

L'**efficacité d'échantillonnage** est le produit de l'**efficacité d'ionisation** (efficacité de création d'ions à pression atmosphérique) et de l'**efficacité de transfert** (efficacité de transfert des ions entre l'atmosphère et le vide). Elle correspond finalement à la fraction de molécules d'analyte présentes dans la solution et introduites dans la source qui est capturée par le spectromètre de masse en tant qu'ions. L'efficacité d'échantillonnage est beaucoup moins performante dans le cas de débit élevé (Figure 25).

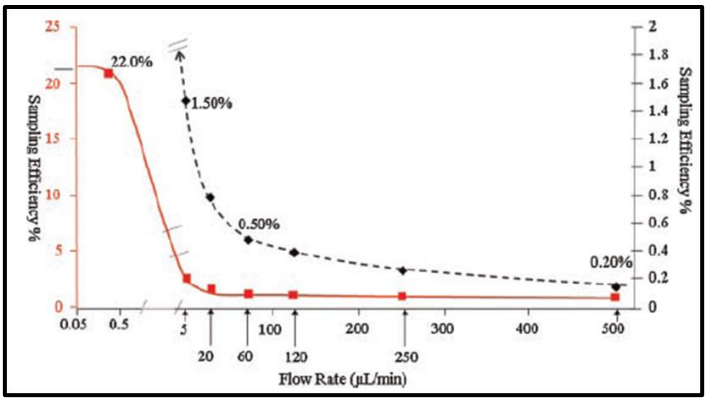


Figure 25. ***Efficacité d'échantillonnage en fonction du débit. La courbe noire en pointillée, à lire par rapport à l'axe Y de droite est une extension des valeurs basses de la courbe en rouge qui se réfère à l'axe Y de gauche.***[164]

La différence d'efficacité d'échantillonnage entre des hauts et bas débits peut atteindre un facteur 100, passant d'une efficacité maximale de 22 % pour un débit de 0,5 µL.min^{-1} à 0,2 % pour un débit de 500 µL.min^{-1}.[164] Toutefois, cette baisse d'efficacité pour les débits élevés peut être largement compensée par l'injection de volume d'échantillon beaucoup plus important autorisé par les systèmes HPLC.

I.7 Conclusion

L'ionisation par electrospray permet l'ionisation et le transfert en phase gazeuse des espèces neutres ou ioniques présentes initialement dans la solution. Les ions d'analyte peuvent être formés par oxydation ou réduction électrolytiques, à partir de réactions acide/base à l'intérieur des gouttelettes, ou à partir des réactions de transfert de proton en phase gazeuse se déroulant entre les ions libérés des gouttelettes.[177] Ce procédé d'ionisation conduit majoritairement à la formation d'ions $[M+H]^+$ en mode positif, et $[M-H]^-$ en mode négatif dans le cas de l'analyse de petites molécules. En effet, l'ionisation de macromolécules telles que les peptides et les protéines génèrent couramment des ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$ dus à la présence de nombreux sites basiques, ce qui permet de s'affranchir des limites en masse des spectromètre de masse.[178] La formation d'adduits de type sodium $[M+Na]^+$, potassium $[M+K]^+$, ammonium $[M+NH_4]^+$ en mode positif est régulièrement observée et peut aider à l'ionisation de certains composés neutres et/ou polaires.[175]

La mise au point de source de type Ion Spray permet un couplage aisé de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse.

II. Le couplage chromatographie liquide – source electrospray

Cette partie a pour objectif de décrire synthétiquement la chromatographie liquide dans le but de cerner les principaux éléments intervenant dans son couplage avec la source electrospray et ses conséquences sur la mise au point d'une méthode analytique LC-ESI/MS. Pour une description plus détaillée de la chromatographie liquide, et notamment des différents critères de séparation, il est conseillé au lecteur de se référer à ces ouvrages.[179-183]

II.1 Introduction à la chromatographie liquide

La chromatographie est une méthode d'analyse immédiate qui permet de séparer les constituants d'un mélange, en utilisant les différences entre les constantes d'équilibre de ces composés, lors de leur partage entre une phase mobile dans laquelle ils sont solubles et une phase dite fixe, ou stationnaire, qui exerce sur eux un effet retardateur.[179] Cette technique se décline sous de nombreuses formes selon la nature des phases et des phénomènes mis en jeu, ainsi que le schématise la Figure 26.

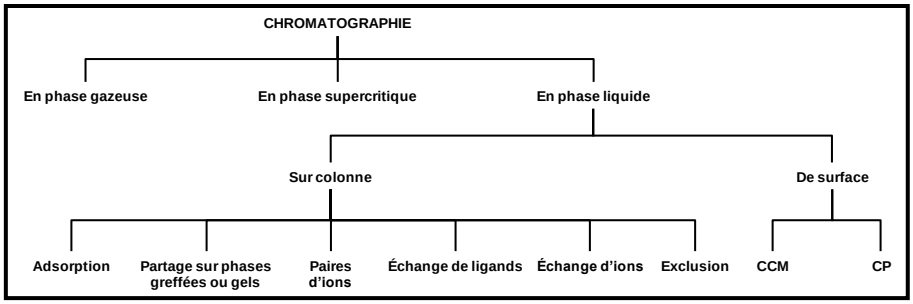


Figure 26. Classification des méthodes chromatographiques

Grâce à sa vitesse et sa sensibilité, la chromatographie en phase gazeuse a été bien plus utilisée que celle en phase liquide. Cependant, le potentiel de cette dernière est bien plus important puisque environ 85 % des composés connus ne sont pas suffisamment volatils ou stables thermiquement pour être analysés en GC.[180] La LC présente également l'avantage d'être plus polyvalente du fait de l'interaction de trois composantes (soluté, phase mobile, phase stationnaire) contre seulement deux pour la GC (soluté, phase stationnaire) et de la variété des phases stationnaires disponibles. Enfin, le couplage de cette technique avec la spectrométrie de masse à travers les sources à pression atmosphérique a permis de résoudre son principal défaut, à savoir le manque de performance de ses détecteurs.

Dans le domaine de l'analyse de résidus de pesticides, trois modes chromatographiques sont principalement utilisés : la chromatographie de partage en phase inverse, la chromatographie de paires d'ions en phase inverse (IPRPLC) et la chromatographie

échangeuse d'ions (IELC).[5] Cependant, la technique prédominante reste la RPLC qui, grâce à sa robustesse et à sa facilité de mise en œuvre, couvre 80 % des applications en chromatographie liquide.[5]

II.2 La séparation en chromatographie de partage en phase inverse

II.2.1. Généralités

Les séparations en chromatographie liquide sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles, l'une stationnaire (silice vierge, greffée, alumine, résine échangeuse d'ions…), l'autre mobile (phase liquide constituée par un solvant ou plus souvent un mélange de solvants) qui permet d'entraîner l'analyte. Pour le soluté A, cet équilibre est décrit par l'équation (11) :

$$A_{mobile} \leftrightarrow A_{stationnaire} \tag{11}$$

La constante d'équilibre K de cette réaction est appelée coefficient de distribution (ou coefficient de partage) et se définit par la relation :

$$K = \frac{C_S}{C_M} \tag{12}$$

où C_S et C_M désignent respectivement les concentrations du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et liquide.

Les différences d'affinités des divers constituants du mélange pour ces deux phases vont entraîner des différences entre les vitesses de migration de ces composés au sein de la colonne, d'où une possibilité de séparation.

Une bonne séparation en chromatographie liquide implique :

- que les divers constituants du mélange soient retenus dans la colonne, donc présentent une affinité pour la phase stationnaire suffisante ;
- que les différents pics soient bien séparés, ce qui dépend de deux facteurs : la distance séparant les sommets des deux pics et leur largeur ;
- que l'analyse soit aussi rapide que possible.

II.2.2. Les mécanismes de retention en RPLC

Le comportement des solutés, les mécanismes de rétention et leurs interactions avec la phase mobile et la phase stationnaire ont toujours été un sujet très controversé en RPLC. Parmi les nombreuses recherches effectuées, la première théorie proposée fut celle de la solvophobicité en 1976.[184] Cette théorie considère que la phase stationnaire joue un rôle passif dans le processus de rétention (autre que fournir un site de liaison) et que cette rétention est principalement due aux interactions thermodynamiques ayant lieu dans la phase mobile.[185] Cependant, cette théorie ne permet pas d'expliquer la différence de sélectivité des colonnes vis-à-vis de la forme des hydrocarbures polyaromatiques,[186] de même que la forte relation entre la rétention et la densité de la phase greffée hydrocarbonée.[187]

Il semblerait en réalité que la rétention soit gouvernée par des processus de partage,[188] ou plus exactement par une combinaison des phénomènes de partage et d'adsorption.[189] En chromatographie liquide, l'**adsorption** correspond à un soluté situé à l'interface entre les greffons et la phase mobile (avec un probable second site d'adsorption près de la surface des silanols résiduels). Le **partage** correspond plus à un processus de transfert type liquide-liquide où le soluté se situe davantage dans la région centrale de la phase greffée.[190] Plus récemment, Rafferty *et al.* ont proposé une approche moléculaire basée sur la technique de Monte Carlo pour élucider les mécanismes de rétention en RPLC.[191] Leurs travaux ont mis en évidence l'intervention simultanée des processus de partage et d'adsorption qui dépendent de la nature du soluté,[191] mais également de la longueur de la chaîne greffée.[192] L'augmentation du taux de greffage conduit à une élévation du coefficient de transfert du soluté de la phase mobile à la phase stationnaire[193] (plus grande rétention), de même qu'à un meilleur alignement des chaînes allyliques qui forment une couche plus uniforme.[194] En revanche, la composition de la phase mobile n'influence que légèrement la conformation des chaînes, mais un épaississement de la région interfaciale avec une augmentation de la proportion de méthanol est cependant constaté.[195] L'implantation d'un groupement polaire (embedded polar group) dans la chaîne greffée C_{18} permet d'augmenter le taux de liaison hydrogène avec la phase mobile, ce qui accroît le pourcentage de cette dernière à l'intérieur de la phase stationnaire. Cela a pour effet de conduire à une meilleure organisation des chaînes greffées comparée à des C_{18} classiques, ainsi qu'à une meilleure rétention des composés polaires due à davantage de liaisons hydrogène entre le soluté et le groupement implanté.[196]

La séparation chromatographique résultant de ces mécanismes de rétention est caractérisée par la résolution chromatographique.

II.2.3. La résolution chromatographique

La résolution chromatographique R_S permet de caractériser la séparation de deux pics chromatographiques et se définit par la relation :

$$R_S = 2\frac{(t_{R_2} - t_{R_1})}{\omega_2 + \omega_1} \tag{13}$$

où t_{R1} et t_{R2}, et ω_1 et ω_2 sont respectivement les temps de rétention et les largeurs des pics des composés 1 et 2. Dans le cas de deux pics adjacents, leur largeur est supposée égale, soit $\omega_1 = \omega_2$ et par conséquent :

$$R_S = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\omega_2} \tag{14}$$

Il découle de cette relation que la séparation entre deux pics sera d'autant meilleure que R_S est grand (Figure 27).

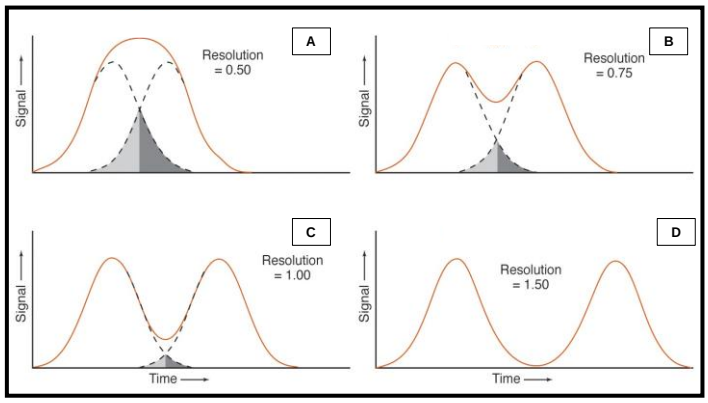


Figure 27. Evolution de la séparation de deux pics chromatographiques en fonction de la résolution R_S

Ainsi, pour deux composés conduisant à des pics de surface voisine, la séparation est pratiquement complète quand $R_s = 1$ (Figure 27, C). Pour des valeurs de $R_S < 1$, les pics se chevauchent (Figure 27, B) et pour des valeurs de $R_S < 0{,}8$, la séparation est généralement insuffisante (Figure 27, A et B). La résolution R_S peut également être exprimée par la relation :

$$R_S = \frac{1}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k_2^{'}}{1 + k_2^{'}}\right)(N_2)^{1/2} \tag{15}$$

où l'indice 2 se rapporte au composé le plus retenu.

Cette expression établit la relation fondamentale liant la résolution aux trois paramètres chromatographiques principaux :

- le premier terme en α exprime l'influence de la **sélectivité** ;

- le second terme en *k'* exprime l'influence du **facteur de capacité** ;
- le dernier terme N_2 exprime l'influence de l'**efficacité de la colonne**.

La séparation chromatographique pourra donc être améliorée en jouant sur l'un de ces trois facteurs.

La largeur des pics chromatographiques apparaît comme un paramètre critique dans la séparation d'un mélange de composés. L'élargissement des bandes et la perte d'efficacité résultent de la vitesse finie de plusieurs processus de transfert de masse pendant la progression du soluté. La minimisation de ces processus permet d'augmenter l'efficacité de la colonne et d'obtenir une meilleure séparation. L'importance des effets cinétiques sur l'efficacité de la colonne dépend essentiellement de la durée de contact entre la phase mobile et la phase stationnaire qui dépend, elle-même, de la vitesse d'écoulement de la phase mobile *u*. La théorie cinétique de l'élargissement des bandes chromatographiques[197] établit par Van Deemter en 1956 permet de prévoir avec précision la variation de *H* en fonction de *u*.

II.3 Cahiers des charges pour un couplage LC-ESI/MS

La mise au point d'une méthode d'analyse par LC-ESI/MS nécessite de prendre en compte un nombre conséquent de paramètres liés, pour la plupart, les uns aux autres, complexifiant d'autant le développement.

- les dimensions de la colonne,
- la phase stationnaire,
- le débit de la phase mobile,
- la composition des phases mobiles,
- la température,
- le gradient d'élution,
- le solvant d'injection.

Le premier paramètre critique à déterminer est le débit de phase mobile qui influe, aussi bien sur la séparation chromatographique[198] que sur l'ionisation en ESI.[18] Il est aussi déterminant dans le choix des dimensions de la colonne. Après le débit, la composition des phases mobiles est le facteur prépondérant, que ce soit pour l'efficacité de l'ionisation[199] ou pour la qualité de la séparation qui implique aussi de tenir compte de la composition et du volume du solvant d'injection.

En chromatographie de phase inverse, l'éluent est composé d'une phase aqueuse (H_2O) et d'une phase organique, généralement le méthanol ou l'acétonitrile. Dans le cadre d'analyses comportant de nombreux composés aux propriétés physico-chimiques différentes, la séparation chromatographique est classiquement réalisée au moyen d'un gradient d'élution,

c'est-à-dire en augmentant le pourcentage de solvant organique de manière linéaire ou non au cours de l'analyse.[200] Ce procédé permet de conduire la séparation de plusieurs centaines de pesticides en moins de 45 min.[33,35,153] L'analyte sera donc élué de la colonne chromatographique avec plus ou moins de phase organique conduisant à une plus ou moins bonne efficacité d'ionisation. En effet, l'eau, de par sa tension de surface élevée, sa faible volatilité et sa capacité de solvatation importante des ions, conduit à une faible sensibilité des analytes dissous comparée aux solvants organiques caractérisés par de faibles tensions de surface, des volatilités élevées et des capacités de solvatation moindres.[201] Parmi les solvants organiques, le méthanol semble être légèrement mieux adapté que l'acétonitrile. En premier lieu, la force éluotropique du méthanol étant moindre que celle de l'ACN, les composés sont élués avec un pourcentage de phase organique supérieur, améliorant ainsi l'ionisation.[146] De plus, ce solvant est connu pour produire des pics chromatographiques de plus belles allures pour les composés basiques[202] et conduit généralement à une ionisation ESI plus efficace que l'ACN,[203] quelque soit le mode d'ionisation.[204]

Pour améliorer la résolution et la réproductibilité de la séparation chromatographique, les phases mobiles sont généralement enrichies avec des additifs dont les plus courants sont l'acide acétique, l'acide formique, l'hydroxide d'ammonium, l'acétate d'ammonium et le formate d'ammonium. L'ajout de ces tampons à des concentrations élevées peut conduire à une suppression partielle de l'ionisation mais, dans des proportions raisonnables, ils peuvent améliorer l'ionisation ESI en facilitant, notamment, l'ionisation des composés neutres par la formation d'adduits ammonium en mode positif ($[M+NH_4]^+$) et acétate en négatif ($[M+CH_3COO]^-$.[199]

Le solvant d'injection est également un élément à prendre en compte lors du développement. S'il est reconnu que la composition du solvant d'injection doit correspondre à celle des phases mobiles au début du gradient d'élution, la préparation de l'échantillon ne le permet pas toujours. Dès lors, il est important de considérer les différences de viscosités et de forces éluantes des solvants mis en jeu,[205-209] et d'adapter en conséquence la température d'analyse[210,211] et le volume d'injection[207,208] de l'échantillon.

B) La Spectrométrie de Masse

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse occupe une place privilégiée grâce à ses qualités d'identification, sa spécificité, sa sensibilité et ses limites de détection inégalées.[212] La variété des applications de la spectrométrie de masse témoigne de la polyvalence de cette technique d'analyse. Elle est, en effet, aussi bien utilisée en physique atomique, pour la cinétique des réactions, en géochronologie, dans toutes les formes d'analyse chimique quantitative et qualitative (en particulier en biomédecine, en contrôle de l'environnement ou pour les réactions ion-molécule) ainsi que pour la détermination des paramètres thermodynamiques (ΔG^0, K_a,…).[212]

I. Quelques rappels fondamentaux sur la spectrométrie de masse

La **spectrométrie de masse** est l'étude de la matière à travers la formation d'ions gazeux caractérisés par le rapport de leur masse sur leur nombre de charge, noté *m/z*.[213]

I.1 Le spectromètre de masse

Fondamentalement, un spectromètre de masse se décline selon le Schéma 6 :

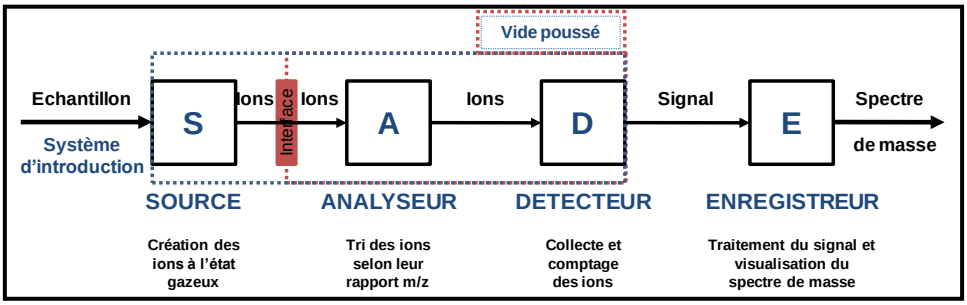


Schéma 6. Description d'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse fonctionne sous un vide poussé de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} Torr de façon à limiter le risque de collisions avec des particules de gaz résiduelles qui entraîneraient des déviations dans la trajectoire de l'ion. Cependant, en fonction de l'appareil, la source d'ionisation peut être sous vide (EI, CI, MALDI) ou à pression atmosphérique (ESI, APCI, APPI) ; ces dernières possèdent alors une interface permettant le passage de la pression atmosphérique de la source à un vide poussé au niveau de l'analyseur. Après avoir introduit la substance à analyser au moyen d'un système d'introduction de type direct, tel une canne pour les solides ou couplé avec une technique chromatographique, la source va permettre d'ioniser

la molécule mais également de transférer la substance de son état solide, liquide ou gazeux, à l'état gazeux. L'analyseur va ensuite séparer les divers ions produits en fonction de la valeur de leur *m/z*, ceux-ci arrivent ensuite au détecteur pour la collecte et le comptage. L'enregistreur, classiquement un ordinateur, traite ensuite le signal et permet sa visualisation au travers d'un spectre de masse dont l'axe des abscisses est défini par le rapport *m/z*. Le symbole *m/z* est un nombre sans dimension, formé en divisant la masse *m* d'un ion exprimée en unité de masse atomique *u* ou dalton (*Da)*, par son nombre de charges *z*. Bien que non recommandés par l'IUPAC, les termes rapport masse-sur-charge et thomson (Th) sont communément employés dans les publications et différents ouvrages pour exprimer l'unité *m/z*.[213]

I.2 Les principales caractéristiques d'un analyseur

Les cinq principales caractéristiques d'un analyseur sont sa limite en *m/z*, sa vitesse de balayage, sa transmission, son exactitude en masse et sa résolution.

- La **limite en *m/z*** : elle détermine les valeurs limites (minimum et maximum) des rapports *m/z* mesurables.
- La **vitesse de balayage** : elle correspond au temps mis par le spectromètre pour analyser l'ensemble de la gamme de masse. Elle est généralement exprimée en $u.s^{-1}$ ou $u.ms^{-1}$.
- La **transmission** : elle correspond au rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et celui entrant dans l'analyseur.
- La **précision sur la masse** : elle détermine la précision ou plus correctement la justesse des rapports *m/z* mesurés, c'est-à-dire la concordance entre la masse mesurée et la masse théorique de la molécule. Elle s'exprime en partie par million (ppm) :

$$P = \frac{m_{th} - m_{mes}}{m_{th}} \times 10^6 \qquad (16)$$

Par exemple, un instrument dont la mesure de masse donne m_{mes} = 400,0020 *u* pour une molécule possédant une masse moléculaire m_{th} = 400,0000 *u*, soit une erreur de 0,002 *u* admet une précision de 5 ppm. La précision de l'analyseur dépend fortement de la stabilité et de la résolution de l'analyseur.

- **La résolution :** elle peut être calculée à partir d'un spectre de masse en considérant un pic isolé. Elle se détermine en effectuant le rapport de la masse *m* sur la largeur à mi-hauteur du maximum δm (FWHM : Full Width Half-height Maximum),

$$R = \frac{m}{\delta m} \tag{17}$$

soit pour le pic de la Figure 28 :

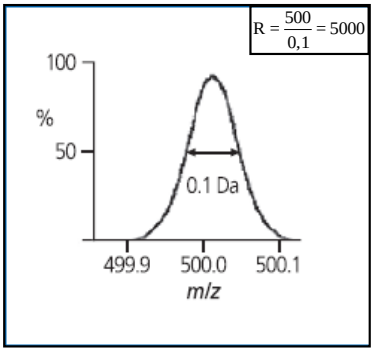


Figure 28. Calcul de la résolution avec la méthode FWHM

La précision sur la masse et la résolution sont les deux premiers paramètres à considérer pour savoir si l'instrument sera adapté à l'objectif de l'analyse.[214] Si la haute résolution est importante car elle permet de distinguer de nombreuses informations supplémentaires telles que les pics monoisotopiques ou la séparation entre les substances d'intérêts et les interférents de la matrice, son augmentation est généralement synonyme d'une diminution de la sensibilité et d'un prix élevé de l'instrument.[214] De plus, l'augmentation de la résolution ne devient un argument convaincant que pour des molécules de tailles significatives.[214]

Pour ces raisons, l'emploi d'appareils haute résolution (HR) reste rare dans le milieu de l'analyse environnementale.[10] Seuls le TOF et son hybride Q-TOF (association d'un quadripôle et d'un TOF) sont de plus en plus employés dans le milieu environnemental,[5,215] notamment pour la confirmation des échantillons.[21,216] En règle générale, les instruments basse résolution (R < 5000) de types triple quadripôle et trappe d'ions sont préférentiellement utilisés.[5,10,20]

II. Les analyseurs à champ quadripolaire

II.1 Le filtre de masse quadripolaire (QMF) ou quadripôle (Q)

Les quadripôles sont constitués de quatre barres parfaitement parallèles ayant une section circulaire ou idéalement hyperbolique tels que l'illustre le Schéma 7.

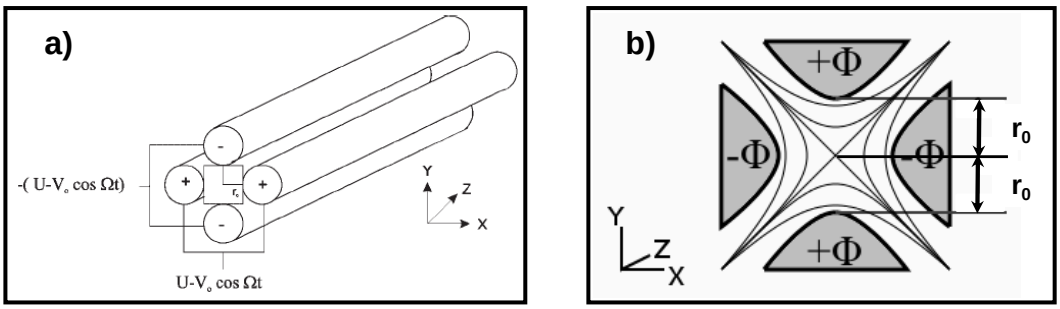


Schéma 7. Illustration a) globale et b) d'une coupe transversale d'un quadripôle

Les ions cheminant suivant l'axe *z* sont soumis à l'influence d'un champ électrique total, constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant résultant de l'application sur les barres respectivement des potentiels :[212]

$$\phi_0 = +(U - V\cos\Omega t) \qquad -\phi_0 = -(U - V\cos\Omega t) \tag{18}$$

Dans cette équation, ϕ_0 représente la tension appliquée aux barres, Ω la pulsation radiofréquence en rad.s^{-1} ($\Omega = 2\pi f$ où f est la fréquence du champ radiofréquence *RF*), *U* la tension continue et *V* est l'amplitude « zéro à pic » du voltage *RF*. Les valeurs de ϕ_0 peuvent différer d'une production scientifique à une autre, elles dépendent de l'instant du cycle *RF* considéré comme le montre le graphique de la Figure 29.

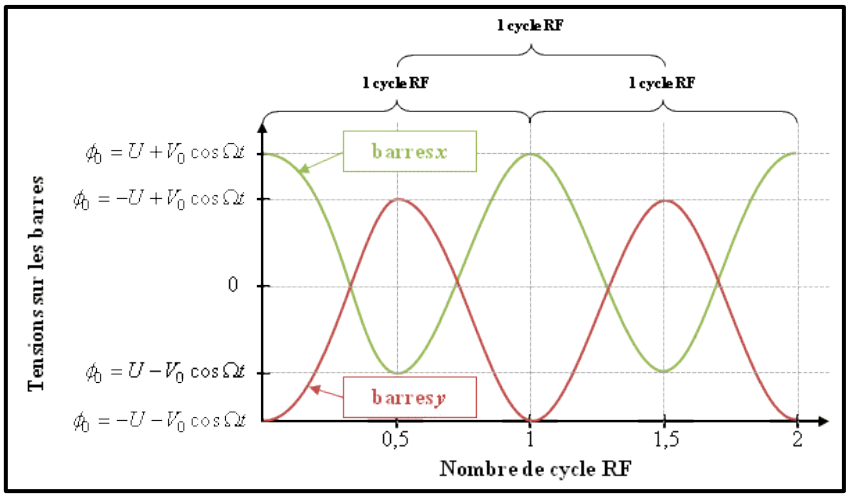


Figure 29. Valeurs des tensions appliquées aux barres en fonction de l'instant du cycle RF considéré

La théorie présentée ici est basée sur le comportement d'un seul ion dans un champ quadripolaire idéal, infini, en l'absence total de gaz.

II.1.1. Expression du potentiel électrique

Dans un tel système, le potentiel $\phi_{x,y,z}$ en tout point de l'espace peut être exprimé en coordonnées cartésiennes par sa forme la plus générale :[217]

$$\phi_{x,y,z} = A\ \lambda x^2 + \sigma x^2 + \gamma z^2\ + C \tag{19}$$

où A est un terme indépendant de x, y, z qui inclut le potentiel électrique appliqué entre les barres de polarités opposées, C est un potentiel fixe appliqué à l'ensemble des électrodes, λ, σ et γ sont respectivement les constantes pondérées pour les coordonnées x, y et z. Cette équation met en évidence, d'une part, l'augmentation quadratique du potentiel avec x, y et z, mais également l'absence de termes croisés de type xy, xz.... Il est, dès lors, possible de considérer les composantes du champ électrique comme étant indépendantes les unes des autres.[217]

Dans tout champ électrique, il est essentiel de satisfaire l'équation de Laplace :

$$\nabla^2\phi = 0 \tag{20}$$

avec l'opérateur laplacien :

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x} + \frac{\partial^2}{\partial y} + \frac{\partial^2}{\partial z} \tag{21}$$

En substituant l'équation du potentiel électrique (19) dans l'équation de Laplace, l'expression suivante est obtenue :

$$\nabla^2\phi = \frac{\partial^2\phi}{\partial x} + \frac{\partial^2\phi}{\partial y} + \frac{\partial^2\phi}{\partial z} = 0 \tag{22}$$

Les dérivées partielles du second ordre conduisent à

$$\frac{\partial^2\phi}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x}\left(\frac{\partial\phi}{\partial x}\right) = \frac{\partial}{\partial x}\left(\frac{\partial}{\partial x}(A\lambda x^2)\right) = \frac{\partial}{\partial x}(2A\lambda x) = 2\lambda A \tag{23}$$

$$\frac{\partial^2\phi}{\partial y} = \frac{\partial}{\partial y}\left(\frac{\partial\phi}{\partial y}\right) = \frac{\partial}{\partial y}\left(\frac{\partial}{\partial y}(A\sigma y^2)\right) = \frac{\partial}{\partial x}(2A\sigma y) = 2\sigma A \tag{24}$$

$$\frac{\partial^2\phi}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial z}\left(\frac{\partial\phi}{\partial z}\right) = \frac{\partial}{\partial z}\left(\frac{\partial}{\partial z}(A\gamma z^2)\right) = \frac{\partial}{\partial z}(2A\gamma z) = 2\gamma A \tag{25}$$

Ce qui donne pour l'expression (22) :

$$\nabla^2\phi = A(2\lambda + 2\sigma + 2\gamma) = 0 \tag{26}$$

A étant forcément différent de zéro, l'équation (26) peut alors s'écrire :

$$\nabla^2\phi = \lambda + \sigma + \gamma = 0 \tag{27}$$

L'équation (27) admet une infinité de combinaisons de λ, σ et γ satisfaisantes. En pratique sont utilisées les plus simples d'entre elles, à savoir pour des quadripôles en deux dimensions tels que les filtres de masse quadripolaires et les trappes d'ions linéaires :

$$\lambda = -\sigma = 1 ; \gamma = 0 \tag{28}$$

L'expression d'un champ électrique (19) dans un quadripôle en deux dimensions devient donc :

$$\phi_{x,y} = A\ (x^2 - y^2) + C \tag{29}$$

Les constantes *A* et *C* sont déterminées en considérant la configuration d'un filtre de masse quadripolaire comprenant deux paires d'électrodes symétriques telles que :[217]

$$x_0 = y_0 = r_0 \tag{30}$$

où r_0 est le rayon du cercle interne, tangent à la surface des électrodes comme le montre le Schéma 7b.

Le potentiel quadripolaire ϕ_0 auquel est soumis un ion est donné par la différence entre les potentiels appliqués aux paires d'électrodes *x* et *y*, soit :[217]

$$\phi_0 = \phi_{x-x} - \phi_{y-y} \tag{31}$$

En considérant maintenant seulement la paire d'électrodes-(*x)* et puisque le potentiel doit être égal sur l'ensemble de la surface de l'électrode, il est alors possible d'écrire que, pour une portion de l'espace où *y* = 0, $x = r_0$ et $x^2 = r_0^2$, l'équation (29) devient :

$$\phi_{x-x} = A(r_0^2) + C \tag{32}$$

et de manière analogue pour la paire d'électrodes-(*y)* :

$$\phi_{y-y} = A(-r_0^2) + C \tag{33}$$

Par conséquent, en substituant les équations (32) et (33) dans l'équation (31) :

$$\phi_0 = \phi_{x-x} - \phi_{y-y} = A(r_0^2) + C - (-A(r_0^2) + C) = 2A(r_0^2) \tag{34}$$

Le paramètre *A* se définit alors comme étant :

$$A = \frac{\phi_0}{2r_0^2} \tag{35}$$

L'expression (29) du potentiel $\phi_{x,y}$ devient :

$$\phi_{x,y} = \frac{\phi_0}{2r_0^2}\ x^2 - y^2\ + C \tag{36}$$

et pour l'origine ($x = 0$, $y = 0$) :

$$\phi_{0,0} = C \tag{37}$$

Si la structure est reliée à la terre, $C = 0$ et l'expression (36) du champ quadripolaire devient dans ces conditions :

$$\phi_{x,y} = \frac{\phi_0}{2r_0^2}\ x^2 - y^2 \tag{38}$$

Après avoir déterminé l'équation du potentiel électrique en tout point d'un filtre de masse quadripolaire, l'influence de ce même potentiel sur le mouvement de l'ion va être étudié.

II.1.2. Equation du mouvement d'un ion

Le mouvement d'un ion dans un champ multipolaire en deux dimensions est déterminé par la loi de Newton :

$$\vec{F} = m\vec{a} = m\frac{d\vec{v}}{dt} \tag{39}$$

où $\vec{v}$ est la vitesse de l'ion et $\vec{F}$ la force électrique s'appliquant sur l'ion de masse m.

Un ion accéléré suivant l'axe z pénètre dans les barres du quadripôle et conserve sa vitesse suivant cet axe, mais il est soumis suivant x et y aux accélérations résultantes des forces dues aux champs électriques :

$$F_x = m\frac{\partial^2 x}{\partial t^2} = -ze\frac{\partial \phi}{\partial x} \Leftrightarrow m\frac{\partial^2 x}{\partial t^2} = -ze\frac{\phi_0 x}{r_0^2} \tag{40}$$

$$F_y = m\frac{\partial^2 y}{\partial t^2} = -ze\frac{\partial \phi}{\partial y} \Leftrightarrow m\frac{\partial^2 y}{\partial t^2} = -ze\frac{\phi_0 y}{r_0^2} \tag{41}$$

où z est le nombre charge de l'ion et e la valeur de la charge d'un électron ($e = 1{,}6.10^{-19}$ C)

En considérant un système réel auquel est appliquée une tension ϕ_0 telle que :

$$\phi_0 = \phi_{x\text{-}x} - \phi_{y\text{-}y} = U - V\cos\Omega t\ -\ -\ U - V\cos\Omega t \tag{42}$$

$$\phi_0 = \phi_{x\text{-}x} - \phi_{y\text{-}y} = 2(U - V\cos\Omega t) \tag{43}$$

Et en incluant l'expression (43) dans les équations (40) et (41), on obtient :

$$m\frac{\partial^2 x}{\partial t^2} = -\frac{2ze}{r_0^2}(U - V\cos\Omega t)x \tag{44}$$

$$m\frac{\partial^2 y}{\partial t^2} = +\frac{2ze}{r_0^2}(U - V\cos\Omega t)y \tag{45}$$

ou

$$\frac{\partial^2 x}{\partial t^2} + \frac{2ze}{mr_0^2}\ U - V\cos\Omega t\ \ x = 0 \tag{46}$$

$$\frac{\partial^2 y}{\partial t^2} - \frac{2ze}{mr_0^2}\ U - V\cos\Omega t\ \ y = 0 \tag{47}$$

Ces deux équations, correspondant aux mouvements d'un ion de masse *m* et de charge *ze* au sein d'un filtre de masse quadripolaire, peuvent être comparées à une équation différentielle du second ordre, appelée équation de Mathieu (48).

$$\frac{\partial^2 u}{\partial \xi^2} + \ a_u - 2q_u\cos 2\xi\ \ u = 0 \tag{48}$$

Dans cette équation, $u = x$ ou y, a_u et q_u sont des paramètres de stabilité sans dimension, $\xi = \Omega t/2$ et où 2ξ est appelé angle de phase.

L'idéal est de pouvoir identifier terme à terme cette équation différentielle. Afin d'exprimer les termes a_u et q_u en fonction des paramètres des équations (46) et (47), un changement de variable est nécessaire. On pose :

$$\frac{\partial}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial \xi}\frac{\partial \xi}{\partial t} = \frac{\Omega}{2}\frac{\partial}{\partial \xi} \tag{49}$$

$$\frac{\partial^2}{\partial t^2} = \frac{\partial}{\partial t}\left\{\frac{\partial}{\partial \xi}\frac{\partial \xi}{\partial t}\right\} = \frac{\Omega^2}{4}\frac{\partial^2}{\partial \xi} \tag{50}$$

Ce changement de variable (50), effectué pour les relations (46) et (47), conduit aux relations suivantes :

$$\frac{\partial^2 x}{\partial \xi^2} + \frac{8ze}{mr_0^2\Omega^2}\ U - V\cos\Omega t\ \ x = 0 \tag{51}$$

$$\frac{\partial^2 y}{\partial \xi^2} - \frac{8ze}{mr_0^2\Omega^2}\ U - V\cos\Omega t\ \ y = 0 \tag{52}$$

L'analogie avec l'équation de Mathieu (48) permet de déterminer les paramètres de stabilité a_u et q_u avec $u = x$ ou y.

$$a_u = a_x = -a_y = \frac{8zeU}{mr_0^2\Omega^2} \tag{53}$$

$$q_u = q_x = -q_y = \frac{4zeV}{mr_0^2\Omega^2} \tag{54}$$

Les paramètres a_u et q_u sont particulièrement intéressants car ils sont caractérisés par la pulsation Ω (rad.s^{-1}) fonction de la fréquence *RF*, du rapport *m/z* de l'ion considéré et de la taille r_0 du système. De plus, a_u et q_u dépendent chacun des tensions continue (*U*) et alternative (*V*).

II.1.3. Mouvement d'un ion dans un filtre de masse quadripolaire

Dans ce type de champ, le mouvement des ions est caractérisé par une équation issue des solutions de l'équation de Mathieu telle que :[217]

$$u(\xi) = \Gamma_u e^{\mu_u \xi} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} C_{2n,u} e^{2in\xi} + \Gamma'_u e^{-\mu_u \xi} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} C_{2n,u} e^{-2in\xi} \tag{55}$$

où Γ et Γ' sont des constantes arbitraires caractéristiques de l'origine des positions et des vitesses, $C_{2n,u}$ est l'amplitude de la trajectoire des ions selon la direction *u*, et μ_u est un nombre complexe de la forme $\mu_u = \alpha_u + i\beta_u$.

Les solutions de cette équation, dont le traitement partiel[218] ou détaillé[219] du problème peut être trouvé respectivement dans les ouvrages de March *et al*. et Campbell, sont classées en stables et instables. Le terme μ_u permet en effet de caractériser la stabilité d'un ion de rapport *m/z* au sein d'un champ quadripolaire :

- Lorsque le terme μ_u est un nombre imaginaire pur, c'est-à-dire $\alpha_u = 0$, soit $\mu_u = i\beta_u$ avec β_u un nombre non-entier, les solutions de l'équation de Mathieu sont définies et périodiques. Les trajectoires des ions sont stables et décrivent des mouvements périodiques finis.
- Au contraire, pour un terme μ_u tel que $\alpha_u \neq 0$ et β_u un nombre entier, l'amplitude de la trajectoire ionique croît indéfiniment suivant la direction de *u* : la trajectoire des ions est dite instable.

Ainsi, la valeur du paramètre β_u caractérise la stabilité d'un ion de rapport *m/z* donné au sein du quadripôle.

En fait, tant que simultanément *x* et *y*, qui mesurent la distance par rapport au centre des barres, restent inférieurs à r_0, l'ion pourra traverser le quadripôle sans toucher les barres. Dans le cas contraire, il se déchargera sur les barres et ne sera pas détecté.[212] Pour un quadripôle donné, r_0 est constant et Ω est maintenue constante, les paramètres *U* et *V* sont donc les seules variables. Dans un diagramme a_u en fonction de q_u, il est possible de représenter les zones de stabilité ou zones de valeurs de *U* et *V* telles que *x* et *y* n'atteignent pas, au cours du temps, des valeurs supérieures à r_0.[212] Ce graphique est le très connu diagramme de stabilité pour un quadripôle linéaire (Figure 30) :

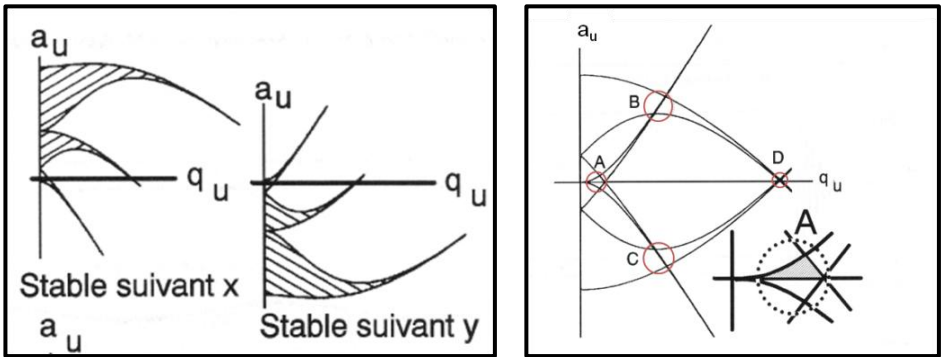


Figure 30. Représentation des diagrammes de stabilité pour un ion de masse m donné suivant x ou y (à gauche) et suivant x et y (à droite). u représente soit x soit y[212]

Les quatre zones A à D encerclées sur le diagramme de stabilité correspondent aux zones de stabilité de l'ion, la zone agrandie A est la plus couramment utilisée dans les spectromètres de masse.

La fréquence de résonnance fondamentale de l'ion peut être exprimée sous la forme :[220]

$$\omega_{u,n} = \left(2n + \beta_u\right)\frac{\Omega}{2} \quad 0 \le \beta_u \le 1 \quad n = 0, \pm 1, \pm 2 \tag{56}$$

où β est une fonction complexe de *a* et *q* qui peut être représenté sur le diagramme (seule la partie positive de la zone A du diagramme est considérée).

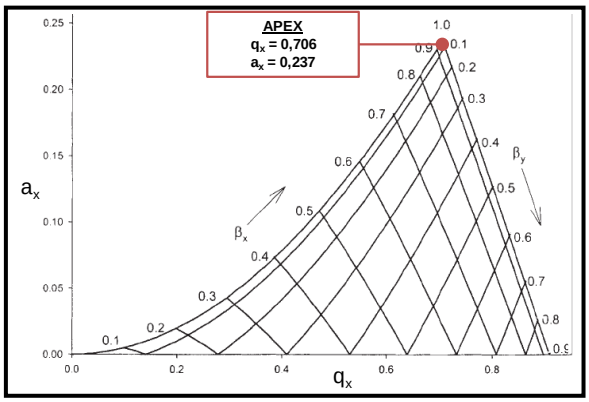


Figure 31. Diagramme de stabilité avec la représentation du paramètre β_u

Dans les conditions où $a = 0$ et pour de faibles valeurs de q ($q \leq 0,4$), une approximation de β peut être obtenue selon la relation :

$$\beta_u \approx \frac{q_u}{\sqrt{2}} \tag{57}$$

Pour ces valeurs de q, le mouvement de l'ion à la fréquence ω_0 (ω_n avec $n = 0$) conduit à l'amplitude la plus large et le mouvement est alors presque harmonique, de fréquence :

$$\omega_0 = \frac{\beta\Omega}{2} \approx \frac{q_u\Omega}{2\sqrt{2}} \tag{58}$$

Avec cette approximation, l'ion se comporte comme s'il était confiné dans un potentiel électrique efficace, $V_{eff}(r)$ donné par :

$$V_{eff} \quad r \quad = D_u \left(\frac{r}{r_0} \right)^2 \tag{59}$$

où le puits de pseudo-potentiel D_u est fonction de q et V tel que :

$$D_u = \frac{q_u V}{4} = \frac{zeV^2}{mr_0^2\Omega^2} \tag{60}$$

Le fait que les puits de pseudo-potentiel soient fonction de la tension V confère au quadripôle la propriété de focaliser les ions en leur centre (Figure 32).

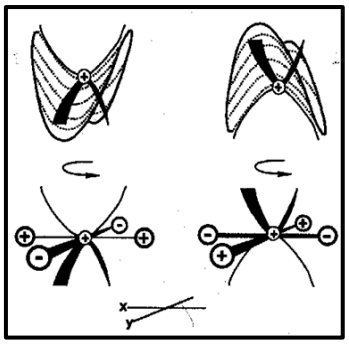


Figure 32. Représentation de la trajectoire d'un ion sein d'un quadripôle[212]

Un ion positif situé au centre des barres d'un quadripôle verra son énergie potentielle augmenter s'il s'approche d'une barre positive. Réciproquement, elle diminuera s'il s'approche d'une barre négative. Mais le champ alternatif revient à « tourner » ce puits et ce sommet de potentiel. Si la fréquence est suffisante, un ion qui commencerait à dévaler la pente vers une barre négative se trouverait pris dans le puits de potentiel positif et donc ramené au centre des barres du quadripôle.[212] Du fait de leurs propriétés, les quadripôles peuvent être utilisés en tant que filtres de masse, guides d'ions ou cellules de collision.

II.1.4. Mode de fonctionnement

II.1.4.1. Filtre de masse

Les définitions de a_u (53) et q_u (54) imposent, pour une pulsation déterminée par une fréquence fixe, une proportionnalité directe entre m et U ou m et V, et donc une évolution de la zone de stabilité A. Par conséquent, en balayant simultanément ces deux tensions tout en maintenant leur rapport constant, les ions de différentes masses ($m_1 < m_2 < m_3$) seront transmis au détecteur à la condition que ce rapport U/V corresponde à un point situé à l'intérieur du diagramme de stabilité (Figure 33).

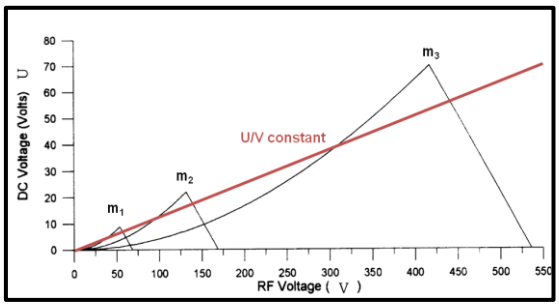


Figure 33. Illustration des zones de stabilité en fonction de U et V pour des ions de différentes masses ($m_1 < m_2 < m_3$)

La largeur des pics observée sur le spectre de masse est proportionnelle à la longueur du segment de la droite de travail traversant le domaine de stabilité. La résolution $m/\delta m$ va donc dépendre de la pente de la droite OA et donc du rapport des tensions. En d'autres termes, plus la droite est proche du sommet du diagramme de stabilité, plus la résolution est élevée mais plus la transmission est faible, d'où une perte de sensibilité. Lorsqu'on effectue un balayage à U/V constant, la résolution est constante sur toute la gamme de m/z explorée. Il est également possible d'avoir une résolution qui croît avec la masse (δm fixe) en réalisant un balayage de type $U = V\text{-}\Delta V$ (où ΔV est une tension fixe qui détermine la valeur de δm) ou d'ajuster le rapport U/V tout au long du balayage par ordinateur pour maintenir un bon équilibre résolution/sensibilité.

En pratique, la résolution sur ces appareils n'est jamais suffisante pour déduire l'analyse élémentaire, de sorte que l'on travaille habituellement à une résolution qualifiée d'unitaire, c'est-à-dire qui permet de séparer les ions qui diffèrent d'une unité de masse.

II.1.4.2. Guide d'ions et cellule de collision

Une autre application intéressante du quadripôle consiste à transmettre efficacement une gamme de masse d'une source à un analyseur, en y ajoutant une refocalisation des ions. En

l'absence de tension continue ($U = 0$), la tension appliquée sur un quadripôle est limitée à sa composante radiofréquence $V\cos\Omega t$. Les trajectoires des ions sont donc limitées par le seul paramètre q_u. D'après la Figure 31, le diagramme de stabilité se limite au segment q_u compris entre 0 et 0,908, ce qui signifie que pour une valeur de V déterminée (Ω et r_0 étant généralement fixe), tous les ions supérieurs à une valeur $(m/z)_{min}$ calculée à partir de l'équation (61) seront transmis par le système.

$$(m/z)_{\min} = \frac{4eV}{0,908 r_0^2 \Omega^2} \tag{61}$$

Cependant, la transmission des ions de hautes masses pâtit de leur faible focalisation. En effet, le puits de potentiel, qui détermine si l'ion qui traverse le quadripôle est efficacement focalisé ou non, est inversement proportionnel à la masse m (60). En conséquence, les ions de hautes masses sont faiblement focalisés et peuvent être perdus sur les barres. La focalisation des hautes masses nécessite l'accroissement de la tension V (car le potentiel augmente proportionnellement à V^2) ce qui conduit, dans un même temps, à fixer une limite de masse plus élevée. D'autres guides d'ions de type multipôles (hexapôle, octopôle…) peuvent être également utilisés. Le potentiel, qui détermine si l'ion qui traverse le multipôle est efficacement focalisé, est donné par l'équation suivante :[212]

$$U_{eff}\ r\ = zeV_{eff}\ r\ = \frac{N^2}{4}\frac{(ze)^2}{m\Omega^2}\frac{V^2}{r_0^2}\left(\frac{r}{r_0}\right)^{2N-2} \tag{62}$$

où $2N$ représente le nombre de pôles (de barres) et r la distance radiale depuis l'axe longitudinal du multipôle. Si pour un quadripôle ($n = 2$), le potentiel est proportionnel à r^2, l'octopôle ($n = 4$) présente un potentiel proportionnel à r^6 ; dès lors, le potentiel du quadripôle augmente rapidement lorsque l'ion s'éloigne de l'axe alors que l'octopôle présente un potentiel caractérisé par une faible valeur autour du centre et une forte augmentation près des bords de l'octopôle.

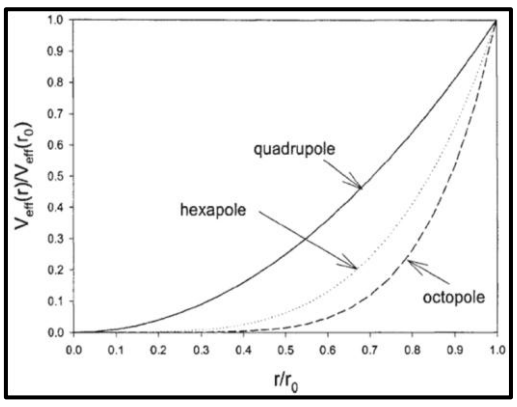


Figure 34. Comparaison des potentiels effectifs pour des champs quadripolaires, hexapolaires et octapolaires[220]

En conséquence, vu la forme de son puits de potentiel, le guide d'ions quadripolaire est supérieur aux autres multipôles pour son pouvoir de focalisation. Mais, du fait de la faible amplitude de son potentiel, il ne s'applique pas à une gamme de masse étendue. Cependant, l'étendue de la gamme de masse des ions ne présente pas de problème quand le guide d'ions est combiné avec un analyseur à balayage (ex : autre quadripôle). En effet, dans ce cas, l'efficacité de la transmission dans l'ensemble de la gamme de masse peut être optimisée en faisant varier la tension *V* durant le balayage de l'analyseur lors de l'acquisition du spectre.

Si les ions sont délibérément injectés dans le quadripôle avec une énergie suffisante pour se fragmenter lors de collisions avec un gaz, alors ces systèmes sont appelés « cellules de collisions ».[220] Le fonctionnement de ces cellules sera détaillé ultérieurement lors du traitement de la spectrométrie de masse en tandem (*Cf. III.*).

Un quadripôle de type linéaire peut être aisément converti en une trappe d'ions linéaire 2D par la simple application de tensions d'arrêt en entrée et sortie du système.[220]

II.2 La trappe d'ions linéaire 2D

Dans un filtre de masse quadripolaire, la sélection en masse des ions est réalisée en appliquant une combinaison appropriée de tensions *U* et *V* de telle manière que les ions appartenant à une fenêtre étroite de rapport *m/z* sont stables sur toute la longueur du quadripôle. Ce critère de sélection représente également l'un des inconvénients majeurs de ce type d'appareil car il conduit à la perte de la majorité des ions générés dans la source.[221] Les pièges ioniques, au contraire, permettent de stocker les ions à l'intérieur de l'enceinte afin de pouvoir les manipuler avant de les éjecter.

Parmi les analyseurs quadripolaires de type trappe d'ions se distinguent, les pièges ioniques en trois dimensions (ITD) basés sur le travail breveté de Paul and Steinwedel en 1953[222] et ceux en deux dimensions appelés trappe d'ions linéaire (LIT) dont le développement est plus récent.[223]

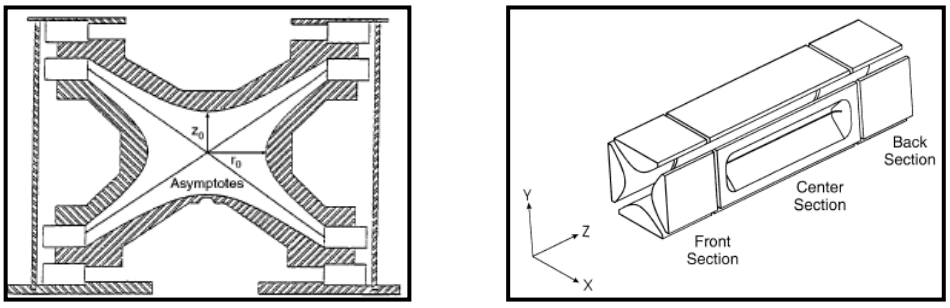


Figure 35. Représentation schématique d'une trappe d'ions 3D[217] (à gauche) et 2D[223] (à droite)

Les trappes d'ions linéaires présentent une efficacité de piégeage supérieure, de même qu'une capacité à stocker un plus grand nombre d'ions (due à leur volume plus important). De plus, la faculté à concentrer les ions sur un axe central (axe *z*) au lieu d'un point dans les trappes 3D (centre du volume) limite l'effet de charge d'espace.[221]

II.2.1. Principe du piégeage d'ions dans une trappe 2D

Les ions piégés dans une trappe d'ions 2D peuvent être extraits sélectivement en masse de manière radiale à travers une ouverture créée au sein d'une électrode,[223] ou axiale à l'image d'un quadripôle.[224] Cette dernière catégorie présente l'avantage de pouvoir être facilement intégrée dans un système de type triple quadripôle, ce qui permet de combiner les forces des deux plateformes, notamment dans l'analyse des petites molécules.[225]

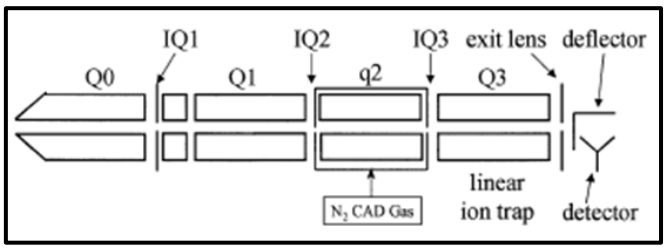


Schéma 8. Illustration du principe de l'introduction d'une LIT dans un système QTrap basé sur une configuration de type TQ[224]

Les paragraphes suivants s'attacheront donc à expliquer le fonctionnement particulier de ce piège ionique et, notamment, son principe d'éjection axiale breveté par la société AB Sciex.

Le comportement des ions en réponse à l'application d'une combinaison de tensions *RF* et *DC* a été décrit, précédemment, dans le cadre d'un quadripôle (*cf. II.1.2 et II.1.3*) conduisant aux équations des paramètres de stabilités a_u et q_u rappelées ci-dessous :

$$a_u = a_x = -a_y = \frac{8zeU}{mr_0^2\Omega^2} \tag{63}$$

$$q_u = q_x = -q_y = \frac{4zeV}{mr_0^2\Omega^2} \tag{64}$$

Dans une trappe d'ions linéaire à éjection axiale (Schéma 9), les ions sont piégés radialement par un voltage *RF* radial (V_{RF}) appliqué sur les électrodes ($U = 0 \Rightarrow a = 0$) et axialement par une tension continue (V_{DC}) appliquée sur des lentilles situées aux extrémités du quadripôle. Une troisième tension qualifiée d'auxiliaire (V_{AC}) peut être appliquée de manière dipolaire sur une paire opposée d'électrodes, ou quadripolaire sur l'ensemble des

quatre électrodes. Cette dernière tension, appliquée à une fréquence correspondant à la fréquence séculaire de l'ion, permet de faire entrer celui-ci en résonnance de manière à l'éjecter ou le fragmenter.

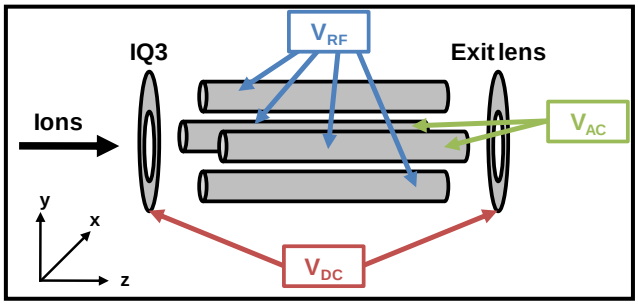


Schéma 9. ***Description schématique d'une LIT décrivant les différentes tensions appliquées.***

Pour ce type de dispositif, les équations de Mathieu ne sont valables qu'au centre du quadripôle, lieu où le champ quadripolaire est pur. En effet, une chute brutale du champ quadripolaire est observée aux extrémités du quadripôle, principalement due à la présence d'éléments optiques à proximité. Ces champs de bordures ou Fringing-Field (FF) déforment le champ quadripolaire idéal et engendrent des couplages entre les composantes radiale et axiale du mouvement de l'ion, normalement indépendantes.[221] Ces changements impactent la fréquence séculaire de l'ion pouvant conduire à une éjection ou une fragmentation. L'éjection axiale sélective en masse (MSAE) tire avantage de ces effets de champs pour convertir l'excitation radiale de l'ion en éjection axiale.[224] *Via* un processus d'excitation résonnante, les ions piégés gagnent en degré d'excitation radiale qui se transforme, aux abords de la sortie de la LIT, en énergie cinétique axiale qui permet de surpasser la barrière de potentiel imposée par la tension de la lentille de sortie.[224]

II.2.2. L'éjection axiale

Dans un piège ionique linéaire à éjection axiale, la trajectoire des ions va dépendre essentiellement de trois champs électriques provenant de l'application d'une tension *RF* d'amplitude V_{RF} sur les électrodes du quadripôle, d'une tension continue V_{DC} au niveau des lentilles et, au besoin, d'une tension auxiliaire dipolaire *RF* d'amplitude V_{AC} sur deux électrodes opposées, comme le montre l'équation (65).[224]

$$\frac{d^2\vec{r}}{dt^2} = \frac{e}{m}[V_{RF}\,\vec{E}_{quad} + V_{DC}\,\vec{E}_{lens} + V_{AC}\,\vec{E}_{dipolaire}] \qquad (65)$$

Dans cette expression, est le vecteur position d'un ion positif monochargé de masse *m* et de charge électrique *e*. Le terme $V_{RF}\,\vec{E}_{quad}$ peut être remplacé par une approximation analytique du potentiel du quadripôle dans la zone bordure : $\vec{E}_{quad} = -\nabla\phi_{FF}$.

En première approximation, la diminution du champ quadripolaire en deux dimensions $\phi_{x,y}$ dans la région proche de la lentille de sortie peut être décrite par une fonction *f(z)* de manière à écrire le potentiel du champ de bordure tel que :

$$\phi_{FF} = \phi_{x,y}\, f(z) \tag{66}$$

Ainsi, la composante axiale du champ électrique due à la diminution du champ quadripolaire se définit comme étant :

$$E_{z,quad} = -\phi_{x,y}\,\frac{\partial f(z)}{\partial z} \tag{67}$$

avec

$$\phi_{x,y} = \frac{(x^2 - y^2)}{2r_0^2}\phi_0 \tag{68}$$

En l'absence de tension continue *U* ($\phi_0 = -2V\cos\Omega t$) et en considérant l'approximation de Dehmelt[226] qui consiste à décomposer le mouvement d'un ion selon un axe *x* en un macromouvement de variation lente mais de grande amplitude séculaire *X* et un micromouvement de variation très rapide mais de faible amplitude δx tel que :

$$x = X + \delta x \tag{69}$$

avec $\delta x \ll X$ et $\frac{d^2\delta x}{dt^2} \gg \frac{d^2X}{dt^2}$ (l'accélération du micromouvement est supérieure à celle du macromouvement fondamental), l'équation de Mathieu peut s'écrire :

$$\frac{d^2x}{d\xi} = \frac{d^2X}{d\xi^2} + \frac{d^2\delta x}{d\xi^2} = -(a_x - 2q_x\cos 2\xi)x \tag{70}$$

Or, comme $\frac{d^2x}{d\xi} = \frac{d^2\delta x}{d\xi^2}$ et $x \approx X$, l'équation (70) devient :

$$\frac{d^2\delta x}{d\xi^2} = -(a_x - 2q_x\cos 2\xi)X \tag{71}$$

En l'absence de composante *DC*, $U = 0$ et donc $a_x = 0$. En supposant que *X* est constant sur la gamme de δx, l'équation (71) peut être intégrée deux fois pour donner δx en fonction de *X*.

$$\frac{d^2\delta x}{d\xi^2} = 2q_x X \cos 2\xi$$

$$\Leftrightarrow \frac{d\delta x}{d\xi} = \frac{2}{2} q_x X \sin 2\xi$$

$$\Leftrightarrow \delta x = -\frac{1}{2} q_x X \cos 2\xi \tag{72}$$

avec $x = X + \delta x$ et $\xi = \frac{\Omega t}{2}$, la coordonnée selon *x* peut être écrite :

$$x = X - \frac{1}{2} q_x X \cos \Omega t \tag{73}$$

et selon y :

$$y = Y - \frac{1}{2} q_y Y \cos \Omega t \tag{74}$$

L'expression du champ quadripolaire bidimensionnel peut alors s'écrire en substituant les expressions (73) et (74) aux paramètres x^2 et y^2 de l'équation (68) telle que :

$$\phi_{x,y} = \frac{1}{r_0^2}(-V \cos \Omega t)\left[\left(X - \frac{1}{2} q_x X \cos \Omega t\right)^2 - \left(Y - \frac{1}{2} q_y Y \cos \Omega t\right)^2\right] \tag{75}$$

La composante axiale du champ électrique due à la diminution du champ quadripolaire s'exprime alors telle que :

$$E_{z,quad} = \frac{V}{r_0^2} \cos \Omega t \left[X^2 \left(1 - \frac{1}{2} q_x X \cos \Omega t\right)^2 - Y^2 \left(1 - \frac{1}{2} q_y Y \cos \Omega t\right)^2\right] \frac{\partial f(z)}{\partial z} \tag{76}$$

Il est alors possible de déterminer la valeur du champ quadripolaire selon l'axe *z* moyennée sur un cycle *RF* complet :

$$\left\langle E_{z,quad} \right\rangle_{RF} = \frac{1}{T_{RF}} \int_{t=0}^{T_{RF}} E_{z,quad} \partial t$$

$$\Leftrightarrow \left\langle E_{z,quad} \right\rangle_{RF} = \left| \frac{\partial f \quad z}{\partial z} \right| \frac{m\Omega^2}{8e} q^2 \quad X^2 + Y^2 \tag{77}$$

Comme le montre la Figure 36, le micromouvement de l'ion est donc en phase avec le potentiel appliqué aux électrodes-(*x)*. Le maximum, qu'il soit positif ou négatif, survient toujours au cours de la partie positive du cycle *RF*, ainsi la moyenne de $\left\langle E_{z,quad} \right\rangle$ sur un cycle *RF* $\left\langle E_{z,quad} \right\rangle_{RF}$ est toujours positive.

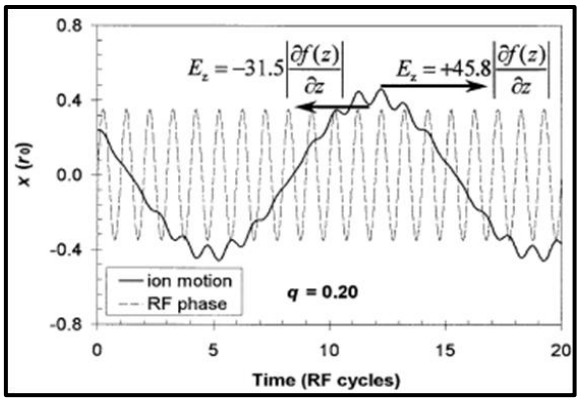


Figure 36. Diagramme de l'amplitude du mouvement de l'ion selon x en fonction des cylces RF et montrant la synchronisation entre le potentiel appliqué aux électrodes et le micromouvement de l'ion[224]

Ce champ électrique axial augmente radialement avec le carré de la distance par rapport au centre des électrodes (77) et axialement quand l'ion s'approche de la sortie. Par conséquent, plus l'ion sera éloigné du centre ou proche des électrodes et plus il sera près de la lentille, plus le champ électrique sur la composante axiale sera important. Pour contrebalancer ce champ électrique positif, l'application d'une tension V_{DC} (2-4V) sur la lentille de sortie permet de créer un champ électrique négatif de proportion adaptée, dont la force décroît avec l'augmentation du déplacement séculaire permettant ainsi d'obtenir une discrimination dans l'éjection des masses.

Le champ électrique axial admet donc une composante positive $\left\langle E_{z,quad} \right\rangle_{RF}$ et une composante négative $\left\langle E_{z,lens} \right\rangle_{RF}$ qui, pour toutes valeurs de X (Y = 0), conduisent à une position sur l'axe z pour laquelle le champ est nul : $\left\langle E_z \right\rangle_{RF} = 0$. L'emplacement de ces surfaces porte le nom de « cône de réflexion ».

II.2.3. Le cône de réflexion

Ce point désigne une surface pour laquelle la force axiale nette agissant sur un ion est nulle sur la durée d'un cycle *RF*. La Figure 37 montre l'évolution du champ axial total $\left\langle E_z \right\rangle_{RF}$ somme de $\left\langle E_{z,quad} \right\rangle_{RF}$ et $\left\langle E_{z,lens} \right\rangle_{RF}$ en fonction de la position radiale X et axiale z.

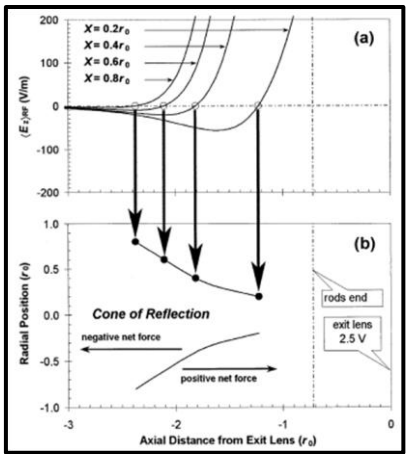


Figure 37. Cartographie des cônes de réflexion en fonction de la position radiale X et axiale z[224]

Dans la Figure 38, le cadre (a) permet de visualiser la superposition des champs $\langle E_{z,quad} \rangle_{RF}$ et $\langle E_{z,lens} \rangle_{RF}$. Lorsque les ions sont relativement éloignés de la fin du quadripôle, la contribution de $\langle E_{z,lens} \rangle_{RF}$ est plus importante que celle de $\langle E_{z,quad} \rangle_{RF}$ conduisant à un champ total $\langle E_z \rangle_{RF}$ négatif. Plus il se rapproche de l'extrémité des électrodes, plus $\langle E_{z,quad} \rangle_{RF}$ devient important, phénomène d'autant plus significatif que la position radiale *X* est grande. Le cône de réflexion est atteint lorsque la courbe croise l'axe des abscisses $\langle E_z \rangle_{RF} = 0$, autrement dit quand $\langle E_{z,quad} \rangle_{RF} = \langle E_{z,lens} \rangle_{RF}$. Les effets de champ augmentant avec la distance radiale *X*, les cônes de réflexion sont par conséquent atteints plus tôt à l'intérieur du quadripôle (*z* élevé avec pour origine *z = 0* la position de la lentille) comme le montre clairement le cadre (b). Finalement, les ions positionnés à gauche du cône de réflexion subiront une force axiale nette négative contraire à la direction de la lentille, alors que ceux situés à droite seront sous l'influence d'une force axiale nette positive dirigée vers la lentille. En conséquence, pour une tension de la lentille de sortie judicieusement choisie, les ions qui posséderont une amplitude radiale suffisante seront capables de pénétrer cette surface et d'être éjectés axialement, les autres seront réfléchis.

L'éjection ou l'isolement des ions dans une trappe d'ions linéaire s'effectue de manière similaire aux procédés employés dans une trappe 3D, c'est-à-dire, soit en effectuant un balayage de la tension V_{RF} conduisant les ions de rapport *m/z* croissant à leur limite de stabilité, soit au moyen de l'excitation résonnante en appliquant une fréquence auxiliaire, généralement dipolaire V_{AC}, à la fréquence de résonnance de l'ion donnée par l'équation (58). Employée judicieusement, l'excitation résonnante permet également de réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem dites MS/MS.[223]

III. La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS est l'acquisition et l'étude du spectre des produits ou précurseurs électriquement chargés d'un ou de plusieurs ions de rapport *m/z* sélectionnés, ou d'ions précurseurs d'une perte de masse neutre sélectionnée. Cette technique peut être accomplie par des instruments à faisceaux d'ions comportant plus d'un analyseur (ex : triple quadripôle) ou avec des instruments de type piège d'ions (ex : trappes 2D et 3D).[213] Dans le premier cas, les analyses de masse sont réalisées successivement dans des enceintes distinctes. Dans le second cas, l'ensemble des expériences sont effectuées successivement dans le temps au cœur de la même enceinte. Ces techniques portent respectivement les appellations de MS/MS dans l'espace et MS/MS dans le temps.

L'objectif de la MS/MS a été, dans un premier temps, d'obtenir des informations structurales sur les molécules ionisées par des techniques dites douces. En effet, pour des techniques d'ionisation dures, telles que l'ionisation électronique qui apporte assez d'énergie interne aux molécules pour se fragmenter, une seule analyse en masse permet d'obtenir de nombreuses informations structurales et d'élucider la structure de la molécule. En revanche, les techniques d'ionisation douces telles que l'ESI, le MALDI et autre FAB génèrent essentiellement dans la source des espèces protonées ou déprotonnées avec pas ou peu de fragmentation. Les informations structurales apportées par une analyse en masse unique sont donc très limitées. L'idée a été de trouver un moyen d'exciter hors de la source les ions stables afin d'accroître leur énergie interne et, ainsi, de les faire fragmenter.[227]

Plusieurs méthodes d'activation à faibles et hautes énergies ont été développées pour exciter l'ion précurseur ; elles dépendent du type d'instruments utilisés (Tableau 9).

Méthode	Domaine d'énergie	Instruments	description
PSD (Post-Source Decay)	Faible	RETOF	Dissociation induite par collision ou d'origine métastable dans le tube de vol reflectron de l'instrument à temps de vol.
CID (Collision Induced Dissociation)	Faible	QqQ, ITD, QqTOF, QqLIT, FTICR	Dissociation induite par collision par la collision de l'ion précurseur avec des molécules inertes de gaz cibles. Domaine d'énergie de 1-100eV.
SID (Surface Induced Dissociation)	Haute	TOF en tandem, secteurs	Idem qu'au dessus avec des énergies de l'ordre du keV
	Faible	Hybride (BqQ), QqQ, ITD, FTICR	Collisions entre les ions précurseurs et une surface cible solide avec ou sans monocouche auto-assemblée causant la fragmentation et des réactions secondaires.
	Haute	TOF en tandem, RETOF	Idem qu'au dessus avec des ions precurseurs d'énergies cinétiques plus élevées (dépendant des instruments)
ECD (Electron Capture Dissociation)	Faible	FTICR	Faisceau d'électrons de basse énergie qui conduit à la capture d'électrons sur les sites de protonation avec des fragmentations ultérieures suivant la chimie de l'ion radical.
IRMPD (Infrared MultiPhotons Dissociation)	Faible	ITD, FTICR	Onde continue de faible énergie produite par un laser infrarouge active les ions précurseurs par l'adsorption multiphotonique avec des fragmentations conséquentes.
BIRD (Blackbody Infrared Radiative Dissociation)	Faible	ITD, FTICR	Méthode d'activation thermique de faible énergie idéale pour le calcul des seuils d'énergies et des propriétés thermodynamiques.

Tableau 9. Description générale des procédés d'activation adaptée[227]

La dissociation induite par collision (CID) est le procédé d'activation MS/MS le plus employé à l'heure actuelle.[227] Ceci est dû au fait qu'il est utilisé dans les instruments de type triple quadripôle et trappe d'ions qui sont les appareils les plus courants sur le marché. Par conséquent, après un bref rappel sur les processus de fragmentation, nous nous attacherons à expliquer les particularités de l'activation par CID, les possibilités de scan offertes par ce mode en fonction des instruments, avant de conclure sur l'utilité de la MS/MS dans le domaine de l'analyse de pesticides.

III.1 La fragmentation par CID

A la sortie de la source d'ionisation, les ions sont accélérés par l'application d'une différence de potentiel V_{acc} en direction de l'analyseur, conférant ainsi aux ions de même rapport *m/z* une même énergie cinétique :

$$E_c = \frac{1}{2} m v^2 = z V_{acc} \tag{78}$$

où *m* est la masse de la molécule ionisée, *v* sa vitesse et *z* le nombre de charge.

Le processus de collision complet se déroule en deux étapes successives faisant intervenir, dans un premier temps, l'excitation de l'ion précurseur suivie, dans un second temps, d'une dissociation unimoléculaire de l'ion :

$$m_p^+ + N \rightarrow m_p^{+*} \rightarrow m_f^+ + m_n \tag{79}$$

La première étape consiste à faire entrer en collision la molécule d'analyte avec un gaz cible, ce qui conduit à un transfert de l'énergie cinétique en énergie interne, celle-ci étant la somme de l'énergie électronique (E_e) et vibrationnelle (E_{vib}).

La conservation de la quantité de mouvement et d'énergie, lors de la collision entre un ion et un atome de gaz, implique que seule une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne. Ce taux de conversion est relié à la nature de la collision qui peut être élastique ou inélastique. L'énergie totale disponible pour le transfert d'énergie cinétique en énergie interne est l'énergie relative au centre de masse (E_{com}) et dépend de manière importante des masses des particules impliquées (équation (80)).

$$E_{com} = \left(\frac{m_n}{m_i + m_n} \right) E_{lab} \tag{80}$$

où E_{lab} est la quantité d'énergie cinétique de l'ion dans le référentiel du laboratoire, m_n la masse de la cible neutre et m_i la masse de l'ion précurseur.[228]

Comme indiquée par l'équation (80), E_{com} augmente avec la masse de la cible et diminue avec la masse des molécules d'analyte. Par conséquent, le taux d'énergie convertible en E_{int} sera d'autant plus élevé que le gaz sera lourd et la molécule d'intérêt légère.

La seconde partie du mécanisme correspond à la dissociation unimoléculaire de l'ion excité. La fragmentation de l'ion précurseur aura lieu si et seulement si l'énergie apportée par la collision est suffisamment élevée pour exciter l'ion au-delà de son seuil de dissociation. Ces dissociations unimoléculaires en phase gazeuse sous vide peuvent être expliquées par deux théories : la théorie du quasi-équilibre (Quasy-Equilibrium Theory : QET)[229] ou la théorie Rice, Ramsperger Kassel and Marcus (RRKM).[230-233] Ces théories affirment que l'ion excité répartit son énergie interne de façon totalement aléatoire sur tous les états quantiques disponibles avant que la dissociation n'ait lieu, en favorisant les conversions internes vers l'état électronique et les transitions vibrationnelles fondamentales.[227] Par conséquent, le modèle d'activation en deux étapes suppose que l'étape d'activation soit complétée avant que ne commence la dissociation unimoléculaire de l'ion. C'est donc le taux d'énergie interne et non le mode d'activation qui va définir le processus de dissociation.[228] D'autre part, la fragmentation de l'ion peut être attribuée à l'excès d'énergie vibrationnelle qu'il contient. Une liaison chimique peut, en effet, être comparée à un oscillateur (un ressort) dont l'amplitude des mouvements (son énergie vibrationnelle) conduit à la rupture ou, en d'autres termes, à la fragmentation.

Soit une réaction de décomposition :

$$AB^+ \underset{k(E)}{\rightarrow} A^+ + B \tag{81}$$

où AB^+ est un ion pseudo-moléculaire, A^+ un ion produit, B un fragment neutre et $k(E)$ la constante de vitesse. Par approximation de la théorie du quasi-équilibre, la constante de vitesse $k(E)$ est liée à l'énergie interne selon :

$$k\ E\ = \nu \left(\frac{E_{\text{int}} - E_0}{E_{\text{int}}} \right)^{S-1} \tag{82}$$

où S représente le nombre de degrés de liberté, ν le facteur de fréquence et E_{int} et E_0 sont respectivement l'énergie interne de l'ion et l'énergie d'activation qui correspond à l'énergie minimale nécessaire à la fragmentation (Figure 38).

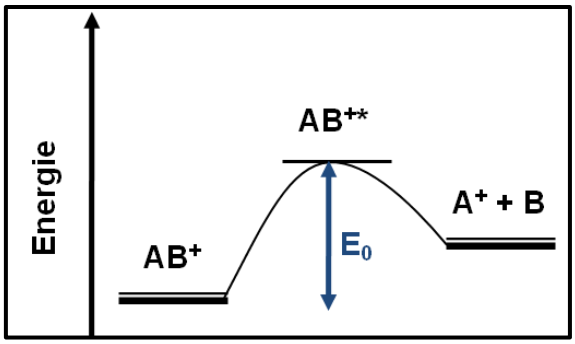


Figure 38. Diagramme d'énergie illustrant l'énergie d'activation E_0 nécessaire au processus de dissociation

D'après l'équation (82), la réaction de fragmentation sera d'autant plus rapide que E_{int} excède E_0 et que ν sera élevé, privilégiant donc un état de transition lâche « loose » plutôt que tendu « tight ». Les spectres de masse obtenus par CID vont être fonction de deux scénarios de fragmentation, à savoir :

$$\begin{aligned} &(1)\quad m_p^+ \xrightarrow{N} m_{f1}^+ \xrightarrow{N} m_{f2}^+ \xrightarrow{N} Etc. \\ &(2)\quad m_p^+ \xrightarrow{N} m_p^{+*} \xrightarrow{N} m_p^{+**} \xrightarrow{N} ions\ produits \end{aligned} \tag{83}$$

La première réaction décrit la CID de l'ion précurseur suivie par une succession de CID des ions produits activés, alors que la seconde illustre l'activation progressive de l'ion précurseur préalablement à la dissociation.

Les processus d'activation par CID pour les ions organiques de masses modérées (quelques centaines de g.mol^{-1}) se classent en deux catégories : les collisions à hautes énergies (*high-energy collision*) de l'ordre du keV qui sont généralement réalisées dans des instruments type secteurs et TOF/TOF et les collisions à faibles énergies (*low-energy collision*) de l'ordre de 1 à 100 eV qui se déroulent dans des spectromètres de masse type triple quadripôle ou trappe d'ions avec, cependant, des différences dans le procédé d'excitation.[227]

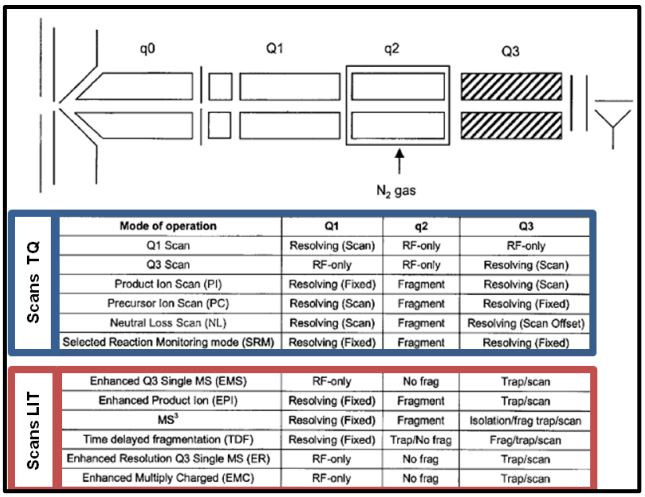
Concernant le QqQ, l'excitation de l'ion précurseur est réalisée au moyen de collisions avec un gaz cible, parallèlement à l'application d'une tension dans une cellule de collision dédiée à cet effet. Pour la trappe d'ions, l'ion précurseur est isolé et accéléré par une excitation résonnante en présence de gaz (généralement de l'hélium). Dans les deux cas, le gaz cible joue un rôle important dans l'efficacité des collisions. Ainsi, un gaz lourd (Ar, Xe), de même qu'une pression élevée permettront d'augmenter le rendement de fragmentation,[234] la pression ayant également une influence directe sur la transmission des ions.[235] En règle générale, les rendements d'ions produits en *low-energy*-CID sont très élevés, principalement

grâce aux collisions multiples autorisées par la pression du gaz et la longueur des cellules de collision dans les QqQs et par les temps alloués au CID dans les trappes d'ions.[227]

La spectrométrie de masse en tandem offre la possibilité d'accéder à une multitude d'informations qualitatives et quantitatives dont la nature va dépendre des instruments et des modes de scans utilisés.[236] Le QqQ et la trappe d'ions, qui sont les deux technologies les plus employées dans le domaine des pesticides, présentent chacune des spécificités intéressantes. Le premier est très clairement l'instrument le plus adapté à la quantification. Il démontre, en effet, de meilleures qualités que la trappe d'ions en termes de précision, linéarité, robustesse[150] ainsi que de meilleurs limites de détection,[237] notamment grâce à son mode SRM qui permet d'enregistrer spécifiquement un processus de fragmentation.[5] En revanche la trappe d'ions permet d'obtenir des spectres full scan plus sensibles et de meilleures qualités qu'un QqQ et offre également la possibilité de faire de la MS^n, c'est-à-dire de répéter l'opération d'isolation et de fragmentation sur le ou les fragments de l'ion précurseur. Les fabricants de spectromètres de masse essayent désormais de combiner les qualités des divers analyseurs avec la mise au point de spectromètres de masse qualifiés d'hybrides de type : LIT/FTICR, Q-TOF ou QqLIT. Ce dernier s'appuie sur les possibilités offertes par l'éjection axiale, mise au point dans les LIT[224] pour intégrer cet analyseur dans un système de type triple quadripôle, ce qui permet à cet instrument de cumuler les avantages des deux dispositifs.[221,225]

III.2 Les modes de scans d'un spectromètre de masse hybride QqLIT

Un spectromètre de masse triple quadripôle comporte deux filtres de masse quadripolaires Q_1 et Q_3 fonctionnant en mode *RF/DC* séparés par une cellule de collision q_2 qui opère uniquement en mode *RF*. Le système QqLIT ou QTrap (Figure 39) est un instrument développé par la société AB Sciex. Il est basé sur la même configuration qu'un triple quadripôle à la différence que le troisième quadripôle Q_3 peut aussi bien opérer comme un quadripôle classique (mode *RF/DC*) qu'en mode LIT. Le quadripôle Q_0 est utilisé en temps que guide d'ions.



Scans TQ	Mode of operation	Q1	q2	Q3
	Q1 Scan	Resolving (Scan)	RF-only	RF-only
	Q3 Scan	RF-only	RF-only	Resolving (Scan)
	Product Ion Scan (PI)	Resolving (Fixed)	Fragment	Resolving (Scan)
	Precursor Ion Scan (PC)	Resolving (Scan)	Fragment	Resolving (Fixed)
	Neutral Loss Scan (NL)	Resolving (Scan)	Fragment	Resolving (Scan Offset)
	Selected Reaction Monitoring mode (SRM)	Resolving (Fixed)	Fragment	Resolving (Fixed)

Scans LIT				
	Enhanced Q3 Single MS (EMS)	RF-only	No frag	Trap/scan
	Enhanced Product Ion (EPI)	Resolving (Fixed)	Fragment	Trap/scan
	MS^3	Resolving (Fixed)	Fragment	Isolation/frag trap/scan
	Time delayed fragmentation (TDF)	Resolving (Fixed)	Trap/No frag	Frag/trap/scan
	Enhanced Resolution Q3 Single MS (ER)	RF-only	No frag	Trap/scan
	Enhanced Multiply Charged (EMC)	RF-only	No frag	Trap/scan

Figure 39. Illustration du principe de foncionnement d'un système QqLIT avec la description de l'ensemble des modes de scans[225]

Ce dispositif, en plus des expériences de masse simple telles que le « full scan » et le « SIM » (Selected Ion Monitoring), offre un nombre conséquent de modes d'acquisition MS/MS parmi lesquels se trouvent les modes classiques des QqQ, le balayage d'ion produit (PI : Product Ion Scan), le balayage d'ion précurseur (PC : Precursor Ion Scan), le balayage d'une perte de neutre (NL : Constant Neutral Loss) et le suivi de réactions sélectionnées (SRM : Selected Reaction Monitoring). L'association de la LIT donne accès à d'autres modes d'acquisition intéressants, notamment l'EPI (Enhanced Product Ion) qui est un balayage d'ion produit plus performant que le Product Ion (PI) d'un QqQ, et la MS^3 qui permet de réaliser une expérience de masse supplémentaire.

Après avoir expliqué le fonctionnement des modes de scan de base « full scan » et « SIM », les modes PI, EPI et SRM, couramment utilisés dans l'analyse de pesticides seront plus particulièrement détaillés.

III.2.1. Mode « full scan » et « Single Ion Monitoring » (SIM)

Ces deux expériences de MS simple sont disponibles sur des analyseurs de type simple quadripôle et peuvent donc ici être effectuées avec les quadripôles Q_1 ou Q_3.

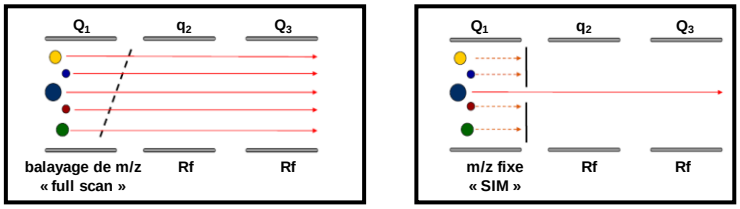


Figure 40. Représentation schématique des modes d'acquisition full scan (à gauche) et SIM (à droite)

Le mode « full scan » permet d'analyser l'ensemble des ions produits dans la source appartenant à une gamme de rapport *m/z* déterminée et consiste à balayer successivement ces rapports *m/z*. Ce mode d'acquisition donne des spectres de masse fournis, représentatifs de l'échantillon analysé. Cependant, lorsque la molécule recherchée est connue, l'utilisation du mode SIM offre une plus grande sélectivité et sensibilité puisqu'il permet de ne suivre qu'un seul rapport *m/z* pendant un laps de temps déterminé en utilisant des tensions adaptées à sa détection.

Dans les deux cas, un seul quadripôle est utilisé en tant qu'analyseur, les deux autres fonctionnent en mode *RF*, servant ainsi de guide d'ions.

III.2.2. Le « Product Ions Scan » (PI) et l'« Enhanced Product Ions Scan » (EPI)

Ces deux modes d'acquisition sont basés sur le même principe et nécessitent la mise en œuvre des trois quadripôles. Le premier quadripôle Q_1 sélectionne les ions de rapport *m/z* unique (mode SIM) qui vont se fragmenter par CID dans la cellule de collision q_2. Ces ions conduisent, après dissociation, à la formation d'ions produits qui vont être détectés par Q_3 opérant en mode quadripôle dans le cas du PI, et en mode LIT dans le cas de l'EPI.

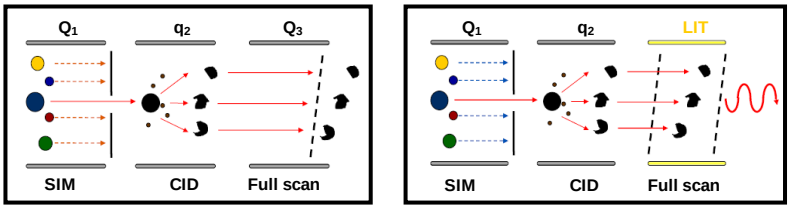


Figure 41. Représentation schématique des modes « Product Ions Scan » (à gauche) et « Enhanced Product Ions Scan » (à droite)

Ce mode d'acquisition permet d'obtenir un spectre de masse caractéristique d'une molécule spécifique et donne accès à de nombreuses informations structurales. Le mode PI se révèle également très utile pour la confirmation de molécule connue avec la possibilité de confronter le spectre de masse obtenu à partir de l'échantillon avec celui de référence. L'utilisation de la LIT pour effectuer le full scan permet de bénéficier d'une sensibilité accrue, de l'ordre de 200 pour la réserpine par exemple.[151]

III.2.3. Le « Selected Reaction Monitoring » (SRM) ou le « Multiple Reaction Monitoring » (MRM)

Le mode d'acquisition SRM est obtenu en faisant fonctionner les quadripôles Q_1 et Q_3 en mode SIM. A noter que pour ce mode, l'abréviation MRM, bien que non recommandée par l'IUPAC, est couramment utilisée.[213]

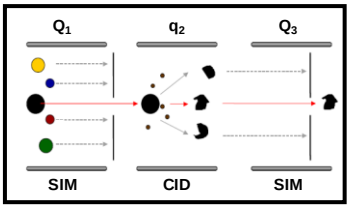


Figure 42. Représentation schématique du mode « Selected Reaction Monitoring »

L'utilisation du mode SRM permet de suivre un ion produit spécifique d'une fragmentation particulière de l'ion précurseur. La relation entre un ion précurseur et un ion produit est communément appelée « transition ». Il est possible de suivre un nombre important de transitions au cours d'une même analyse, cela dépend des performances du spectromètre de masse, notamment de sa vitesse d'acquisition. Dans tous les cas, ce mode offre une très grande spécificité par le suivi d'une ou plusieurs transitions spécifiques d'un analyte et une très grande sensibilité car toutes les conditions de détection sont optimisées pour chaque transition. Le mode SRM est donc le mode d'acquisition de choix pour les méthodes multi-résidus.

III.2.4. Conclusion

En plus de proposer des modes d'acquisition polyvalents et tirant profit des avantages d'un QqQ et d'une LIT, le système hybride QqLIT offre également la possibilité de combiner plusieurs modes de scan au cours d'une même acquisition.[225] Il est, dès lors, possible de réaliser une première expérience appelée scan de surveillance pour laquelle, en fonction de critère(s) préalablement défini(s), une ou plusieurs autres expériences (scans dépendants) peuvent être déclenchées. Il est par exemple faisable d'associer la sensibilité du mode SRM avec le pouvoir de confirmation du mode EPI.[225,238] Il est donc désormais possible de combiner l'analyse quantitative et qualitative avec le même instrument et au sein d'une même analyse. De plus, le QqLIT dispose d'une vitesse d'acquisition élevée, lui conférant une meilleure sensibilité comparé au QqQ et ITD classique, de l'ordre d'un facteur 10 pour un 4000 QTrap.[10] L'ensemble de ces qualités font du QqLIT l'instrument le plus adapté dédié à

l'analyse LC-ESI-MS/MS de résidus de pesticides grâce à ses performances quantitatives supérieures et les nombreuses possibilités de confirmation offertes par ce système hybride.

La spectrométrie de masse en tandem est d'une aide considérable dans l'analyse des résidus de pesticides. En effet, si le couplage LC-MS s'est révélé plus sensible et sélectif que les anciens détecteurs couplés à la LC, il souffre néanmoins d'un inconvénient majeur : les spectres de masse des pesticides obtenus par ionisation dans des sources API sont principalement constitués de l'ion pseudo-moléculaire ou d'un adduit et présente peu de fragmentations.[239] La sélectivité et la sensibilité apportée par la MS/MS permet d'une part, de minimiser la préparation de l'échantillon[239] et d'autre part, de limiter la séparation chromatographique entre les analytes puisqu'il est très rare de trouver des molécules partageant la même unique transition (en mode SRM).[5] Les performances impressionnantes de la MS/MS conduisent souvent à délaisser la chromatographie qui reste pourtant un élément essentiel de la mise au point d'une méthode analytique. Son optimisation assure une sensibilité et une robustesse optimum de la méthode et permet de limiter au maximum les divers problèmes, à l'image des effets matrice. De plus si l'amélioration constante des instruments (HPLC et MS) permet la quantification de composés à des concentrations toujours plus basses, la confirmation de la « positivité » d'une molécule, c'est-à-dire la certitude que la molécule détectée soit bien celle supposée, est un sujet complexe auquel la réglementation essaye de répondre.

III.3 Les effets matrice et la confirmation des positifs

La LC-ESI-MS/MS dispose d'une très grande sélectivité vis-à-vis des composés analysés. En effet, avec des modes d'acquisition tels que le SIM et le SRM, seul le signal d'intérêt est enregistré, laissant de coté les informations provenant d'autres substances. Pour cette raison, certains chercheurs pensent que **les effets matrice** qui correspondent à des augmentations ou des suppressions de signal de l'analyte causés par des composés co-élués, sont réduits ou éliminés avec l'utilisation de ces modes, ce qui est une fausse idée.[240] Les effets matrice sont généralement dus à l'influence des composés co-élués sur le processus d'ionisation de l'analyte, donc bien avant qu'il n'intègre le vide du spectromètre de masse.[240] La Figure 43 montre, par exemple, l'influence de différentes matrices sur le signal du triflumisol. Malgré l'utilisation du mode SRM, les effets matrice entraînent une suppression très nette du signal atteignant presque une extinction totale dans le cas du poivre.[241]

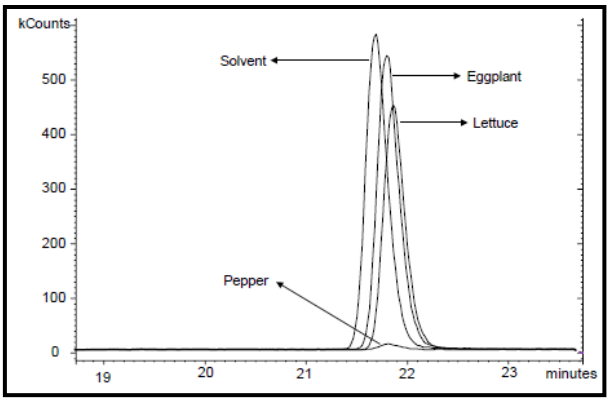


Figure 43. Influence de différentes matrices sur l'intensité du signal du triflumisol acquis en mode SRM[241]

Les conséquences de ces effets sont multiples, affectant différents aspects du résultat analytique. En plus de la diminution du signal et donc d'une augmentation de la limite de détection, la répétabilité est également affectée car le degré de suppression peut varier d'un échantillon à un autre.[242] De même, cette variabilité peut entraîner des modifications dans le ratio des ions, la linéarité et la quantification. Finalement, dans le pire des cas, la suppression d'ions peut mener à une non-détection de l'analyte, une sous-estimation de sa concentration, ou encore à des difficultés de confirmation dues à des problèmes divers dans les critères d'identification (changements de ratio des ions ou modification du spectre de masse).[243]

Bien que le mécanisme de suppression d'ions ne soit pas encore parfaitement connu, trois hypothèses principales ont été développées.[240,243-245] La présence de composés interférents non-volatils issus de la matrice entraineraît une diminution de l'efficacité d'évaporation due à une augmentation de la viscosité et de la tension de surface des gouttelettes, réduisant par conséquent la capacité de l'analyte à entrer en phase gazeuse.[245] De même, la co-précipitation des analytes avec des macromolécules limiterait leur transfert en phase gazeuse. Le second mécanisme concernerait la compétition entre l'analyte et les composés interférents en termes d'affinité protonique vis-à-vis de l'efficacité maximale d'ionisation, connue pour être 10^{-5} $mol.L^{-1}$.[246] Enfin, la dernière hypothèse se base sur la modification de l'efficacité d'ionisation dans le processus de formation de la gouttelette par une altération de la tension de surface due à la formation de fortes paires d'ions avec l'analyte préformé en solution.[244]

Etant donné l'origine du mécanisme, il est évident que les effets matrice vont être analyte-dépendant et fonction des interférents de la matrice dont le temps de rétention coïncidera avec celui de l'analyte. Certaines stratégies ont été développées pour détecter chromatographiquement ces effets matrice[240,243] et des solutions existent pour les éliminer ou, du moins, les prendre en compte.[240,243] La mise en place d'étapes de purification[247,248] ou un travail chromatographique[247,249] plus poussé en termes de séparation peut conduire à une nette

diminution des effets matrice. Sans pour autant les éliminer, la méthode des ajouts dosés, la préparation de gammes matrices,[240,243,244] ou l'injection post-colonne d'une substance de référence[250] permettent de prendre en compte les effets matrice et d'assurer une quantification plus juste, contrairement à la méthode du standard interne qui est difficilement applicable en multi-résidus.[242]

L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem, bien qu'étant un atout considérable dans l'analyse multi-résidus, n'assure donc pas pour autant une certitude absolue du résultat. Devant une inquiétude grandissante concernant la confirmation des données, différents critères, visant à assurer la qualité des résultats et éviter ainsi le report de faux positifs, ont été mis en place par la réglementation. La commission européenne a, par exemple, établi la confirmation des positifs sur la base d'un système de points d'identification qui dépendent des techniques analytiques et autres modes d'acquisition utilisés.[251] Ainsi, en plus d'une adéquation du temps de rétention avec celui du standard, trois ou quatre points d'identification sont nécessaires selon la catégorie des contaminants. Par exemple, la sélection d'un ion précurseur et l'enregistrement de deux ions produits en SRM (2 transitions) apportent quatre points. De plus, des guides relatifs à la validation de méthodes et au contrôle qualité tels que le guide SANCO/31/31/2007, préconisent également un respect des ratios relatif entre les ions produits de l'ordre de 10 à 50 %.[252] Ces tolérances ne dépendent cependant ni de la concentration de l'analyte, ni de la matrice étudiée puisque, même si des effets matrice peuvent avoir lieu en ESI, la sélection en masse de l'ion précurseur par le premier quadripôle est censé éliminer toutes les interférences préalablement à la fragmentation. Par conséquent, la fragmentation de l'ion précurseur en q_2 devrait mener à des ions produits identiques, que l'analyte provienne d'une solution de standard ou d'un échantillon de matrice. Or, comme le démontre le travail de Kauffman *et al.*, ce critère de ratio n'est pas sans équivoque.[253] En effet, pour les molécules présentant plusieurs sites de protonation, les conditions d'ionisation et, notamment la présence de composés interférents, ont une influence directe sur le site où va se fixer le proton pour former l'ion $[M+H]^+$. En fonction de ce site, la formation d'un ion produit plutôt qu'un autre lors de la fragmentation peut alors être privilégiée. De plus, à faible concentration, l'une des transitions peut ne pas être assez sensible pour être détectée. Dans ce cas, la possibilité d'effectuer un scan EPI avec un QqLIT peut être une solution de confirmation envisageable.

Chapitre III

Mise au Point de la Méthode d'Analyse Multi-Résidus LC-ESI-MS/MS

Avant d'aborder la problématique liée à l'analyse de pesticides dans les huiles essentielles, la première étape du développement d'une méthode d'analyse multi-résidus LC-ESI-MS/MS consiste à optimiser l'ensemble des paramètres analytiques dans le solvant d'injection. Ainsi, ce chapitre, composé de quatre parties, traite successivement de l'optimisation des paramètres de détection propres à chaque substance active en spectrométrie de masse, du cahier des charges imposé par le couplage LC-MS/MS, de l'optimisation de la séparation des pesticides en chromatographie liquide et, enfin, des performances analytiques de la méthode ainsi mise au point avec un nouveau mode d'acquisition : le Scheduled SRM.

A) Optimisation des paramètres de détection en spectrométrie de masse

La première étape dans la mise en place d'une méthode d'analyse LC-ESI-MS/MS est l'optimisation des paramètres de détection en masse. L'étude bibliographique a montré que le mode d'acquisition le plus approprié pour la quantification des pesticides dans les huiles essentielles est le mode SRM. Pour que ses performances soient optimales, ce mode nécessite de déterminer un ensemble de paramètres spécifiques à chacune des substances actives analysées. Après une présentation des spécificités du spectromètre de masse 4000 QTrap, l'optimisation des conditions de détection en mode SRM sera détaillée.

I. Le spectromètre de masse 4000 QTrap

Le 4000 QTrap est un spectromètre de masse nouvelle génération. C'est un système hybride de type QqLIT basé sur la configuration d'un triple quadripôle où Q_3 peut être utilisé, selon les cas, en mode *RF/DC* comme un quadripôle classique, ou en mode LIT (voir Figure 44).

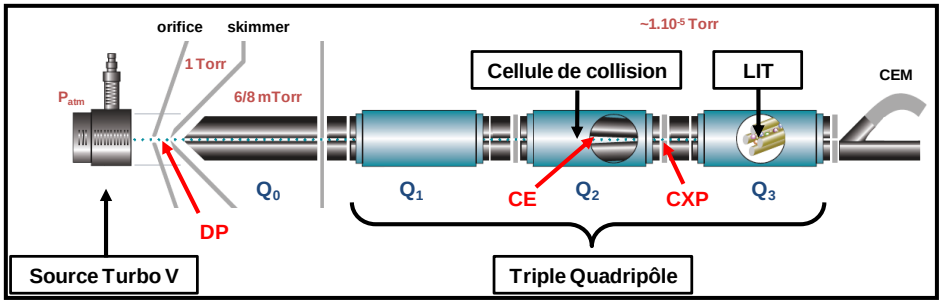


Figure 44. Illustration schématique d'un spectromètre de masse 4000 QTrap sur laquelle son également mentionnées les différentes tensions appliquées en mode SRM : DP (Declustering Potential), CE (Collision Energy), CXP (Cell Exit Potential)

La Figure 44 présente de façon schématique un 4000 QTrap aux travers des éléments qui le composent. Les principales composantes du système intervenant dans le mode SRM et les pressions qui règnent dans les différentes parties de l'instrument sont mentionnées sur la Figure 44. Afin de le présenter de manière globale, il a été choisi d'exposer les éléments et paramètres importants en suivant le cheminement d'une molécule analysée en mode SRM.

La molécule en solution arrive dans le spectromètre de masse par l'intermédiaire de la source d'ionisation TurboV. La source TurboV est une source API, assistée par nébullisation pneumatique, capable de fonctionner à des débits de phase mobile de 1 mL.min^{-1} en ESI.[167]

Pour atteindre des débits de cet ordre, il faut pouvoir évaporer une grande quantité de solvant tout en évitant, au maximum, les contaminations provenant de l'entrée de gouttelettes dans l'analyseur. La source TurboV a donc une géométrie dite « orthogonale » de manière à ce que le spray soit créé perpendiculairement à l'orifice.

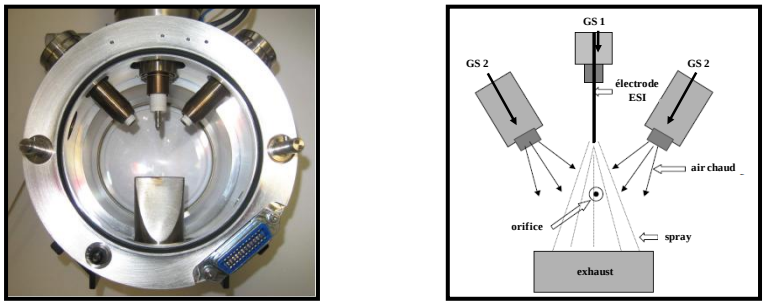


Figure 45. Photographie de la source Turbo V (à gauche) et son schéma descriptif adapté (à droite)[167] illustant les flux de gaz GS1 (gaz de nébullisation) et GS2 (gaz de désolvatation)

En plus du gaz de nébulisation (GS1), deux sources auxiliaires génèrent du gaz chauffé (GS2) assurant une désolvatation optimale de l'éluant. Si, dans notre cas, le gaz utilisé est de l'air, il est également possible d'utiliser de l'azote. Le débit de ces gaz, de même que la température de chauffage (TEM), sont des paramètres à optimiser en fonction du débit et de la composition de l'éluant. De manière générale, plus le débit sera élevé, plus les valeurs de ces trois paramètres devront être augmentées.

La conception de la source TurboV permet également de changer rapidement de type d'ionisation en permutant simplement les sondes d'introduction dédiées à l'ESI et l'APCI, représentées dans la Figure 46.

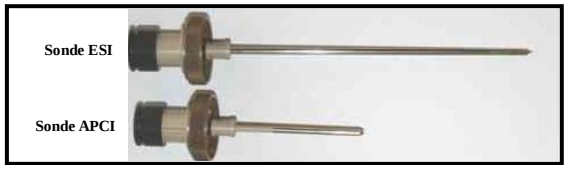


Figure 46. Photo des électrodes ESI et APCI

Par l'application d'une tension de spray (IonSpray voltage, IS) entre l'électrode ESI et la contre-électrode (Curtain plate), la molécule d'analyte va être ionisée tout en passant de l'état liquide à l'état gazeux selon le processus d'ionisation par electrospray décrit dans le chapitre précédent. L'ion pénètre ensuite dans l'interface P_{atm}-vide constituée de l'orifice, du skimmer et du quadripôle Q_0. Un flux de « curtain gas » ou gaz rideau qui peut être de l'azote est injecté entre la curtain plate et l'orifice afin de prévenir l'encrassement de l'orifice. Ensuite, l'ion est soumis à une tension de déclusterisation (DP) pour éliminer les dernières traces de

solvants, puis accélère avant d'entrer dans le quadripôle Q_0. La fonction principale de Q_0 consiste à refocaliser les ions.

En mode SRM, le quadripôle Q_1 va sélectionner l'ion d'intérêt de rapport *m/z* avec une résolution unitaire. Pour un rapport $m/z = x$, les ions transmis en q_2 seront tous les ions de rapport $m/z = x \pm 0{,}5\ u$.

Les ions entrent ensuite dans la cellule de collision q_2 de type LINAC (Linear Accelerator) où ils vont subir un processus de dissociation induite par collision avec l'application d'une tension CE (Collision Energy) en présence d'un gaz de collision, l'azote. Les collisions des ions avec le gaz peuvent aussi entraîner un refroidissement et surtout une diminution de leur vitesse axiale, ce qui mène à des temps de résidence relativement longs qui peuvent conduire, dans certains cas, à la formation d'adduits ou des phénomènes de cross-talk.[254,255] Le cross-talk, illustré par la Figure 47, peut survenir en SRM lorsque sont analysées des substances qui partagent des ions précurseurs ou fils de même rapport *m/z*.

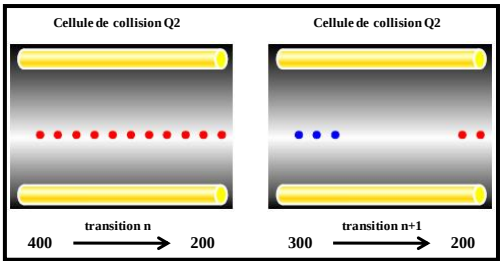


Figure 47. Schématisation du phénomène de cross-talk dans la cellule de collision lors du passage d'une transition n 400→200 à une transition n+1 300→200

Le passage d'une transition à l'autre est très rapide dans ce mode et tous les ions n'ont pas toujours le temps d'être évacués. Par exemple, dans le cas de la Figure 47, une réponse sera observée pour la transition *m/z* 300→200 à cause des ions résiduels de rapport *m/z* 200 provenant de la dissociation par CID des ions *m/z* 400. L'application d'un gradient de champ électrique permet à la LINAC d'accélérer les ions vers Q_3 et, ainsi, d'éviter ces phénomènes tout en améliorant la vitesse de scan.[254,255] De plus, l'application d'une autre tension à la sortie de q_2, dite CXP (Cell Exit Potential) et qui est spécifique à chaque fragment, permet d'améliorer la transmission vers Q_3.

Le quadripôle Q_3 filtre ensuite le fragment de rapport *m/z* d'intérêt dont le signal va être finalement détecté et amplifié au moyen d'un détecteur de type CEM (Channel Electron Multiplier) quand l'instrument opère en mode SRM. Q3 peut aussi fonctionner en mode LIT. Dans ce cas, le quadripôle Q_0 a la capacité de retenir les ions (Q_0 trapping), ce qui a pour effet d'améliorer considérablement le **duty cycle** qui correspond au temps de travail.[256]

II. Optimisation des rendements d'ions fragments à travers l'étude de l'ion $[M+H]^+$ de la butraline

L'acquisition en mode SRM nécessite de déterminer un certain nombre de paramètres qualifiés de composé-dépendant pour chacune des substances actives étudiées, les principaux étant :

- le rapport *m/z* de l'ion précurseur (filtré en Q_1),
- les rapports *m/z* des deux fragments principaux (filtrés) en Q_3,
- la tension de déclusterisation optimum,
- les énergies de collision CE donnant les meilleurs rapports de fragmentation,
- les tensions de sorties CXP qui optimisent la transmission des ions fragments.

La procédure employée pour y parvenir est relativement simple. Elle consiste à injecter individuellement les substances actives à une concentration de 100 $\mu g.L^{-1}$ avec un débit de l'ordre de 10 $\mu L.min^{-1}$. L'utilisation de débit de cet ordre permet de se concentrer sur les paramètres de détection en limitant l'influence d'autres facteurs tels que la température et le gaz chauffant qui n'ont pas besoin d'être activés pour assister l'évaporation.

Le solvant de dilution est par contre important et il est conseillé de se placer dans des conditions proches de ce que seront les conditions chromatographiques. En effet, nous avons mis en évidence, dans le chapitre précédent, l'importance de la composition des phases mobiles dans le processus d'ionisation. L'acétate d'ammonium est, par exemple, utile pour ioniser les molécules neutres et moins polaires en formant des complexes de type $[M+NH_4]^+$.

Le solvant d'injection était donc, dans un premier temps, constitué d'un mélange MeOH/Eau (50/50) enrichi avec 5 mM d'acétate d'ammonium. La concentration de la substance active, ainsi que les proportions en solvants et additifs pouvaient être modifiées dans un second temps en fonction de la première observation, pour favoriser l'ionisation et la détection de l'ion précurseur et, ainsi, faciliter son optimisation.

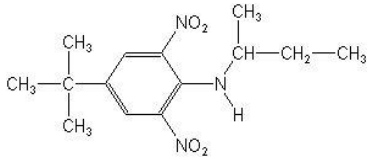
II.1 Optimisation de l'intensité de l'ion précurseur

Le processus d'ionisation par electrospray conduit à la formation de plusieurs ions à partir de la molécule initiale qui, comme nous l'avons déjà vu, peuvent se présenter sous la forme $[M+H]^+$ ou sous forme d'adduits du type $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$. D'un point de vue quantitatif, les adduits sodium et potassium ne peuvent pas être utilisés car leur formation, due à la présence d'éléments alkino-terreux dans la verrerie par exemple, est difficilement

contrôlable. Généralement, ce sont les ions de type $[M+H]^+$ et $[M+NH4]^+$ (contrôlés par ajout d'acétate d'ammonium dans les phases mobiles) qui sont privilégiés. Pour certains composés, il est possible d'obtenir une réponse en mode ESI- avec la formation d'ions $[M-H]^-$. Dans tous les cas, l'ion précurseur sélectionné sera celui qui donne le signal le plus intense.

Prenons l'exemple de l'optimisation de la substance active butraline dont la formule développée, la formule brute et les masses moyenne et monoisotopique sont détaillées dans la Figure 48.

Butraline



Formule brute	$C_{14}H_{21}N_3O_4$
Masse moyenne	295.33 g/mol
Masse monoisotopique	295

Figure 48. Caractéristiques de la molécule de butraline

Un balayage en full scan dans la gamme de masse de rapport *m/z* = 250-350 permet de visualiser les différents adduits possibles : $[M+H]^+$ = 296, $[M+NH_4]^+$ = 313, $[M+K]^+$ = 314, $[M+Na]^+$ = 306. L'ion le plus intense observé correspond à la protonation de la molécule sur l'amine secondaire de la butraline.

La DP va donc être optimisée en balayant une gamme de tensions entre 0 et 100 V de manière à évaluer son effet sur la réponse de l'ion $[M+H]^+$ de rapport m/z 296 (Figure 49).

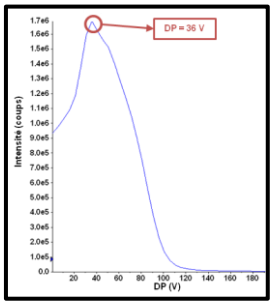


Figure 49. Graphique représentant l'évolution de la réponse de l'ion précurseur (intensité en coups) en fonction de la variation de la DP (en V)

La Figure 49 montre très clairement l'influence de la DP sur la réponse d'un ion et l'importance d'optimiser cette tension. La courbe décrit une augmentation rapide de l'intensité de l'ion *m/z* 296 entre 0 et 36 V, admet un maximum pour une tension de déclusterisation égale à 36 V et diminue rapidemment pour finalement atteindre une valeur proche de 0 pour des tensions supérieures à 120 V. L'allure de cette courbe, composée de

deux segments, s'explique par la succession de deux phénomènes. L'augmentation de la DP conduit à une amélioration de l'efficacité de la déclusterisation qui a pour conséquence une production d'ions nus de rapport *m/z* 296 plus importante. Pour une DP > 36 V, l'énergie transférée au cours des collisions conduit non seulement à participer à l'étape de désolvatation suprathermique, mais surtout à accroître l'énergie interne de l'ion au-dessus de son seuil de dissociation. Les fragmentations ainsi induites, contribuent à une diminution du signal de l'ion précurseur. Ce phénomène, similaire à celui se produisant dans une cellule de collision, est appelé « CID in source ».

Cette expérience permet donc de déterminer la DP qui assurera le maximum de sensibilité. Dans le cas de la butraline, la DP est égale à 36 V.

L'étape d'optimisation suivante consiste à déterminer les deux ions produits principaux, accompagnés de leurs paramètres respectifs CE et CXP, permettant de maximiser la formation de ces fragments (CE) dans la cellule de collision et leurs transmissions vers Q_3 (CXP).

II.2 Optimisation de l'intensité des ions fragments caractéristiques

Les ions fragments susceptibles d'être conservés pour l'analyse, sont sélectionnés à partir d'un spectre d'ions produits réalisé non pas avec une énergie de collision constante, mais avec un balayage sur une gamme de valeurs de tensions, de manière à obtenir un spectre de masse représentatif des différents types de fragmentation de l'ion précurseur (Figure 50).

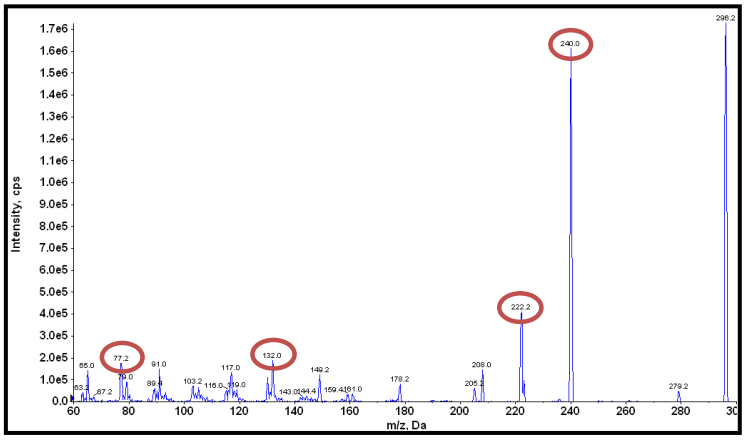


Figure 50. ***Spectre de masse d'ions produits de l'ion précurseur (m/z 296) de la butraline obtenu avec un balayage d'énergie de collision CE et représentatif des différents types de fragmentation de l'ion précurseur***

Le spectre de masse ci-dessus met en évidence la fragmentation de l'ion *m/z* 296 en deux ions produits principaux *m/z* 240 et *m/z* 222. L'objectif est, dès lors, de favoriser la dissociation de l'ion précurseur en ces deux ions produits au détriment des autres dans le but

d'obtenir la meilleure sensibilité. Ceci est effectué en déterminant l'énergie de collision adaptée au chemin de fragmentation concerné. Afin d'éviter de mettre de côté des ions qui pourraient se révéler intéressants par la suite, l'optimisation de la CE est réalisée pour les quatre fragments principaux de rapport *m/z* 240, 222, 132 et 77.

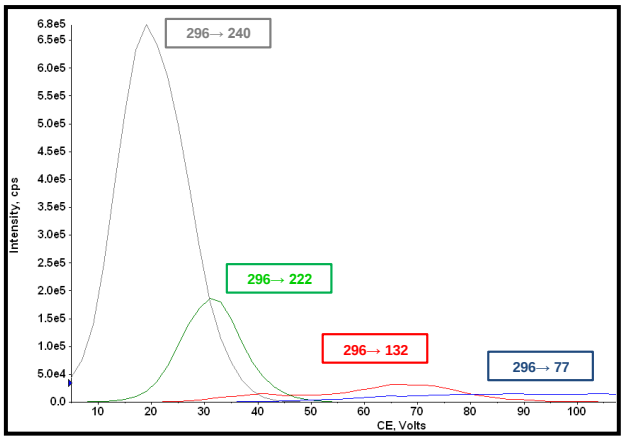


Figure 51. ***Evolution de l'intensité des ions produits en fonction l'énergie de collision***

La Figure 51 montre qu'il existe une énergie de collision optimale pour chaque transition. Elle est respectivement de 19, 31, 65 et 105 V pour les ions *m/z* 240, 222, 132 et 77. Ce graphique met également en évidence que plus la CE est grande, plus la dissociation de l'ion précurseur conduit à des fragments de faibles masses, conséquence d'une énergie interne accumulée de plus en plus importante. Dans le cas de la butraline, les deux transitions SRM les plus sensibles sont donc la SRM1 296→240 et la SRM2 296→222.

Le Schéma 10 présente le mécanisme de fragmentation supposé, expliquant la formation de l'ion produit *m/z* 240 à partir de l'ion précurseur *m/z* 296.

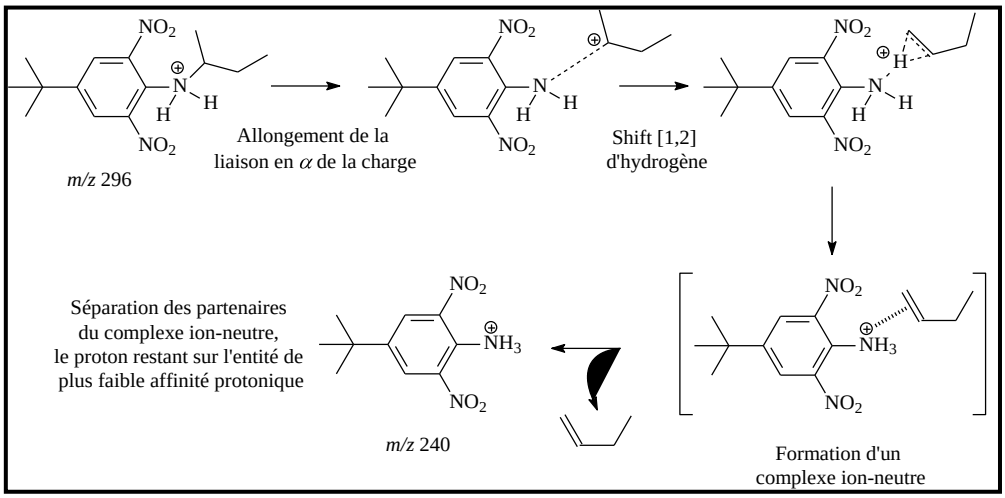


Schéma 10. ***Mécanisme de fragmentation caractéristique de la transition 296→240***

L'ion produit de rapport *m/z* 222 peut, *a priori*, avoir deux origines. Ainsi que le montre le Schéma 11, il peut être issu de la dissociation de l'ion fils *m/z* 240 conduisant à la perte d'une

molécule d'eau. Mais on peut aussi considérer un autre précurseur pour cet ion *m/z* 222. Dans ce cas, il s'agit de décrire la formation de celui-ci à partir de la perte d'un groupement butyl provenant de l'ion *m/z* 279, lui-même issu de la perte d'un radical hydroxyl à partir du *m/z* 296 (voir Schéma 12).

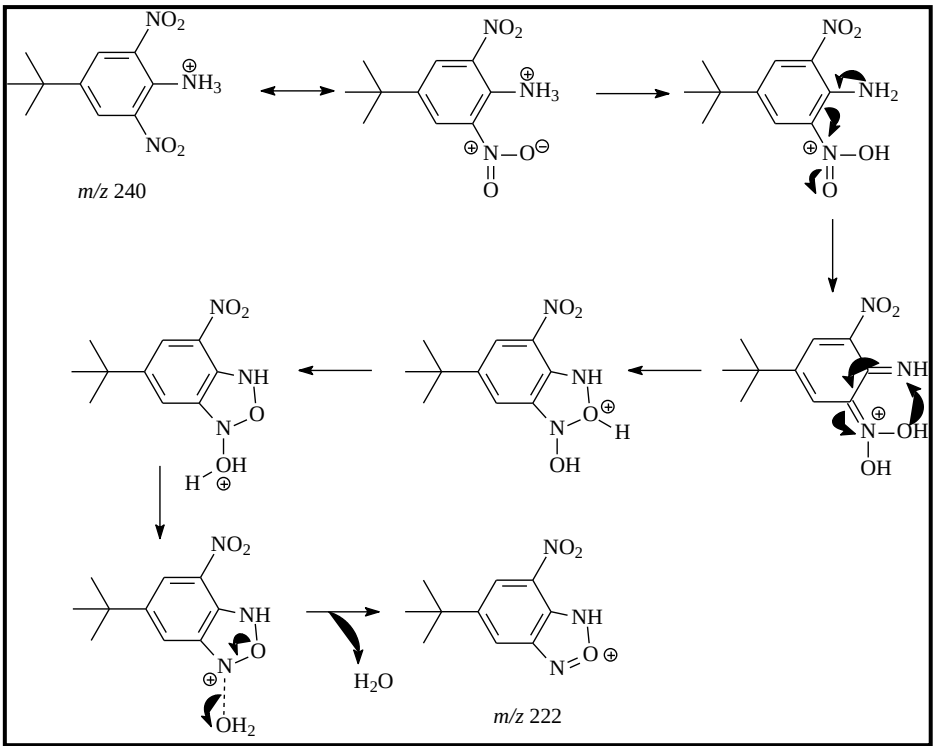


Schéma 11. Premier mécanisme de fragmentation caractéristique de la transition 296→222

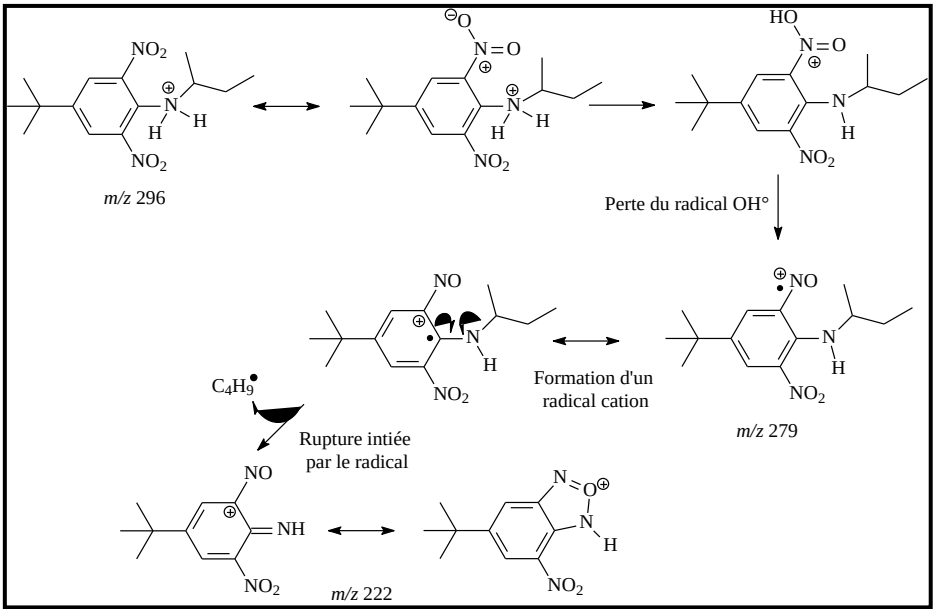


Schéma 12. Second mécanisme de fragmentation caractéristique de la transition 296→222

Le mécanisme de fragmentation supposé selon lequel l'ion *m/z* 222 serait issu d'une fragmentation secondaire de l'ion *m/z* 240 (Schéma 11) semble être corroboré par

l'interprétation des courbes de la Figure 51. En effet, l'augmentation significative du signal de la transition 296→222 (courbe verte) a lieu juste après que celui de la transition 296→240 (courbe grise) ait atteint son maximum. Cette hypothèse pourrait probablement être confirmée au moyen d'une expérience de type MS^3.

Les paramètres de fragmentation étant maintenant connus, il ne reste qu'à optimiser la transmission des ions produits entre q_2 et Q_3 à travers la CXP (Figure 52).

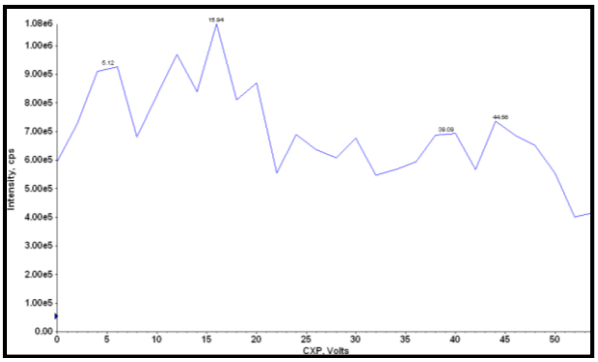


Figure 52. Evolution de l'intensité de la transition 296→240 en fonction de la CXP

Comme en témoigne la Figure 52, la CXP a un impact bien moindre que les paramètres précédemment décrits (DP et CE) sur la sensibilité de la transition. En effet, le signal évolue peu sur l'ensemble de la gamme de tensions testées (0-50 V) avec cependant une baisse légère mais significative de la réponse pour des CXP supérieures à 20 V.

L'ensemble des paramètres de détection obtenus durant l'optimisation de la butraline peuvent être résumés dans un tableau de la forme :

Transition	Forme de l'ion précurseur	Q1 (m/z) sélection de l'ion précurseur	DP (V)	Q3 (m/z) sélection de l'ion produit	CE (V)	CXP (V)
Butraline -1	$[M+H]^+$	296,0	36	240,0	19	16
Butraline -2	$[M+H]^+$	296,0	36	222,2	31	12

Tableau 10. Tableau type récapitulatif d'une optimisation (dans ce cas la butraline)

III. Bilan des paramètres de détection en mode SRM des autres pesticides

Au cours de ce projet, un peu plus de 250 substances actives, dont les paramètres de détection sont disponibles en Annexe 5, ont été optimisées selon la manière décrite ci-dessus. Si, dans la suite du projet, certaines de ces molécules ont dû être retirées de la méthode multi-résidus pour des raisons de sensibilité, d'autres n'ont pas abouti à l'établissement de paramètres de détection malgré les différentes tentatives d'optimisation. C'est le cas, en particulier, des molécules du Tableau 11.

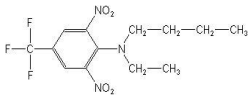
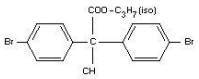
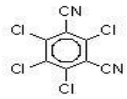
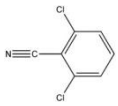
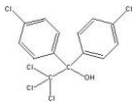
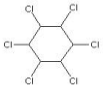
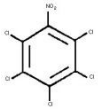
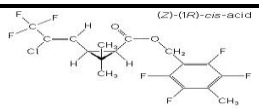
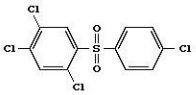
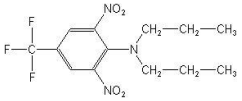
Substance active	Famille chimique (sous famille)	Formule plane	PM	Formule brute	Log K_{ow}
Benfluraline	Dinitroanilines		335,28	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	5,29
Bromopropylate	Benzilate		428,1	$C_{17}H_{16}Br_2O_3$	5,4
Chlorothalonil	Organochlorés		265,92	$C_8Cl_4N_2$	2,94
Dichlobénil	Benzonitriles		172,01	$C_7H_3Cl_2N$	2,7
Dicofol	Organochlorés		370,49	$C_{14}H_9Cl_5O$	4,3
Lindane (γ-HCH)	Organochlorés		290,83	$C_6H_6Cl_6$	3,69
Quintozene	Organochlorés		295,3	$C_6Cl_5NO_2$	4,46
Tefluthrine	Pyréthrinoïde de synthèse		418,73	$C_{17}H_{14}ClF_7O_2$	6,4
Tetradifon	Sulfone sulfonate		356,06	$C_{12}H_6Cl_4O_2S$	4,61
Trifluraline	Dinitroanilines		335,28	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	5,27

Tableau 11. Liste de la dizaine de molécules non ionisées en ESI au cours de la présente étude

Les molécules exposées dans le Tableau 11 se caractérisent par une faible, voire très faible polarité avec des **log K_{ow}** > 4 à l'exception du chlorothalonil (2,94), dichlobénil (2,7) et lindane (3.69). De plus, ces composés présentent peu de sites de protonation ou de déprotonation. En conséquence, il est très difficile de les ioniser par le processus d'electrospray, comme en témoigne le travail d'Alder *et al.* qui ne fait état d'aucune référence d'analyse LC-MS/MS pour ces substances actives.[20] Au vu de leurs caractéristiques, elles sont généralement analysées en GC-MS ou GC-MS/MS avec une ionisation de type EI ou CI.

Parmi les substances actives optimisées, le Tableau 12 présente les paramètres de détections de 70 pesticides qui ont été optimisés prioritairement pour effectuer les premiers

essais. 63 d'entre eux appartiennent à la liste prioritaire définie dans la première partie de ce mémoire.

Pesticide	Ion précurseur	DP* (V)	SRM1 (Quantification)	SRM1 CE (V)	SRM1 CXP (V)	SRM2 (Confirmation)	SRM2 CE (V)	SRM2 CXP (V)
2,4D	[M-H]-	-41	219,0/169,9	-14	-15	219,0/124,9	-34	-15
Abamectine	$[M+NH_4]^+$	66	890,5/305,1	35	18	890,5/145,2	51	14
Acéphate	$[M+H]^+$	26	184,1/142,9	13	12	184,1/124,9	25	10
Acétamipride	$[M+H]^+$	56	223,1/126,0	29	22	223,1/90,0	49	16
Acibenzolar-S-méthyl	$[M+H]^+$	46	211,2/140,0	31	22	211,2/136,0	39	12
Aclonifen	$[M+H]^+$	66	265,1/248,0	25	14	265,1/182,1	41	18
Acrinathrine	$[M+NH_4]^+$	46	559,1/208,1	23	15	559,1/181,1	43	15
Amidosulfuron	$[M+H]^+$	41	370,0/217,9	31	15	370,0/260,9	19	15
Azoxystrobine	$[M+H]^+$	36	404,0/372,0	19	15	404,0/343,9	29	15
Benalaxyl	$[M+H]^+$	46	326,3/148,1	27	15	326,3/208,2	21	15
Bentazone	[M-H]-	-71	239,1/132,0	-32	-15	239,1/197,0	-24	-15
Bifenthrine	$[M+NH_4]^+$	41	440,1/166,1	57	8	440,1/181,1	21	10
Bromacil	$[M+H]^+$	21	261,0/205,0	19	10	261,0/187,9	37	15
Buprofézine	$[M+H]^+$	26	306,2/201,2	17	15	306,2/116,2	21	15
Butraline	$[M+H]^+$	36	296,0/240,0	21	16	296,0/221,9	29	22
Carbaryl	$[M+H]^+$	31	202,1/145,1	15	15	202,1/127,1	35	15
Carbendazime	$[M+H]^+$	61	192,1/160,1	25	15	192,1/132,1	41	15
Carbétamide	$[M+H]^+$	21	237,1/192,0	13	15	237,1/118,1	19	15
Carbofuran	$[M+H]^+$	36	222,1/165,0	17	15	222,1/123,0	29	15
Chlorfenvinphos	$[M+H]^+$	56	359,0/155,0	19	15	359,0/99,2	43	15
Chloridazon	$[M+H]^+$	76	222,0/104,2	31	15	222,0/92,2	35	15
Chlorpyrifos	$[M+H]^+$	41	349,9/198,1	25	15	349,9/96,9	41	15
Clopyralide	$[M+H]^+$	56	192,1/110,1	47	15	192,1/146,0	29	15
Cycloxydime	$[M+H]^+$	51	326,1/280,1	17	15	326,1/180,1	25	15
Cyhalothrine-(λ)	$[M+NH_4]^+$	36	467,1/225,0	23	15	467,1/141,2	57	15
Cyromazine	$[M+H]^+$	66	167,2/85,1	27	14	167,2/108,1	31	18
Deltamethrine	$[M+NH_4]^+$	56	521,0/278,9	23	12	521,0/504,1	15	14
Dicamba	[M-H]-	-30	218,9/174,7	-10	-9	218,9/140,9	-10	-1
Difénoconazole	$[M+H]^+$	61	406,1/251,0	37	15	406,1/337,1	23	15
Diflufénican	$[M+H]^+$	56	395,1/265,8	33	15	395,1/246,1	43	15
Diméthénamid	$[M+H]^+$	31	276,1/168,1	33	15	276,1/244,1	19	15
Diméthoate	$[M+H]^+$	11	230,0/199,0	13	15	230,0/125,0	29	15
Diuron	$[M+H]^+$	66	233,0/72,0	31	15	233,0/159,9	33	15
Ethion	$[M+H]^+$	36	385,0/199,1	17	15	385,0//171,0	23	15
Ethofumésate	$[M+H]^+$	81	287,1/259,1	15	14	287,1/121,1	23	10
Ethoprophos	$[M+H]^+$	61	243,0/130,9	29	10	243,0/96,9	43	6
Fluazifop-p-butyl	$[M+H]^+$	51	384,1/282,1	27	15	384,1/328,1	23	15
Flurochloridone	$[M+H]^+$	81	312,0/291,9	29	15	312,0/145,0	63	15
Fluroxypyr	[M-H]-	-45	252,9/194,7	-18	-9	252,9/232,8	-10	-1
Haloxyfop	[M-H]-	-81	360,0/287,9	-15	-15	/	/	
Iprodione	$[M+H]^+$	61	330,1/244,9	21	20	330,1/288,0	17	16
Isoproturon	$[M+H]^+$	46	207,1/72,0	33	15	207,1/165,2	19	15
Isoxaben	$[M+H]^+$	51	333,1/165,0	25	8	333,1/85,0	19	14
Lénacil	$[M+H]^+$	56	235,1/153,1	21	15	235,1/136,1	43	15
Linuron	$[M+H]^+$	66	249,1/182,1	21	15	249,1/160,0	23	15
MCPA	[M-H]-	-46	199,0/140,8	-18	-15	/	/	
Mécoprop	[M-H]-	-51	213,0/140,7	-14	-15	/	/	
Méfénoxam	$[M+H]^+$	46	280,2/160,1	31	15	280,2/220,2	19	15
Métamitron	$[M+H]^+$	61	203,1/104,1	33	18	203,1/175,1	25	10
Métazachlor	$[M+H]^+$	21	278,1/134,2	29	15	278,1/210,0	15	15
Méthomyl	$[M+H]^+$	26	163,0/88,0	13	14	163,0/106,1	15	8
Monocrotophos	$[M+H]^+$	46	224,1/127,0	21	15	224,1/98,0	17	15
Napropamide	$[M+H]^+$	31	272,3/129,0	21	15	272,3/171,0	23	15
Norflurazon	$[M+H]^+$	81	304,0/284,1	31	15	304,0/160,1	41	15
Oryzaliné	[M-H]-	-90	345,0/281,1	-26	-5	345,0/78,0	-64	-1
Oxadiazon	$[M+H]^+$	86	345,0/220,0	29	12	345,0/302,9	19	16
Oxyfluorfène	$[M+NH_4]^+$	41	379,0/316,1	25	16	379,0/237,1	39	15
Pendiméthalin	$[M+H]^+$	51	282,1/212,0	15	10	282,1/194,0	25	10
Pirimicarbe	$[M+H]^+$	36	239,2/72,0	31	15	239,2/181,9	21	15
Prométryn	$[M+H]^+$	51	242,0/158,0	31	15	242,0/200,0	25	15
Propiconazole	$[M+H]^+$	71	342,1/123,1	83	22	342,1/159,0	39	8
Propyzamide	$[M+H]^+$	36	256,1/190,0	19	15	256,1/173,0	31	15
Prosulfocarbe	$[M+H]^+$	36	252,0/91,1	29	15	252,0/128,1	17	15
Pymetrozine	$[M+H]^+$	76	218,2/105,1	27	15	218,2/79,0	47	15
Quizalofop-p-ethyl	$[M+H]^+$	71	373,1/298,9	25	15	373,1/271,0	33	15
Simazine	$[M+H]^+$	46	202,1/132,0	27	15	202,1/124,1	25	15
Sulfosulfuron	$[M+H]^+$	31	471,1/261,0	23	15	471,1/211,1	21	15
Tau-fluvalinate	$[M+H]^+$	81	503,1/208,1	17	12	503,1/181,1	39	10
Tébuconazole	$[M+H]^+$	21	308,0/70,1	39	15	308,0/125,0	47	15
Triclopyr	[M-H]-	-36	255,9/197,9	-12	-15	255,9/219,8	-6	-15

Tableau 12. Liste des paramètres de détection de 70 pesticides analysés dans le contexte de la présente étude

Les ions précurseurs des 70 pesticides présentés dans le Tableau 12 sont très majoritairement de la forme $[M+H]^+$ (55/70). Neuf molécules sont analysées en mode ESI- (en bleu) avec la formation d'ion $[M-H]^-$ qui s'explique par la présence de proton(s) acide(s) dans leur structure. Les six dernières molécules (en rouge) admettent un ion précurseur sous la forme d'adduit ammonium $[M+NH4]^+$. A noter que ces molécules, qui appartiennent à la famille des pyréthrinoïdes (acrinathrine, bifenthrine, cyhalothrine-λ, deltaméthrine), des avermectines (abamectine) ou des diphényl éther (oxyfluorfène) sont relativement peu polaires avec un log K_{ow} compris entre 4 (abamectine) et 6,9 (cyhalothrine-λ).

Il faut également noter que, parmi les 70 substances actives du Tableau 12, trois molécules ne présentent qu'une transition SRM. Il s'agit de l'haloxyfop, du MCPA et du mécoprop pour qui le processus de fragmentation par CID ne conduit qu'à un seul ion majoritaire, correspondant à la perte de la partie portant la fonction acide. L'exemple du MCPA est donné dans le Schéma 13.

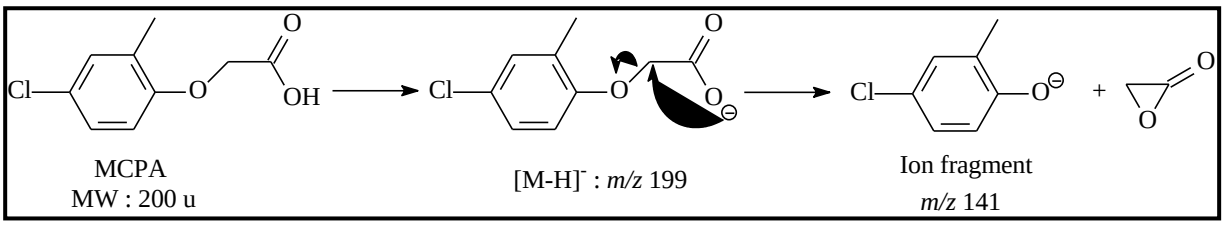


Schéma 13. Proposition d'un mécanisme de fragmentation du MCPA

Les paramètres de détection exposés dans le Tableau 12 vont permettre de créer une méthode d'acquisition capable d'analyser les 70 pesticides (137 transitions). Etant donné le mode de fonctionnement du SRM, c'est-à-dire Q_1 et Q_3 en mode SIM et q_2 en mode *RF*, il est évident que le spectromètre de masse ne peut pas scanner toutes les transitions en même temps. Des paramètres de temps sont donc à prendre en considération, notamment dans le cas d'un couplage avec la chromatographie liquide.

B) Cahier des charges imposé par le couplage LC-MS/MS

I. Le temps, un facteur crucial du mode SRM classique

De manière simplifiée, l'acquisition en mode SRM suppose que le spectromètre de masse applique les paramètres de détection propres à la première transition pendant un certain laps de temps avant de passer à la deuxième, puis éventuellement la troisième, ceci jusqu'à la dernière transition qui constitue la fin d'un cycle de scan. Le spectromètre de masse recommence alors l'acquisition de la première transition et répète ce processus durant toute la durée de la méthode d'analyse. La durée du cycle est liée à la vitesse d'acquisition du spectromètre de masse. Certains éléments comme la LINAC contribuent à accélérer ce processus.

Le mode de fonctionnement du mode SRM amène donc à définir plusieurs paramètres de temps :

- le « **dwell time** » (dw), qui est le temps passé par le spectromètre de masse à enregistrer une transition SRM ;
- le « **pause time** » ou temps de pause, qui est le temps mis par le spectromètre de masse pour appliquer les paramètres de détection de la transition SRM suivante ;
- le « **duty cycle** » qui correspond au temps total de travail sur une transition SRM, c'est-à-dire l'addition du dwell time et du pause time.

$$duty\ cycle = dwell\ time + pause\ time \tag{84}$$

- Le « **cycle time** » ou temps de cycle est le temps mis par le spectromètre de masse pour enregistrer une fois l'ensemble des transitions SRM.

$$cycle\ time = duty\ cycle \times SRMs \tag{85}$$

L'impact de ces paramètres sur le résultat qualitatif et quantitatif est considérable et, particulièrement, dans le cas d'un couplage avec une technique chromatographique. Afin d'assurer une quantification fiable, il est admis qu'un pic chromatographique doit être défini par un nombre de dix points de données minimum, le temps de cycle par définition correspond au temps mis par le détecteur pour créer un de ces points (voir Figure 53).

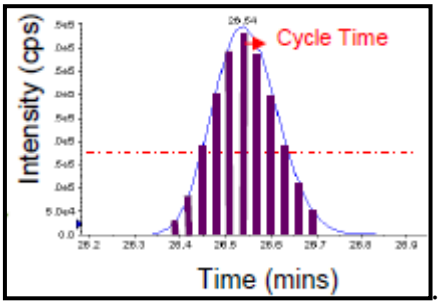


Figure 53. ***Représentation d'un pic chromatographique avec les différents points de données***

Compte tenu des relations (84) et (85), le nombre de transitions SRM, le dwell time et le temps de cycle, sont directement reliés entre eux. Par conséquent, plus le nombre de transitions SRM est augmenté à dwell time constant, plus le temps de cycle s'en trouve allongé. Le spectromètre de masse va, par conséquent, générer moins de points de données par pic (Figure 54) et donc occasionner une dégradation de la forme des pics qui aura un impact direct sur la quantification.

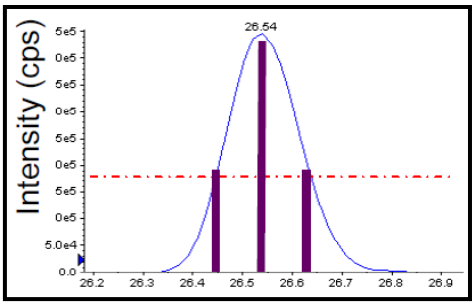


Figure 54. ***Impact d'un temps de cycle plus long sur le nombre de points/pics***

Pour éviter ce problème, il est possible de diminuer le dwell time des transitions, voire également le pause time et ainsi de conserver un nombre de points par pic convenable, comme l'illustre la Figure 55.

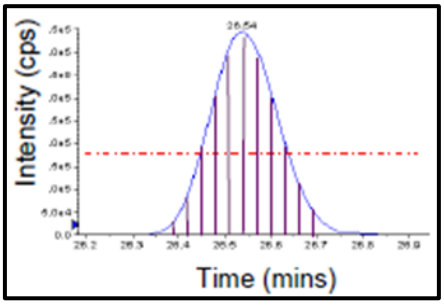


Figure 55. ***Influence du dwell time sur le temps de cycle et le nombre de points/pic générés***

Bien évidemment, le dwell time, tout comme le pause time, ne peuvent être réduits indéfiniment et dépendent de la vitesse d'acquisition de l'instrument. Dans le cas d'un 4000 QTrap, les valeurs minimum du dwell time et du pause time sont respectivement de 5 ms et 2

ms, soit un duty cycle de 7 ms. De plus, une réduction du dwell time signifie que l'analyseur passe moins de temps sur l'acquisition d'une transition et la qualité du signal s'en trouve affecté, comme en témoigne la Figure 56 qui montre l'évolution du rapport S/N (Signal-to-Noise) en fonction du dwell time pour la molécule d'azoxystrobine injectée à une concentration de 0,5 µg.L^{-1}.

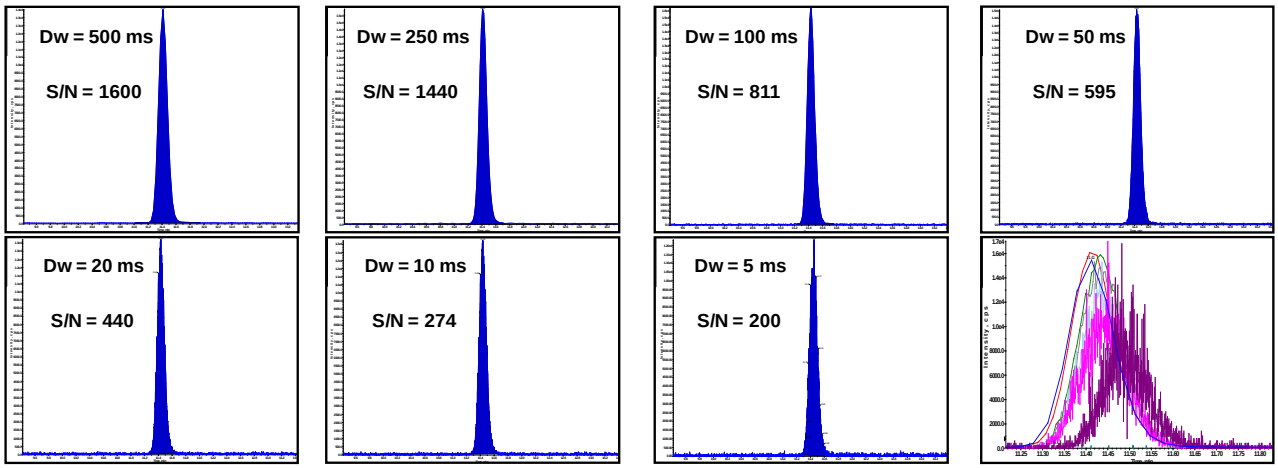


Figure 56. Evolution de l'intensité et du rapport S/N de l'azoxystrobine en fonction du dwell time injecté à une concentration de 0,5 µg.L^{-1}

Dans le cadre de méthodes d'analyse multi-résidus comprenant un nombre important de pesticides et donc un nombre global de transitions supérieur à 100, une méthode courante consiste à segmenter le temps d'analyse en plusieurs fenêtres d'acquisition en fonction du temps de rétention des analytes,[153] comme l'illustre la Figure 57.

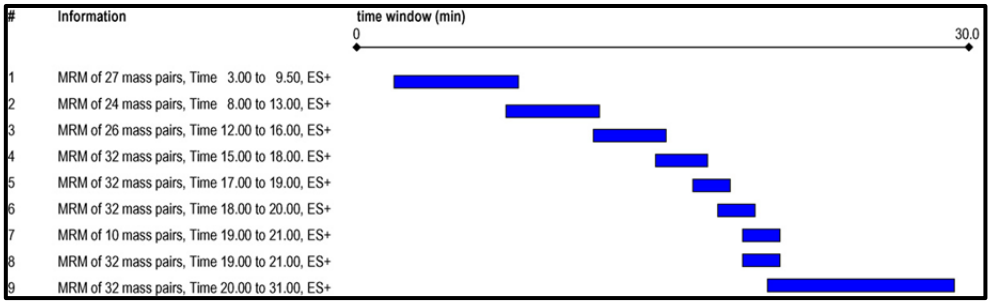


Figure 57. Illustration de la segmentation du temps d'analyse en fonction du temps de rétention des analytes[153]

Ce procédé permet d'enregistrer moins de transitions sur une période de temps définie et, donc, de conserver des valeurs de dwell time plus élevées. Cependant, lorsque le nombre de composés est très important, il devient compliqué de mettre en place cette technique. C'est pourquoi un algorithme dynamique, permettant d'enregistrer les transitions de l'analyte seulement lors de son élution, a été mis au point : il s'agit du mode Scheduled SRM.

II. La solution apportée par le mode Scheduled SRM

En combinant le temps de rétention de chaque composé avec une fenêtre de détection et un temps de cycle fixé par l'utilisateur, le logiciel édite une méthode d'acquisition dite scheduled SRM (sSRM), illustrée par la Figure 58.

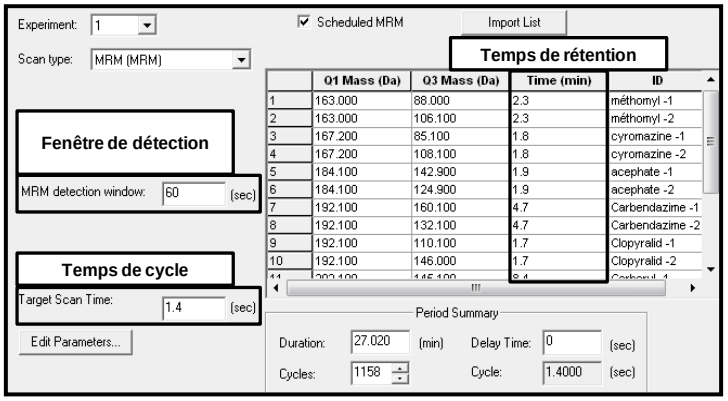


Figure 58. Editeur de méthode scheduled SRM

Elle permet au spectromètre de masse d'enregistrer les transitions de l'analyte seulement autour de son temps de rétention avec suffisamment de points de données pour générer un pic chromatographique bien défini.

Les paramètres d'une méthode d'acquisition sSRM sont directement reliés à la chromatographie. En effet, en plus de définir les temps de rétention de l'ensemble des analytes, il faut fixer une fenêtre de détection (MRM detection window) commune à l'ensemble des transitions et un temps de cycle (Target Scan Time).

La fenêtre de détection définit la durée pendant laquelle la transition va être enregistrée. Par exemple, dans le cas du méthomyl dont le temps d'élution est estimé à 2,3 min (Figure 58), une fenêtre de 60 s conduira à l'acquisition de ses deux transitions entre 1,8 et 2,8 min.

Plus les pics chromatographiques seront fins et plus les temps d'élution seront reproductibles, plus la fenêtre de détection SRM sera étroite. De cette manière, le nombre de transitions SRM concurrentes à chaque temps *t* est considérablement réduit, comme l'illustre la Figure 59 qui présente la simulation d'une méthode d'acquisition SRM comprenant 480 transitions réparties le long du run chromatographique avec des fenêtres d'acquisition de 30, 60, 90 et 120 s.

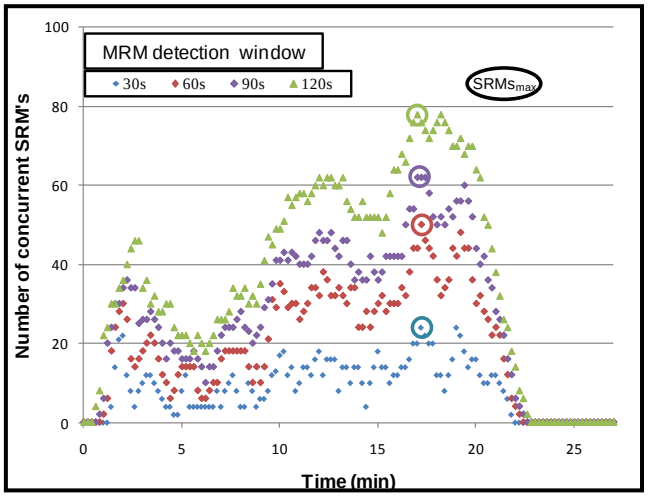


Figure 59. Evolution du nombre de transitions SRM enregistrées au temps t en fonction de la fenêtre de détection

Contrairement au mode SRM classique où l'ensemble des 480 transitions seraient scannées sur toute la durée de l'analyse, le mode sSRM permet de réduire considérablement le nombre de SRMs acquises à chaque temps *t*. En effet, le nombre de SRM_{max} ne dépasse pas 24, 50, 62 et 78 pour des fenêtres de rétention respectives de 30, 60, 90 et 120 s (Figure 59). Le travail chromatographique est donc primordial et doit conduire à l'obtention de pics fins mais également homogènes, car la fenêtre de détection sera déterminée par le pic le plus large. La diminution du nombre de SRMs concurrentes à chaque temps *t* permet d'allouer à chacune d'elles un dwell time plus élevé. Le logiciel calcule le dwell time maximum pour les espèces co-éluées en conservant le temps de cycle désiré.

Ce dernier porte l'appellation de Target Scan Time (TST), il indique combien de fois la transition sera enregistrée au cours du pic chromatographique. Il est fixé manuellement par l'opérateur pour générer suffisamment de points (au minimum 10) pour le pic le plus fin. Donc, si le pic le plus fin d'un chromatogramme a une durée de 14 s, un TST de 1.4 s devrait conduire, en théorie, à la création de 10 points de données pour ce pic.

En conclusion, cette simulation a permis de mettre en évidence l'impact de la chromatographie sur les performances du Scheduled SRM. Pour bénéficier au maximum des avantages de ce mode d'acquisition, il faut disposer de pics relativement fins et homogènes. Par conséquent, l'optimisation des conditions chromatographiques est une étape essentielle de la mise en place de la méthode multi-résidus LC-ESI/sSRM.

C) Optimisation des conditions chromatographiques pour un couplage en mode Scheduled SRM

De plus en plus négligée au profit des performances de la spectrométrie de masse, la chromatographie est pourtant indispensable et complémentaire de la MS pour obtenir une méthode d'analyse sensible mais également robuste. S'il est relativement aisé de déterminer les conditions de séparation et de détection optimales dans le cadre d'analyses mono-résidu ou multi-résidus ne comportant que quelques composés, la difficulté est grandement accrue lorsqu'il est question de plusieurs centaines de pesticides qui présentent, de surcroît, des propriétés physico-chimiques très variées. Obtenir des conditions optimales pour chacune des molécules étant irréalisable, l'objectif est de déterminer le meilleur compromis possible, en privilégiant parfois les composés les plus problématiques aux détriments des autres, mais en veillant à rester dans une juste mesure. Après avoir exposé les éléments influant sur la séparation chromatographique, nous nous intéresserons aux paramètres d'ionisation de la source TurboV qui permet le couplage avec le 4000 QTrap.

I. L'HPLC Ultimate 3000 et sa colonne chromatographique

Il existe sur le marché une très grande diversité de colonnes chromatographiques, aussi bien en termes de phases stationnaires qu'en géométries et en fournisseurs, les différences annoncées entre certaines étant parfois assez floues. Préalablement à l'acquisition d'une colonne, des critères de sélection ont dû être établis.

Le premier concernait la volonté de travailler à un débit de 1 $mL.min^{-1}$ pour profiter des performances optimales de la source d'ionisation TurboV, dont la géométrie a été conçue pour favoriser l'ionisation à des débits de cet ordre, selon les annonces du fabricant. De plus, cela permettait d'envisager une marge de manœuvre plus large pour l'optimisation des conditions d'injection. De ce débit découle la géométrie de la colonne chromatographique puisque 1 $mL.min^{-1}$ est le débit optimal des colonnes de diamètre 4,6 mm. Afin d'optimiser la séparation tout en évitant de générer de trop fortes contrepressions dans le système HPLC Ultimate 3000 (Dionex), une colonne HPLC d'une longueur de 150 mm remplie avec des particules de diamètres 4 µm a été choisie. Au finale, les dimensions géométriques de la colonne chromatographique sont relativement classiques, de type 150 mm × 4,6 mm × 4 µm.

Le second critère porte sur les caractéristiques de la phase stationnaire. D'après l'étude bibliographique, la phase la plus adaptée, dans le cadre d'analyse multi-résidus comportant des pesticides de polarité variable, est une phase stationnaire à base de silice greffée avec des ligands de type octadécyl (C_{18}). Cependant, les pesticides sélectionnés couvrent également une gamme d'acidité importante avec, à la fois, la présence d'acides (2,4D) mais aussi de bases (cyromazine). C'est pourquoi le choix d'un endcapping polaire pour augmenter la sélectivité des composés acides et la rétention des composés basiques a paru judicieux.[257]

Cette réflexion a donc conduit à la sélection d'une colonne chromatographique de type octadécyl avec un endcapping polaire, la Synergy Hydro RP (150 mm × 4,6 mm × 4 µm) de Phenomenex. La pratique de la chromatographie en phase inversée implique l'emploi de solvants polaires dont les plus communs sont l'eau, le méthanol et l'acétonitrile.

II. Choix des phases mobiles et du gradient d'élution

La composition des phases mobiles est un facteur déterminant à la fois pour la séparation chromatographique et l'ionisation en electrospray. En considérant ces deux éléments détaillés dans le chapitre II, le solvant organique le plus adapté pour les phases mobiles s'avérait être le méthanol. Les solvants étant définis (eau et méthanol), la première étape fut d'établir un gradient de phases mobiles permettant une séparation optimale des pesticides sur une durée d'analyse compatible avec un fonctionnement en routine de la méthode d'analyse.

L'optimisation du gradient d'élution a fait l'objet de plusieurs essais et adaptations au cours de ce projet. Cette partie présente le gradient final avec l'interprétation de quelques gradients clés qui ont conduit à son élaboration. L'efficacité de la séparation a, dans un premier temps, été évaluée à partir de l'injection d'un mélange d'une soixantaine de pesticides préparé dans un mélange MeOH/Eau (50/50) et analysé en mode ESI+. L'objectif étant à terme d'analyser plusieurs centaines de pesticides de polarités très diverses, le gradient a été optimisé de manière à séparer régulièrement au cours de l'analyse chromatographique la soixantaine de substances actives sélectionnées, sachant que ces pesticides sont représentatifs d'une large gamme de polarité : -2,68 (clopyralide) < log K_{ow} < 6,9 (cyhalothrine-λ).

Le gradient final de la méthode chromatographique, détaillé dans la Figure 60, est obtenu avec l'emploi des phases mobiles suivantes :

- phase mobile A : H_2O + 0,1% acide acétique + 5 mM acétate d'ammonium,
- phase mobile B : MeOH + 0,1% acide acétique + 5 mM acétate d'ammonium.

Temps (min)	% phase mobile A	% phase mobile B
0	50	50
1	50	50
5	30	70
9	30	70
16	0	100
20	0	100
22	50	50
27	50	50

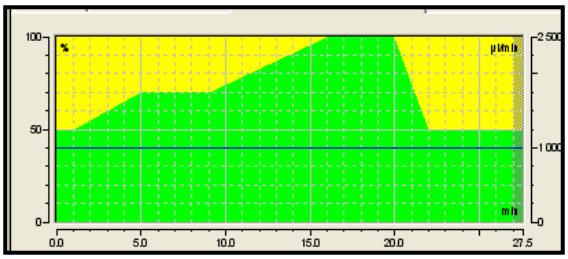


Figure 60. Gradient d'élution final de la méthode chromatographique décrit sous forme de tableau (à gauche) et schématique (à droite)

Une température constante de 35 °C est appliquée au four colonne pour améliorer l'efficacité de la colonne et diminuer la viscosité des solvants. Dans ces conditions, la contrepression générée au cours de ce gradient d'élution ne dépasse pas 200 Pa. Elle est donc parfaitement compatible avec le système qui tolère des pressions de l'ordre de 300 Pa.

Ce gradient, optimisé dans un premier temps pour la séparation d'une soixantaine de pesticides, a été appliqué par la suite à l'analyse de 242 pesticides et conduit à une séparation efficace et régulière de l'ensemble des pesticides sur une durée totale de 27 minutes (Figure 61). Notons que cette durée comprend une période de 5 minutes pour la rééquilibration de la colonne chromatographique.

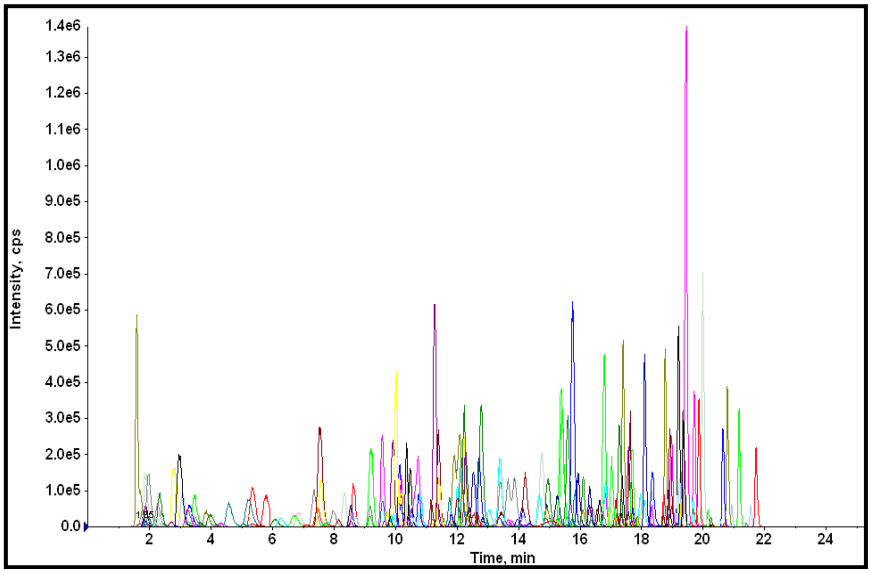
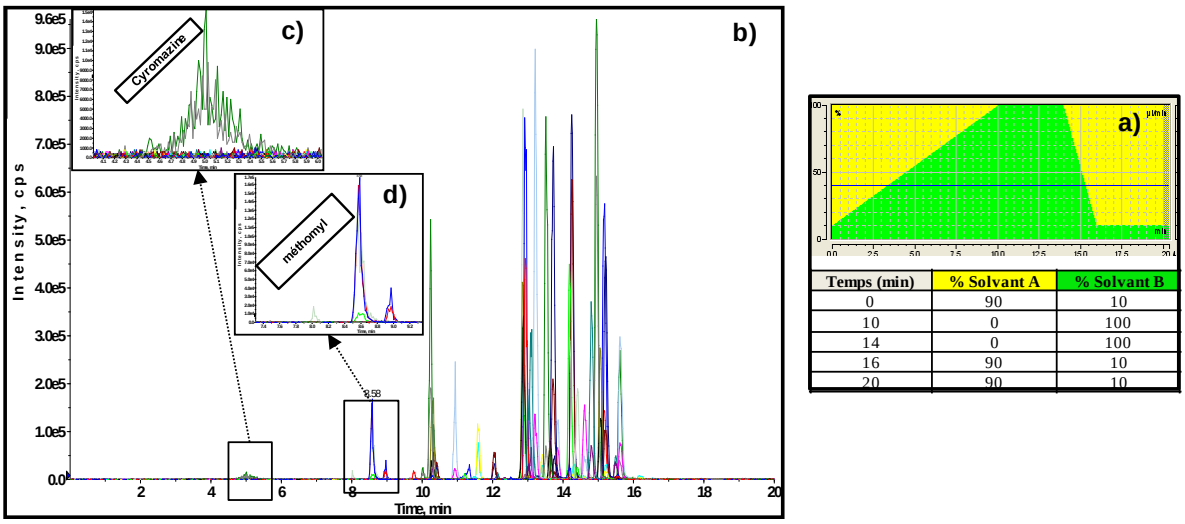


Figure 61. Chromatogramme montrant l'efficacité du gradient d'élution sur la séparation de 242 pesticides en mode ESI+

Une des caractéristiques particulières de ce gradient concerne le ratio initial équilibré en phases mobiles. Les solvants A et B sont effectivement présents en proportions égales (50/50). Classiquement, les gradients d'élution débutent avec un pourcentage élevé en phase aqueuse. Dans notre cas, un gradient d'élution débutant avec une proportion de 90 % de phase aqueuse (voir Figure 62 a)) a été utilisé pour tester la séparation d'une soixantaine de pesticides (voir Figure 62 b)).

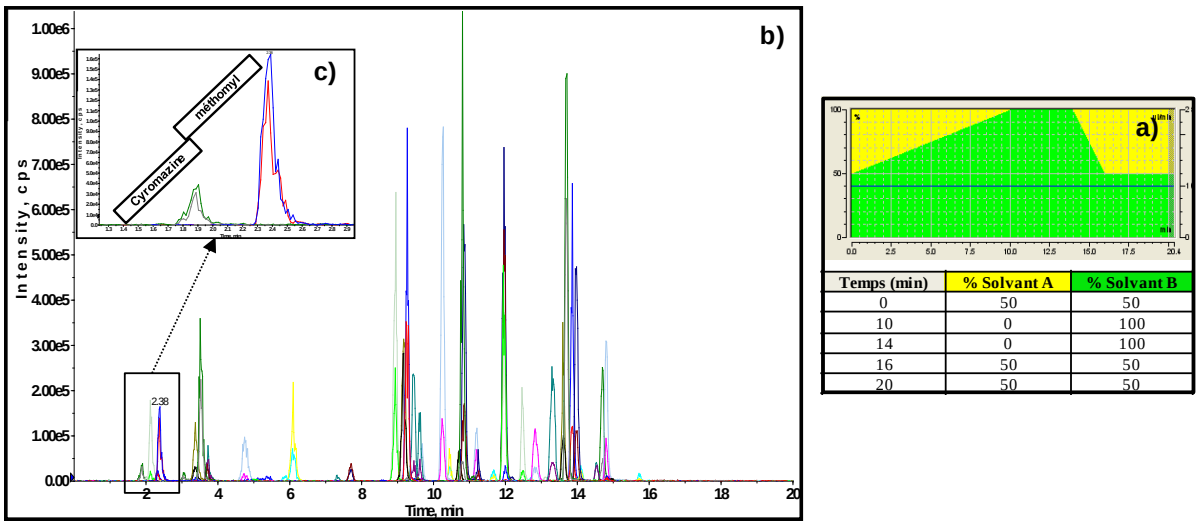


Temps (min)	% Solvant A	% Solvant B
0	90	10
10	0	100
14	0	100
16	90	10
20	90	10

Figure 62. *a) Illustration d'un gradient d'élution débutant avec 90 % de phase aqueuse conduisant à b) la séparation chromatographique d'une soixantaine de pesticides obtenue pour un solvant d'injection MeOH/Eau (50/50) et pour laquelle un zoom sur deux composés c) la cyromazine et d) le méthomyl permet de juger de la la forme des pics chromatographiques des composés polaires*

Ce type de gradient entraine une mauvaise efficacité de la colonne pour les composés polaires à l'image de la cyromazine (Figure 62 c)) dont le log K_{ow} est égal à 0,07. De plus, ces composés sont élués de la colonne avec un faible pourcentage de solvant organique, ce qui produit une ionisation peu efficace et donc une faible sensibilité, comme le montre le cas de la cyromazine (Figure 62 c)) et du méthomyl (Figure 62 d)).

La modification des conditions initiales en passant d'un ratio de phases mobiles A/B (90/10) à A/B (50/50) (Figure 63 a)) occasionne des changements importants dans la rétention des substances actives, comme le met en évidence le chromatogramme de la Figure 63 b).



Temps (min)	% Solvant A	% Solvant B
0	50	50
10	0	100
14	0	100
16	50	50
20	50	50

Figure 63. *a) Illustration d'un gradient d'élution débutant avec 50 % de phase aqueuse conduisant à b) la séparation chromatographique d'une soixantaine de pesticides obtenue pour un solvant d'injection MeOH/Eau (50/50) et pour laquelle un zoom sur deux composés c) la cyromazine et le méthomyl permet de juger de la forme des pics chromatographiques des composés polaires*

Le gradient reporté dans la Figure 63 a) autorise une répartition des pesticides plus régulière au cours du temps. Les composés polaires sortent beaucoup plus tôt qu'avec le précédent gradient et présentent une meilleure résolution et sensibilité (voir les pics chromatographiques de la Figure 63 c) par rapport à ceux de la Figure 62 c) et d)). En effet, le pourcentage élevé (50 %) en méthanol, dès l'injection, permet d'augmenter l'efficacité de la colonne et assure ainsi des pics plus fins. L'affinement du pic, auquel s'ajoute une ionisation plus efficace du fait d'un pourcentage plus élevé de phase organique dans la source d'ionisation (voir Figure 63 c)), sont les facteurs d'une amélioration significative de la sensibilité. En fait, le gradient final de la Figure 60 a été élaboré à partir de celui de la Figure 63 en allongeant la durée d'analyse, notamment par l'introduction d'une période de rééquilibration plus longue et l'ajout de quelques modifications mineures.

L'optimisation du gradient d'élution a donc permis d'associer, à la fois, une séparation efficace des pesticides et une bonne résolution des pics chromatographiques pour l'ensemble des composés. Les derniers paramètres à considérer sont ceux de la source TurboV pour optimiser l'efficacité de l'ionisation electrospray.

III. Optimisation des conditions d'ionisation de la source TurboV

La méthode développée concernant une analyse multi-résidus, les paramètres de la source 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 phase mobile. Ainsi, à un débit de 1 $mL.min^{-1}$, une température minimale de 550 °C est nécessaire pour évaporer efficacement l'éluant au cours du gradient d'élution. En effet, en dessous de cette température, des gouttelettes apparaissent sur la curtain plate, preuve d'une désolvatation incomplète. Elle est notamment observée lorsque le ratio de phases mobiles est de 50/50 (H_2O/MeOH), ce qui constitue les conditions les plus défavorables à la désolvatation.

L'effet de la température a été testé sur un mélange de 235 pesticides à une concentration de 10 $\mu g.L^{-1}$ analysés en mode ESI+. Cinq températures ont ainsi été testées : 550, 600, 650, 700 et 750 °C. Les molécules ont été réparties en deux groupes (A et B) selon que les aires des pics chromatographiques étaient inférieures (groupe A), ou strictement supérieures (groupe B) aux aires de références obtenues pour la température de 550 °C.

Groupe A (177 pesticides)				Groupe B (58 pesticides)	
Abamectine	Deltaméhtrine	Isoxaflutol	Pirimicarbe desméthyl	Acibenzolar-S-methyl	Pyriproxyfen
Acéphate	Desmédipham	Krésoxim méthyl	Pirimiphos-éthyl	Aclonifen	Quinoclamine
Acétamipride	Diallate	Lénacile	Prochloraz	Amidosulfuron	Quinoxyfen
Acrinathrine	Diazinon	Linuron	Prometryn	Azaconazole	Rimsulfuron
Alachlore	Dichlofluanid	Malaoxon	Propachlore	Benalaxyl	Roténone
Aldicarbe	Dichlorvos	Malathion	Propaquizafop	Bromacil	Tébufenpyrade
Aldicarbe sulfone	Diclofop-methyl	Mépanipyrim	Propargite	Bupirimate	Tétraconazole
Aldicarbe sulfoxyde	Diéthofencarb	Mépronil	Propazine	Butraline	Thiophanate méthyl
Amétryn	Dimétachlor	Métazachlore	Propiconazole	Chlorpyrifios	Tolclofos méthyl
Amitraz	Diméthénamid	Méthabenzthiazuron	Propoxur	Chlorpyrifos methyl	Triallate
Atrazine	Diméthoate	Méthamidophos	Prosulfocarbe	Clofentezine	Trifloxystrobine
Azimphos-methyl	Diméthomorph	Méthidathion	Pymetrozine	Coumaphos	Trisulfuron méthyl
Azoxystrobine	Diniconazole	Méthiocarbe	Pyraclostrobine	Difénoconazole	Triticonazole
Bendiocarbe	Diphénylamine	Méthiocarbe sulfone	Pyridaben	Diflufénican	
Benfuracarbe	Disulfoton	Méthiocarbe sulfoxide	Pyridafenthion	Etoxazole	
Bénomyl	Diuron	Méthomyl	Pyridate	Fénamiphos	
Bénoxacore	Epoxyconazole	Méthoxyfenozid	Pyriméthanil	Fénarimol	
Bifénazate	Esfenvalerate	Métobromuron	Quinalphos	Fénazaquin	
Bifenthrine	Ethion (diethion)	Métolachlor	Quizalofop-p-ethyl	Fenbuconazole	
Bitertanol	Ethofumesate	Métoxuron	Resméthrin	Fenpropimorphe	
Boscalid	Ethoprophos	Métrafenone	Séthoxydim	Fenthion	
Buprofézine	Etofenprox	Métribuzine	Simazine	Flazasulfuron	
Carbaryl	Famoxadone	Mévinphos	Spinosad	Fluazifop-p-butyl	
Carbendazime	Fénamidone	Molinate	Spiroxamine	Fluquinconazole	
Carbétamide	Fenhexamid	Monocrotophos	Sulfosulfuron	Furochloridone	
Carbofuran-3 OH	Fenoxycarbe	Napropamide	Sulfotep	Flusilazole	
Carbofuran	Fenpyroxymate	Norflurazon	tau-fluvalinate	Fonofos	
Carbosulfan	Fenthion sulfone	Nuarimol	Tébuconazole	Formétanate	
Carboxin	Fenthion sulfoxide	Ométhoate	Tébufenozide	Hexythiazox	
Carfentrazone éthyle	Fipronil	Oxadiazon	Terbufos	Imidachlorpride	
Cartap Hydrochloride	Flucythrinate	Oxamyl	Terbuthylazine	Iprodione	
Chlorfenvinphos	Flufénacet	Oxycarboxin	Terbutryn	Lufénuron	
Chloridazone	Flufénoxuron	Oxyfluorfène	Thiabendazole	Méfénoxam	
Chlorotoluron	Flutolanil	Penconazole	Thiachlopride	Mésosulfuron methyl	
Chlorpropham	Flutriafol	Pendiméthaline	Thiametoxam	Métamitrone	
Clomazone	Fosthiazate	Perméthrin	Thiodicarbe	Metconazole	
Clopyralid	Furathiocarb	Phenmédipham	Tolyfluanide	Myclobutanil	
Cyanazine	Hepténophos	Phenthoate	Triadimefon	Paclobutrazol	
Cyazofamide	Hexaconazole	Phorate	Triadimenol	Paraoxon methyl	
Cycloxydime	Hexazinone	Phosalone	Trichlorfon	Parathion éthyl	
Cymoxanil	Imazalil	Phosmet	Vamidothion	Pencyuron	
Cyperméthrine	Indoxacarbe	Phosphamidon	Zoxamide	Pirimiphos méthyl	
Cyproconazole	Iprovalicarbe	Picolanifen		Propyzamide	
Cyromazine	Isoproturon	Piperonyl butoxide		Prosulfuron	
Daminozide	Isoxaben	Pirimicarbe		Prothiofos	

Tableau 13. Répartition de 235 pesticides selon que leur intensité diminue (Groupe A) ou augmente (Groupe B) avec l'élévation de la température de la source

Sur les 235 pesticides présentés dans le Tableau 13, 58 admettent une augmentation de leur intensité avec une élévation de la température (Groupe B), les plus significatives étant observées pour le difluénican et l'iprodione (Figure 64).

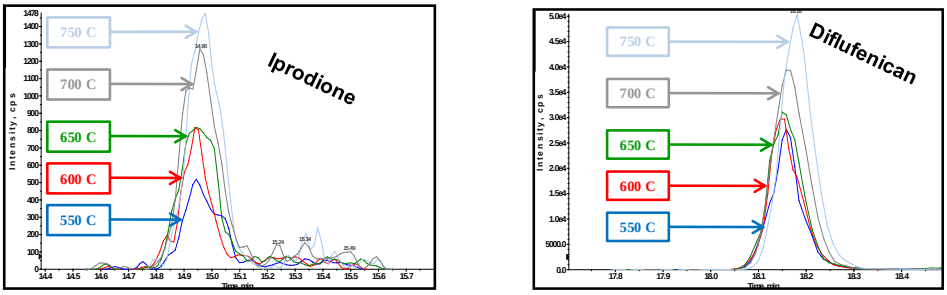


Figure 64. Mise en évidence de l'influence positive de la température de source sur la sensibilité de l'iprodione et du diflufenican

Comme illustrée dans la Figure 64, l'application d'une température de 750 °C au lieu de 550 °C permet d'améliorer l'intensité du signal du diflufenican et de l'iprodione d'environ un facteur deux. Néanmois, bien qu'une amélioration significative soit constatée pour 58 substances actives, l'application d'une température supérieure à 550 °C entraîne la dégradation d'une majorité des composés (Tableau 13 : Groupe A) à l'image de l'aldicarbe et de la bifenthrine (Figure 65).

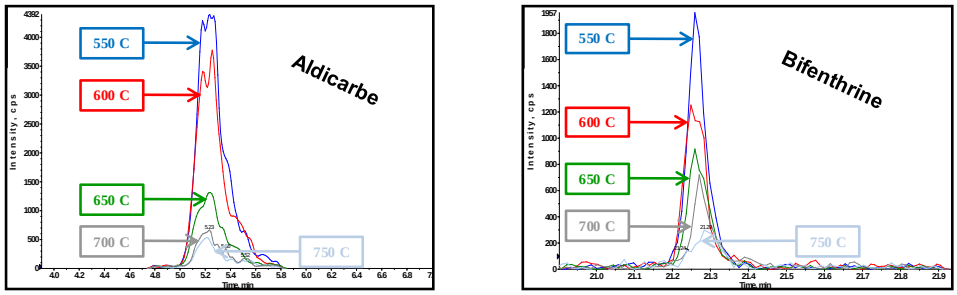


Figure 65. ***Mise en évidence de l'influence négative de la température de source sur la sensibilité de l'aldicarbe et de la bifenthrine***

Au vu des résultats de cette expérience, il s'avère que le meilleur compromis en termes de température de désolvatation pour l'analyse multi-résidus de pesticides est 550 °C. L'ensemble des paramètres de la source TurboV sont résumés dans le Tableau 14 :

Profondeur de l'électrode	2 mm
Curtain gas (gaz rideau)	35 psi
Ionspray voltage (tension du capillaire)	5500 V (ESI+) / -4500 V (ESI-)
Température	550 °C
Gaz 1 (gaz de nébullisation)	40 psi
Gaz 2 (gaz de désolvatation)	50 psi

Tableau 14. ***Paramètres de la source TurboV***

Avec l'étude des conditions d'ionisation de la source TurboV, tous les paramètres de détection et de séparation ont été définis pour optimiser la sensibilité de la méthode multi-résidus. Dans ces conditions, l'intérêt d'utiliser le mode Scheduled SRM a été évalué par rapport au mode SRM classique.

D) Les performances du mode Scheduled SRM pour l'analyse multi-résidus LC-ESI/SRM de 242 pesticides

Le scheduled SRM est un mode d'acquisition SRM dont le principe consiste à enregistrer les transitions SRM seulement si nécessaire. Comparé au mode SRM classique, le scheduled SRM permet de diminuer le nombre de SRMs concurrentes conduisant à un dwell time optimal pour chaque transition qui doit se traduire, normalement, par une amélioration générale de la qualité du signal. Après avoir déterminé les paramètres du sSRM dans les conditions chromatographiques définies précédemment, les performances de ce mode ont été évaluées en comparant les résultats obtenus pour un mélange de 242 pesticides par rapport au mode SRM classique.[258]

I. Protocole Expérimental

Les paramètres du mode scheduled SRM à déterminer sont les temps de rétention des pesticides, la fenêtre de détection (MRM detection window) et le temps de cycle (TST).

La fenêtre de détection est fixée à partir du pesticide présentant le pic chromatographique le plus large. Avec les conditions décrites précédemment, il est obtenu pour les molécules de dimétachlore et iprovalicarbe qui, à une concentration de 25 µg.L^{-1}, présentent des pics chromatographiques de l'ordre de 50 s (Figure 66).

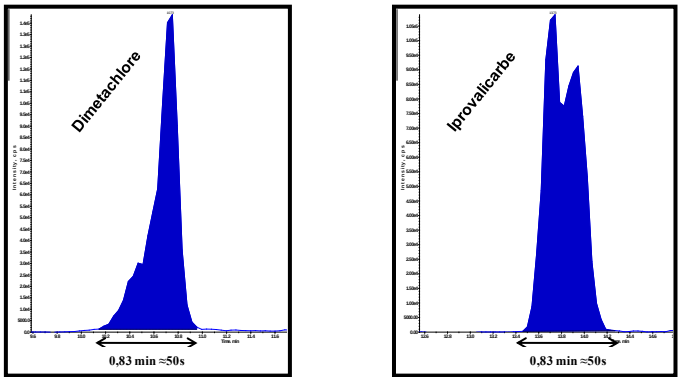


Figure 66. Pics chromatographiques des deux pesticides présentant la durée d'élution la plus longue

La fenêtre de détection a donc été fixée à 60 s pour tenir compte d'une augmentation de la largeur du pic chromatographique en fonction de la concentration, de même que pour avoir une marge de sécurité par rapport aux légères variations du temps de rétention pouvant être observées en chromatographie.

Le second paramètre est le target scan time ou temps de cycle. Il se détermine par rapport au pic chromatographique le plus fin qui, dans notre cas, est de l'ordre de 14 s (chlorpyrifos : Figure 67).

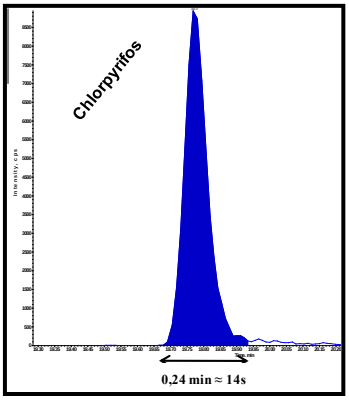


Figure 67. Pic chromatographique du chlorpyrifos dont le temps d'élution est le plus court (14 s)

En fixant le TST à 1,3 s, tous les pics devraient normalement être définis par au moins 10 points de données. Dans le but d'évaluer les performances du scheduled SRM avec ces paramètres, trois méthodes d'acquisition ont été créées.

La première méthode « SRM 242 » a été construite en mode SRM classique avec la première transition de chaque pesticide, soit 242 SRMs (nombre de transitions limité par le logiciel à 300). Le dwell time par transition a été fixé à 5 ms, avec un temps de pause de 5 ms également, conduisant à un duty cycle de 10 ms (84) et donc un temps de cycle de 2,42 s (85). La deuxième méthode « sSRM 242 » a été élaborée en mode sSRM avec les mêmes 242 transitions que la méthode classique, dans le but de comparer directement les performances de ces deux modes. Enfin, une troisième méthode « sSRM 483 » a été créée en mode sSRM et inclut 483 transitions SRM, correspondant aux transitions 1 et 2 des 242 pesticides (l'isoxaflutole ne dispose que d'une seule transition). L'objectif de cette méthode est d'évaluer l'effet provoqué par l'augmentation du nombre de transitions sur les performances du scheduled SRM.

Dans le but d'évaluer les méthodes d'acquisitions en termes de repétabilité et de sensibilité, un mélange de 242 pesticides, préparé dans du méthanol acidifié avec 1% d'acide acétique à une concentration de 25 $\mu g.L^{-1}$, a été injecté à dix reprises avec chaque méthode d'acquisition.

II. Résultats et discussion

La Figure 68 illustre le nombre de transitions SRM concurrentes enregistrées au cours du gradient d'élution pour les trois méthodes d'acquisition.

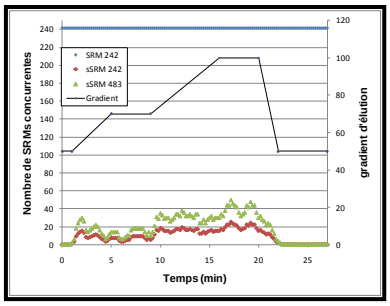


Figure 68. Nombre de transitions SRM concurrentes en fonction de la méthode d'acquisition et du temps

Cette figure souligne une réduction considérable du nombre de SRMs concurrente avec l'emploi du mode scheduled SRM. Alors qu'avec le mode classique, 242 SRMs doivent être scannées sur toute la durée de l'analyse, avec le mode scheduled, le nombre maximum de SRMs concurrentes n'excède pas 50 à 19,2 min avec la méthode « sSRM 483 » (25 avec « sSRM 242 »).

L'acquisition simultanée de moins de transitions SRM en mode sSRM permet au spectromètre de masse de passer plus de temps sur chaque transition sans impacter le temps de cycle assurant, ainsi, la création de suffisamment de points de données. Le Tableau 15 montre le nombre de points par pic obtenus pour 18 pesticides avec les trois méthodes d'acquisition. Signalons que les pesticides sélectionnés dans ce tableau sont connus pour leur faible sensibilité en LC-MS/MS.[20,33]

		Nombre de points par pic			CV (%)			S/N				
Pesticide	**t_R (min)**	**MRM 242**	**sSRM 242**	**sSRM 483**	**MRM 242**	**sSRM 242**	**sSRM 483**	**MRM 242**	**sSRM 242**		**sSRM 483**	
								S/N	**S/N**	**Facteur d'amélioration**	**S/N**	**Facteur d'amélioration**
Cartap hydrochloride	1,5	7	22	21	11,0	3,9	7,1	47	210	4,5	129	2,7
Daminozide	1,7	10	29	29	9,7	2,6	3,2	37	88	2,4	80	2,2
Acetamipride	3,3	13	42	42	5,2	3,1	3,4	1208	6028	5,0	4610	3,8
Quinoclamine	7,04	13	46	42	8,9	3,9	4,5	49	271	5,5	169	3,4
Dichlorvos	7,75	10	37	37	22,2	9,4	5,5	58	175	3,0	109	1,9
Flutriafol	9,62	8	23	23	16,6	1,8	2,8	246	884	3,6	549	2,2
Bénoxacore	11,2	9	33	27	13,6	7,1	3,6	124	380	3,1	260	2,1
Chlorpropham	13,,0	10	35	29	24,5	6,0	5,1	35	153	4,4	121	3,5
Pyrimethanil	13,34	13	41	38	13,0	3,4	3,6	92	175	1,9	173	1,9
Acibenzolar-S-méthyl	13,6	10	37	32	17,0	3,8	5,1	49	316	6,4	191	3,9
Iprodione	15,3	6	31	29	15,4	4,8	8,0	29	113	3,9	66	2,3
Parathion éthyl	16,2	6	29	27	23,1	8,6	3,9	57	282	4,9	217	3,8
Aclonifen	16,6	4	22	20	30,2	8,5	9,6	20	97	4,9	71	3,6
Fenthion	16,88	8	26	20	13,9	3,5	4,2	45	245	5,4	175	3,9
Fonofos	17	7	29	24	11,1	3,4	5,6	61	200	3,3	128	2,1
Phorate	17,5	7	23	23	15,8	3,6	7,4	41	211	5,1	184	4,5
Diphénylamine	17,79	11	43	36	12,4	2,8	4,4	25	111	4,4	81	3,2
Triallate	19,91	8	26	20	28,2	4,8	9,0	41	170	4,1	142	3,5

Tableau 15. Comparaison des trois méthodes d'acquisition SRM 242, sSRM 242 et sSRM 483 en termes de nombre de points par pic, coefficient de variation (CV % ; n=10) des aires des pics chromatographiques et rapport signal sur bruit (S/N)

La différence entre les deux modes d'acquisition est évidente puisque, en moyenne, trois fois plus de points sont acquis avec le mode sSRM. Par exemple, avec le sSRM, un pic chromatographique contenant 23 points est obtenu pour le flutriafol alors que 8 points seulement sont créés avec le mode SRM classique. Ces différences, en termes de nombre de points de données et de duty cycle, ont une influence directe sur la répétabilité de l'analyse. Le Tableau 15 (colonne 2) et la Figure 69 présentent la répétabilité de l'analyse, exprimée par le coefficient de variation (CV) en % de l'aire des pics sur dix injections (n = 10).

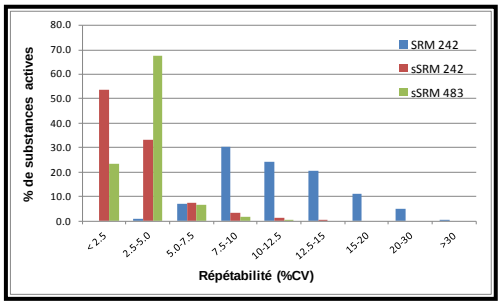


Figure 69. Répétabilité des méthodes d'acquisition SRM 242, sSRM 242 et sSRM 483

Comme l'illustre la Figure 69, les effets de l'emploi du mode sSRM sont très significatifs. Alors que seulement 40 % des transitions admettent un CV < 10 % avec le mode SRM classique, 98 % ont un CV < 10 % avec les deux méthodes sSRM dont environ 90 % donnent un CV < 5 %. Cette observation est confirmée par les résultats du Tableau 15 (colonne 2) où les méthodes sSRM permettent d'améliorer considérablement les CVs des composés les moins sensibles. L'emploi du sSRM permet en effet d'obtenir des CVs inférieurs à 10 % (généralement < 5 %) quand ils se situent entre 10 et 30 % avec le mode classique. La comparaison des deux méthodes sSRM met en évidence des CVs légèrement plus élevés avec la méthode sSRM 483. En effet, la majorité des CVs sont inférieurs à 2,5 % pour la méthode sSRM 242 alors qu'ils sont davantage situés entre 2,5 et 5 % avec la méthode sSRM 483.

En plus d'améliorer la répétabilité, le mode sSRM influe également sur le signal en termes d'intensité des aires. La Figure 70 montre la comparaison de la variation du signal obtenue entre chaque méthode sSRM et la méthode classique (SRM 242).

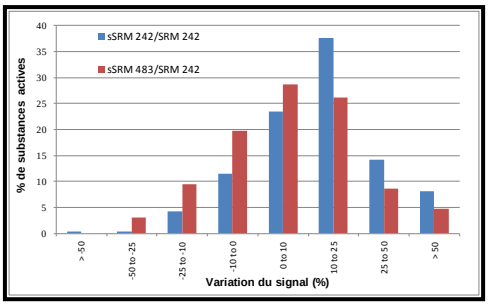


Figure 70. Variation de l'intensité du signal entre les méthodes sSRM et la méthode classique SRM

Une augmentation de l'intensité du signal est observée pour respectivement 85 % et 75 % des transitions des méthodes sSRM 242 et sSRM 483. Le mode scheduled SRM a donc un effet positif significatif sur la réponse des transitions. Cependant, une amélioration de l'intensité du signal ne signifie pas toujours une augmentation de la sensibilité définie comme le rapport S/N.

La colonne 3 du Tableau 15 regroupe les S/N obtenus avec les trois méthodes d'acquisition et le facteur d'amélioration entre les méthodes sSRM et SRM. L'algorithme scheduled conduit à l'amélioration du S/N d'un facteur 1,9 minimum (pyriméthanil avec sSRM 242 et 483) et jusqu'à un facteur 6,4 (acibenzolar-S-méthyl avec sSRM 242). La hausse du rapport S/N est toutefois moins importante lorsque le nombre de transitions est doublé. En effet, une différence significative, pouvant atteindre 40 %, est observée entre les deux méthodes sSRM dans le cas du cartap hydrocloride et du fonofos. Cette observation peut être expliquée par deux hypothèses. En premier lieu, la transition ajoutée dans la méthode sSRM 483 correspond à la transition de confirmation du pesticide. Son acquisition s'effectue donc dans la même fenêtre de détection que la première, ce qui conduit à une division théorique du dwell time par deux. Ensuite, les deux transitions sont générées à partir d'un même ion précurseur provoquant une augmentation du signal moins importante (Figure 70) et donc une différence en termes de rapport S/N.

L'amélioration de la qualité des données acquises due à l'emploi du mode sSRM est illustrée par la Figure 71 qui présente les chromatogrammes obtenus pour le chlorpropham et l'aclonifen avec les trois méthodes d'acquisition, lors de la cinquième injection.

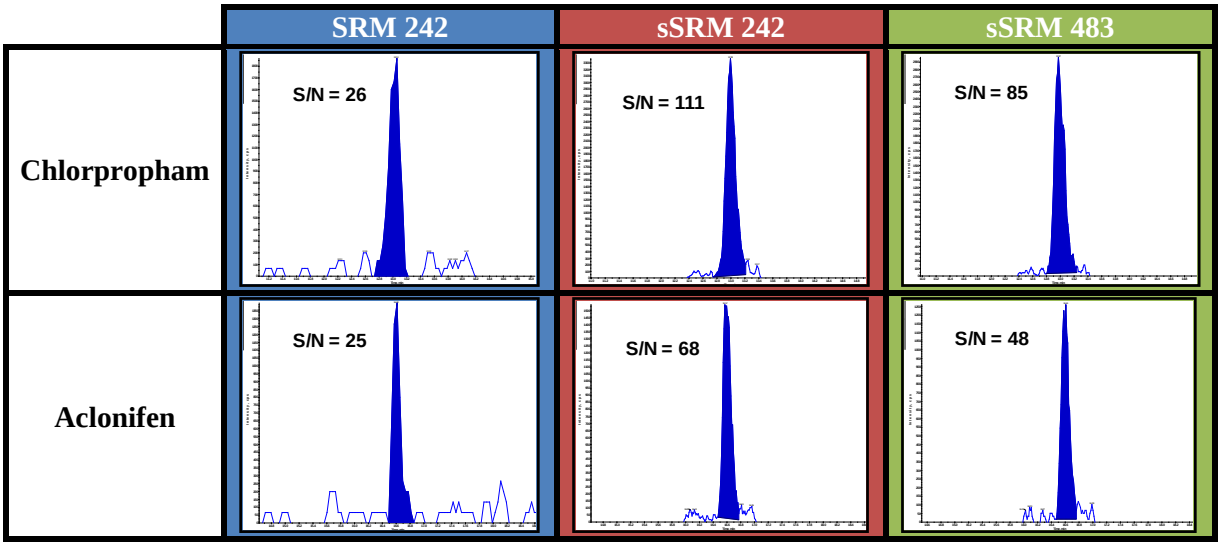


Figure 71. Comparaison des pics LC du chlorpropham et de l'aclonifen obtenus avec les modes SRM et sSRM

Les deux pesticides dévoilent des pics LC de meilleures formes, avec plus de points par pic, un signal plus intense et des rapports S/N plus élevés en sSRM qu'en SRM. A noter qu'aucun signal n'est enregistré en dehors de la fenêtre de détection ($t_{Ranalyte}$ ± 0,5 min) en sSRM.

III. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence la facilité d'utilisation et l'intérêt du nouveau mode d'acquisition scheduled SRM pour l'analyse en routine de pesticides par LC-MS/MS. Les conditions d'utilisation du sSRM sont un bon contrôle de la chromatographie qui doit donner des temps de rétention répétables et des pics relativement fins pour les analytes. En combinant le temps de rétention de l'analyte ($t_{Ranalyte}$) avec une fenêtre de détection SRM et un target scan time (*e.g.* temps de cycle), le logiciel construit automatiquement une méthode d'acquisition qui enregistre seulement les transitions à l'intérieur de cette fenêtre de temps.

Comparé avec le mode SRM classique, le sSRM offre des performances nettement meilleures en termes de répétabilité (CV généralement inférieur à 5 %), d'intensité du signal et de rapport S/N, même quand le nombre de transitions SRM est doublé. De plus, en contrôlant le temps de cycle (TST), l'opérateur s'assure que suffisamment de points de données sont acquis pour définir correctement le pic chromatographique. L'amélioration du S/N est significative pour l'ensemble des composés, variant d'un facteur 2 à 6,4 pour les pesticides étudiés. Etant donné que le rapport S/N définit les limites de quantification, cela signifie que le scheduled SRM autorise de descendre les limites de quantification pour tous les composés d'un facteur au moins égal à deux, voire supérieur en fonction du pesticide considéré.

Chapitre IV

Application de la Méthode LC-ESI/sSRM à la Recherche de Pesticides dans des Huiles Essentielles Surchargées

La mise au point de la méthode d'analyse LC-ESI/sSRM dans le chapitre précédent a été réalisée à partir de pesticides directement introduits dans le solvant d'injection HPLC. Il est maintenant nécessaire de l'adapter aux cas de la détection de pesticides dans des huiles essentielles suchargées.

Ce chapitre, composé de trois parties, s'intéresse dans un premier temps à rechercher la méthode de préparation des huiles essentielles la plus adaptée. Après avoir modifié les conditions d'injection en conséquence pour appliquer la méthode LC-ESI/sSRM à l'analyse d'une huile essentielle de lavandin surchargée en pesticides dans une seconde partie, ce chapitre se conclura par l'étude de l'huile essentielle de citron, représentative des problèmes rencontrés lors de l'application de la méthode à l'analyse de pesticides dans des huiles essentielles d'hespéridés.

A) Prétraitement d'huiles essentielles surchargées et son effet sur la quantification

L'étude bibliographique a mis en évidence que la méthode de préparation, *a priori* la plus adaptée, à l'analyse des pesticides dans les huiles essentielles est une simple dilution de l'extrait suivie d'une injection directe. Toutefois, étant donné que la littérature dans ce domaine est relativement limitée, il convenait de tester dans un premier temps la faisabilité de plusieurs approches avant de sélectionner la plus prometteuse. Ainsi différents protocoles ont été mis en place pour évaluer l'efficacité de l'extraction sur phase solide, de la méthode QuEChERS et de la dilution.

Il convient de préciser ici que le nombre de pesticides étudiés au cours de cette partie peut varier d'une expérience à l'autre, ceci étant lié à la préparation des mélanges de pesticides qui dépendaient de la disponibilité et de la stabilité des items de référence au moment de l'étude. Cependant, les mélanges de pesticides étudiés sont toujours représentatifs d'une large gamme de polarité et d'acidité.

I. Extraction sur phase solide (SPE)

Deux cartouches SPE de phases adsorbantes différentes, l'Oasis HLB et la MegaBond Elute C18, ont été testées. La première est un macropolymère [poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)] qui allie des caractéristiques de rétention lipophiles grâce au divinylbenzène et hydrophiles grâce au N-vinylpyrrolidone. L'Oasis HLB semblait donc adaptée à la large gamme de polarités des substances actives étudiées.

La MegaBond Elute C18 est une cartouche plus classique présentant une phase adsorbante composée de silice greffée avec des ligands octadécyl.

I.1 Extraction sur Oasis HLB 500 mg

L'extraction sur Oasis HLB 500 mg a été testée au travers d'une prise d'essai constituée d'un volume de 500 µL d'huile essentielle de citron surchargée à 50 $\mu g.L^{-1}$ de pesticides. Cette surcharge est réalisée en mélangeant 475 µL d'huile essentielle de citron avec 25 µL d'une solution de mélange de pesticides à 1 $mg.L^{-1}$. Deux protocoles ont ensuite été considérés selon que la cartouche subisse ou non un lavage préalablement à l'élution.

I.1.1. Protocole n° 1 : extraction SPE sans lavage

L'extraction sur cartouche SPE Oasis HLB 500 mg selon le protocole n°1 consiste en trois étapes. Dans un premier temps, la cartouche SPE est conditionnée avec 5 mL de CH_2Cl_2 et 5 mL d'hexane. Les 500 µL de prise d'essai sont ensuite déposés sur la cartouche avant de procéder, dans un dernier temps, à l'étape d'élution au moyen de trois fractions de 5 mL de CH_2Cl_2 qui sont récupérées dans 3 ballons distincts.

Les fractions d'élutions sont ensuite plongées dans un bain marie à 40 °C et évaporées sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif maintenu dans un premier temps à une pression de 630 mbar, avant de la diminuer progressivement.

L'évaporation de la 1ère fraction a conduit à la récupération des 500 µL d'huile essentielle dans le ballon, ce qui correspond à la totalité de la prise d'essai. Le protocole a donc été avorté.

I.1.2. Protocole n° 2 : extraction avec lavage

Le but de ce protocole est de laver la cartouche avec plusieurs volumes d'hexane pour éliminer les composants de l'huile essentielle avant d'éluer les pesticides avec du dichlorométhane.

L'extraction sur cartouche SPE Oasis HLB 500 mg selon le protocole n° 2 consiste en quatre étapes. Dans un premier temps, la cartouche SPE est conditionnée avec 5 mL de CH_2Cl_2 et 5 mL d'hexane. Les 500 µL de prise d'essai sont ensuite percolés sur la cartouche. La cartouche est alors lavée par des fractions successives de 500 µL d'hexane qui sont évaporées sous vide. L'évaporation a pu être conduite à sec pour les deux premières fractions, contrairement aux fractions trois et quatre pour lesquelles il reste un résidu de couleur jaune. L'évaporation a de nouveau pu être conduite à sec lors de la cinquième fraction. Le lavage ayant a priori éliminé les composés peu volatils de l'huile essentielle, l'étape d'élution a pu être effectuée au moyen de deux fractions de 5 mL de CH_2Cl_2 récupérées dans deux ballons distincts.

Les fractions d'élutions sont ensuite plongées dans un bain marie à 40 °C et évaporées sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif maintenu dans un premier temps à une pression de 630 mbar, avant de la diminuer progressivement.

Une fois évaporés à sec, les extraits ont été repris avec 1 mL de mélange MeOH/Eau (50/50). Les solutions ainsi obtenues sont légèrement troubles et des particules visqueuses

semblent se déposer sur les parois du ballon. Les solutions ont néanmoins été transférées dans des vials et injectées en LC-MS/MS avec un volume d'injection de 50 µL.

I.1.3. Résultats et discussion

La Figure 72 a) présente le chromatogramme d'un point de gamme solvant préparé à une concentration de 25 µg.L^{-1} (MeOH/Eau) et les chromatogrammes des deux fractions d'élution du protocole n° 2 (Figure 72 b) et c)).

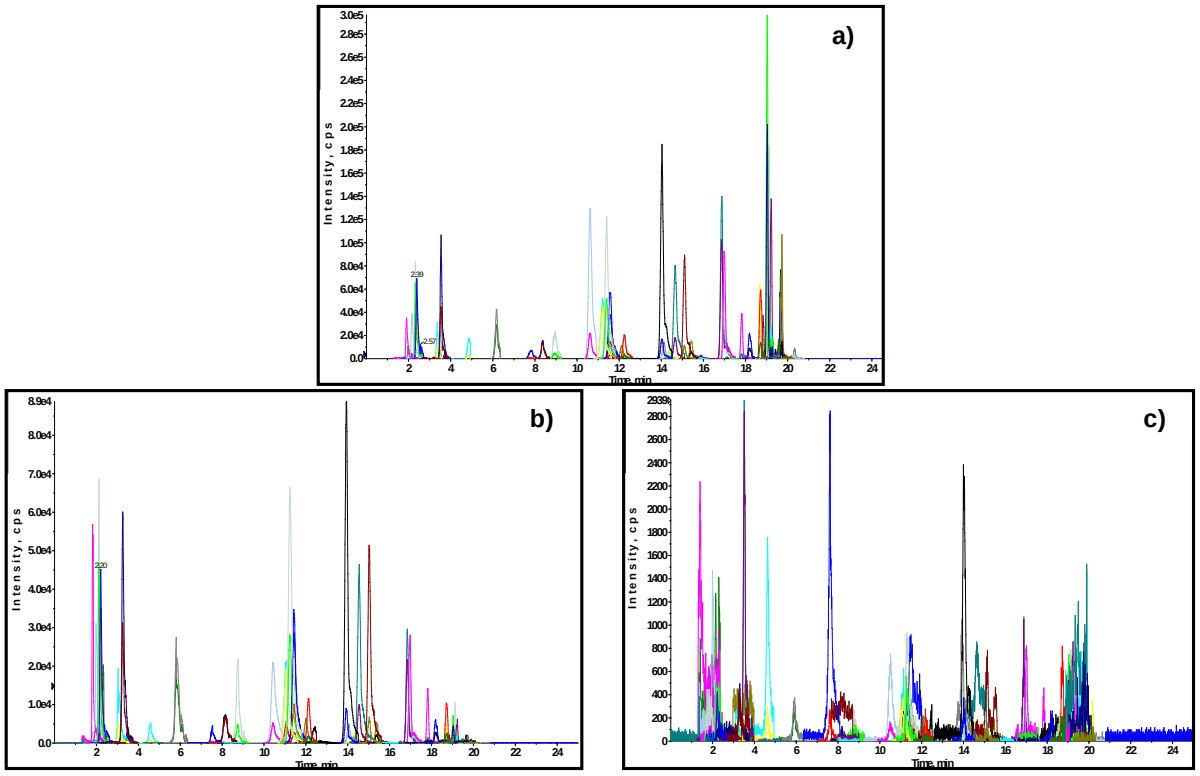


Figure 72. Chromatogrammes a)du point de gamme solvant à 25 µg.L^{-1} b) de la fraction d'élution n°1 et c)de la fraction d'élution n°2

Avec un **rapport d'extraction** (RE) égal à 0,5, la concentration finale en pesticides attendue dans les fractions d'élution devrait être de 25 µg.L^{-1}. Le rapport d'extraction est le rapport entre le volume de matrice ($V_{matrice}$) de la prise d'essai et le volume de solvant ($V_{solvant}$) dans lequel l'extrait final est repris en fin de manipulation.

$$RE = \frac{V_{matrice}\,(mL)}{V_{solvant}\,(mL)} \qquad (86)$$

D'un point de vue qualitatif, les chromatogrammes de la Figure 72 montrent que la majorité des composés sont récupérés dans la fraction n° 1. Toutefois les composés peu polaires, élués à la fin du gradient, ne sont pas récupérés efficacement. Ces observations sont confirmées par le calcul des taux de récupération présentés en Annexe 6. En revanche, ces

taux de récupération, étant calculés à partir du point de gamme solvant, ne prennent pas en considération les éventuels effets matrice, mais ils donnent cependant une bonne indication. Sur la cinquantaine de pesticides analysés, la moitié, majoritairement des pesticides peu polaires, admettent un taux de récupération inférieur à 30 % et six d'entre eux ne sont pas du tout détectés.

La faible récupération des composés apolaires peut s'expliquer par leur élution durant le lavage à l'hexane ou par leur plus grande affinité pour les résidus visqueux présents sur les parois du ballon.

I.2 Extraction sur MegaBond Elute C18 1g

Le but de ce protocole est de tester la cartouche MegaBond Elute C18 à travers un protocole déjà utilisé au laboratoire pour les matrices de composition apolaire.

I.2.1. Protocole expérimental

La prise d'essai est constituée d'un volume de 500 µL d'huile essentielle de citron surchargée à 50 µg.L^{-1} de pesticides. Cette surcharge est réalisée en mélangeant 475 µL d'huile essentielle de citron avec 25 µL d'une solution de mélange de pesticides à 1 mg.L^{-1}. Ces 500 µL sont ensuite dilués avec 1,5 mL d'acétonitrile, conduisant à un volume final d'échantillon de 2 mL.

L'extraction sur cartouche MegaBond Elute C18 consiste en trois étapes. Dans un premier temps, la cartouche SPE est conditionnée successivement avec 6 mL de méthanol, 6 mL d'eau et 6 mL d'acétonitrile. Les 2 mL d'échantillon sont ensuite déposés sur la cartouche. L'élution est alors réalisée au moyen de trois fractions de 5 mL d'un mélange ACN/Eau (25/5), puis de deux fractions de 5 mL d'acétonitrile. L'ensemble de ces fractions est collecté dans un ballon de 100 mL.

L'évaporation du solvant est effectuée sous pression continue avec une température du bain marie fixée à 40°C. Une fois le ballon à sec, les parois sont rincées avec 1 mL d'acétate d'éthyle qui est ensuite transféré dans un vial. Il faut noter qu'il reste, encore une fois, un faible volume de résidu gras de couleur jaune à la fin de l'évaporation.

Un aliquote de 400 µL est ensuite prélevé, évaporé à sec sous un faible flux d'azote, puis repris dans 400 µL de méthanol pour éviter le problème de solubilité rencontré en *I.1.2.*. L'extrait est finalement transféré dans un vial, puis injecté en LC-MS/MS avec un volume d'injection de 50 µL.

I.2.2. Résultats et discussion

La Figure 73 présente les chromatogrammes d'un point de gamme solvant préparé à une concentration de 50 µg.L^{-1} (MeOH) et du TR. Un point de quantification à 25 µg.L^{-1} aurait cependant été plus judicieux puisque la concentration attendue dans l'extrait est de 25 µg.L^{-1}. En effet, le RE est, comme dans l'expérience précédente, égal à 0,5.

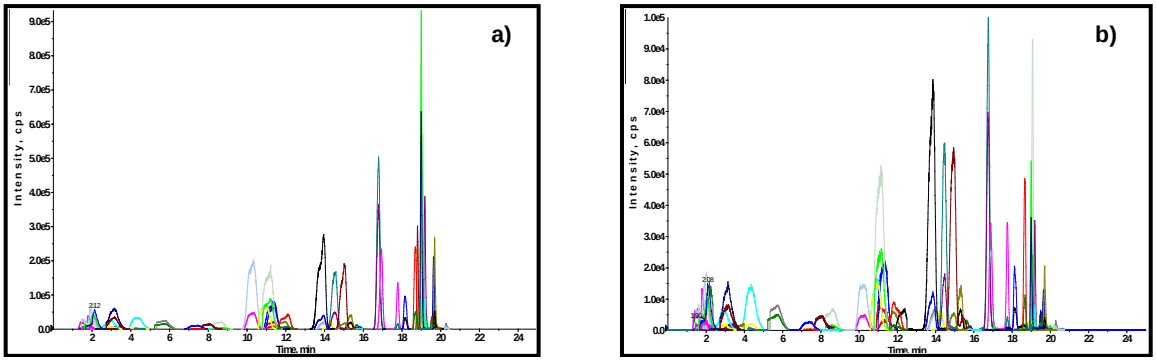


Figure 73. Chromatogrammes a)du point de gamme solvant à 50 µg.L^{-1} et b) du taux de récupération

La dégradation de la résolution des pics chromatographiques pour les composés peu et moyennement polaires est due à l'injection dans du MeOH pur avec un volume trop élevé. D'un point de vue qualitatif, l'observation des chromatogrammes ci-dessus semble montrer une meilleure récupération des composés apolaires que lors de l'expérience précédente. Cette supposition est confirmée par les taux de récupération présentés dans le Tableau 16.

Substance active	TR (%)	Substance active	TR (%)
Abamectine	47	Fluroxypyr	85
Acephate	64	Iprodione	59
Acétamipride	46	Isoproturon	52
Acibenzolar - S- méthyl	50	Isoxaben	63
Aclonifen	28	Lénacile	62
Amidosulfuron	63	Linuron	55
Azoxystrobine	52	Méfénoxam	54
Bifenthrine	39	Métamitron	48
Bromacil	48	Métazachlore	39
Butraline	16	Méthomyl	52
Carbaryl	61	Monocrotophos	49
Carbendazime	77	Napropamide	32
Carbétamide	59	Norflurazon	39
Chlopyralid	82	Oxadiazon	10
Chloridazone	55	Oxyfluorfene	41
Chlorpyrifos	27	Pendiméthaline	14
Cycloxydime	3	Pirimicarbe	15
Cyhalothrine (lambda)	40	Prometryn	35
Cyromazine	9	Propiconazole	44
Deltaméthrine	38	Propyzamide	61
Difénoconazole	35	Prosulfocarbe	31
Diflufénicanil	1	Pymetrozin	53
Dimethenamid	55	Quizalofop-p-ethyl	16
Dimethoate	47	Simazine	55
Diuron	47	Sulfosulfuron	35
Ethofumesate	52	Tau-fluvalinate	21
Fluazifop-p-butyl	12	Tebuconazole	47
Flurochloridone	42		

Tableau 16. Taux de récupération des substances actives obtenus lors de l'extraction sur la cartouche SPE MegaBond Elute

Le Tableau 16 indique que l'ensemble des substances actives ont été détectées. En revanche certaines admettent des TR extrêmement faibles, inférieur à 10 % (cycloxidime, cyromazime, diflufenican). Les autres composés ont des rendements compris entre 12 % (fluazifop-p) et 85 % (fluroxypyr). Les TRs sont ici, comme lors de l'expérience précédente, des estimations puisqu'ils ont été calculés à partir d'un point solvant.

I.3 Conclusion

La mise en place d'une méthode d'extraction en phase solide apparaît relativement compliquée dans le cadre d'une analyse multi-résidus comportant un grand nombre de substances actives. Certaines substances actives admettent en effet des taux de récupération très faibles. Le taux de récupération du diflufenican a, ainsi, été évalué à environ 1 %. Ceci n'est pas encourageant si l'on envisage d'élargir la méthode à un nombre plus conséquent de substances actives. De plus, il faut savoir que des essais complémentaires, réalisés sur l'huile essentielle de lavandin, ont montré que la quasi-totalité de l'huile essentielle était récupérée à l'issue de l'évaporation sous vide. De ce fait, la méthode de préparation SPE, éventuellement applicable à l'huile essentielle de citron, ne le serait pas à celle de lavandin. Pour rappel, l'objectif du projet est de proposer une méthode d'analyse polyvalente capable d'analyser un grand nombre de substances actives mais qui soit également applicable à diverses huiles essentielles.

II. Purification SPE dispersive : la méthode QuEChERS

Les essais de purification par SPE dispersive sont basés sur la méthode normalisée QuEChERS.[30] La QuEChERS est une méthode d'analyse multi-résidus de pesticides dans les aliments d'origine végétale tels que les fruits, les légumes, les céréales, ainsi que leurs produits dérivés. Le principe consiste à extraire les pesticides avec de l'acétonitrile mélangé éventuellement à de l'eau, chlorure de sodium et sels de citrate tampons. Un aliquot de la phase organique est ensuite prélevé et purifié par SPE dispersive, à l'aide d'adsorbants en vrac type PSA (Primary Secondary Amino) et de sulfate de magnésium pour retirer l'eau résiduelle. Les extraits sont ensuite acidifiés afin d'améliorer la stabilité et le stockage de certains pesticides sensibles aux bases.

Les expériences présentées ci-après ne concernent que la partie purification par SPE dispersive. En effet, l'extraction des pesticides de l'huile essentielle de lavandin avec l'acétonitrile ne peut être mise en place du fait de la solubilité de l'huile essentielle dans ce

solvant. Avant d'envisager la poursuite de la mise en place d'un tel protocole, nous avons décidé d'évaluer l'efficacité de la purification de la SPE dispersive.

II.1 Blancs de purification

Deux phases adsorbantes ont été testées lors de ces essais, le PSA et un mélange de PSA/C18. Il faut signaler que le mélange PSA/CA (charbon actif), couramment utilisé dans la méthode QuEChERS, a été écarté volontairement. En effet, le charbon actif est connu pour adsorber les composés possédant une structure planaire.

Le contact avec le PSA engendre une augmentation de *pH* jusqu'à une valeur environ égale à 8, ce qui compromet la stabilité de certains pesticides. Il est donc conseillé d'acidifier l'extrait après la purification. Plusieurs taux d'acide acétique (0, 0,05, 0,1, 0,5%) ont donc été testés avec une application pré et post purification pour en évaluer l'influence.

II.1.1. Protocole expérimental

Le protocole général de purification commence par l'introduction de 1 mL d'extrait dans un tube contenant soit :

- 150 mg $MgSO_4$ + 50 mg PSA (tube PSA) ;
- 150 mg $MgSO_4$ + 50 mg PSA + 50 mg C18 (tube PSA/C18) ;

Les tubes sont agités pendant une minute au vortex, puis centrifugés pendant 2 minutes à 3000 rpm. 500 µL de surnageant sont ensuite prélevés et injectés (V_{inj} = 50 µL) en LC-MS/MS avec ajout préalable ou non d'acide acétique.

Quatre points de gamme, pour autant de taux d'acides, sont préparés à une concentration de 50 $\mu g.L^{-1}$ pour quantifier les taux de récupération des pesticides :

- G1 : 50 $\mu g.L^{-1}$ dans l'ACN ;
- G2 : 50 $\mu g.L^{-1}$ dans l'ACN acidifié à 0,05 % ;
- G3 : 50 $\mu g.L^{-1}$ dans l'ACN acidifié à 0,1 % ;
- G4 : 50 $\mu g.L^{-1}$ dans l'ACN acidifié à 0,5 %.

Six blancs de purification ont été réalisés pour chaque phase adsorbante avec deux répétats chacun. Cette procédure est illustrée dans la Figure 74. Les blancs ont tous été analysés en mode ESI+ et ESI-.

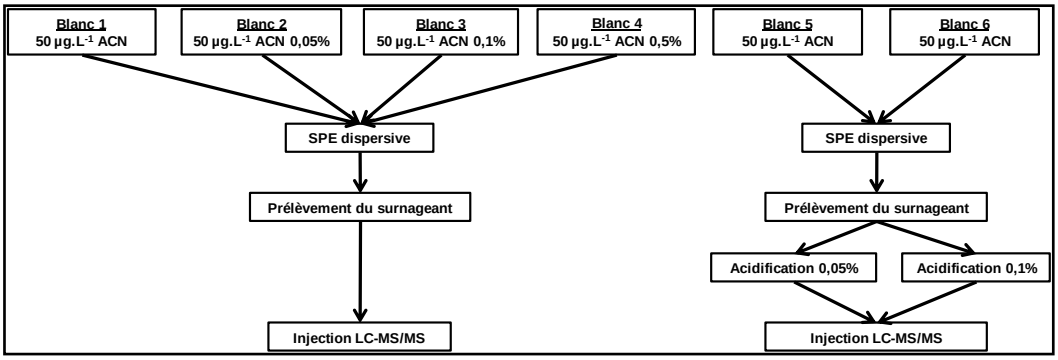


Figure 74. Schéma du protocole relatif aux blancs de purification par SPE dispersive

II.1.2. Résultats

Le Tableau 17 regroupe l'ensemble des résultats obtenus pour les substances actives analysées en ESI+ lors de cette expérience. En effet, il n'a pas été jugé utile d'inclure dans ce tableau les molécules analysées en ESI- dont les taux de récupération ne dépassent pas 10 % dans le meilleur des cas, c'est-à-dire lorsque les extraits sont acidifiés à hauteur de 0,5 % d'acide acétique.

Substance active	TR (%)	Phase la plus adaptée	Taux d'acide	Remarque
Abamectine	~50	PSA seul		Il semble que l'acidification joue sur la stabilité
Acephate	90-100	Les deux	0,1 %	
Acetamipride	90-100	Les deux	/	
Acibenzolar-S- methyl	90-100	Les deux	/	
Aclonifen	90-100	Les deux	/	
Amidosulfuron	variable		0.5 %	Seulement recupéré en présence d'acide
Azoxystrobine	90-100	Les deux	/	
Bifenthrine	90-100	Les deux	/	
Bromacil	90-100	PSA seul	/	
Butraline	90-100	Les deux	/	
Carbaryl	90-100	Les deux	/	
Carbendazime	100	PSA seul		
Carbetamide	90-100	Les deux	/	
Chlopyralid	Non récupéré			
Chloridazone	90-100	Les deux	/	
Chlorpyrifos	90-100	Les deux	/	
Cycloxidime	20-100	PSA seul	0.5 % post SPE	TR = 100% avec les deux phases pour les blancs 4
Cyhalothrine (λ)	90-100	Les deux		
Deltamethrine	90-100	Les deux	/	
Difenoconazole	90-100	Les deux	/	
Diflufenican	90-100	Les deux	/	
Dimethanamide	90-100	Les deux	/	
Dimethoate	90-100	Les deux	/	
Diuron	90-100	Les deux	0,1 %	
Ethofumesate	90-100	Les deux	/	
Fluazifop-p-butyl	90-100	Les deux	/	
Flurochloridone	90-100	Les deux	/	
Fluroxypyr	Jusqu'à 70	PSA+C18	0,1 % post SPE	
Iprodione	90-100	Les deux	/	
Isoproturon	90-100	Les deux	/	
Isoxaben	90-100	Les deux	/	
Lenacile	90-100	PSA seul	/	
Linuron	90-100	Les deux	/	
Mefenoxam	90-100	Les deux	/	
Metamitrone	90-100	Les deux	/	

Substance active	TR (%)	Phase la plus adaptée	Taux d'acide	Remarque
Metazachlore	90-100	Les deux	/	
Methomyl	90-100	Les deux	/	
Monocrotophos	90-100	Les deux	/	
Napropamide	90-100	Les deux	/	
Norflurazon	90-100	Les deux	/	
Oxadiazon	90-100	Les deux	/	
Pendimethaline	90-100	Les deux	/	
Pirimicarbe	90-100	PSA seul	/	TR ≈ 70 % avec C18
Procymidon	90-100	Les deux	/	
Prometryn	90-100	PSA seul	/	TR inférieur avec C18
Propiconazole	90-100	Les deux	/	
Propyzamide	90-100	Les deux	/	
Prosulfocarbe	90-100	Les deux	/	
Pymetrozin	15-35	PSA seul	0,1 %	TR inférieur avec C18 Meilleur TR avec acidification post SPE
Quizalofop-p-ethyl	90-100	Les deux	/	
Simazine	90-100	Les deux	/	
Sulfosulfuron	10	Les deux		Légèrement récupéré avec 0,5 % d'acide
Tau-fluvalinate	90-100	Les deux	/	
Tebuconazole	90-100	PSA seul	/	TR inférieur avec C18

Tableau 17. Résultats des blancs de purification par SPE dispersive pour les substances actives détectées en mode ESI+

Si la majorité des pesticides du Tableau 17 admettent un taux de récupération supérieur à 90 %, cette purification montre tout de même des limitations avec des pertes importantes pour les composés sensibles au pH (acides et bases). La méthode QuEChERS prévoit effectivement une injection pré-purification pour l'analyse des composés acides.

Avant de rechercher des conditions de purification plus optimales avec notamment l'optimisation des masses d'adsorbants, l'impact de cette purification a été évalué sur l'huile essentielle de lavandin avec l'utilisation de la phase adsorbante PSA qui apparaît, compte tenu du Tableau 17, plus adaptée.

II.2 Evaluation de la purification sur l'huile essentielle de lavandin

L'influence de la SPE dispersive a été évaluée en comparant l'évolution du rapport S/N entre, une huile essentielle de lavandin diluée purifiée, et non purifiée sur PSA, selon le protocole illustré par la Figure 75.

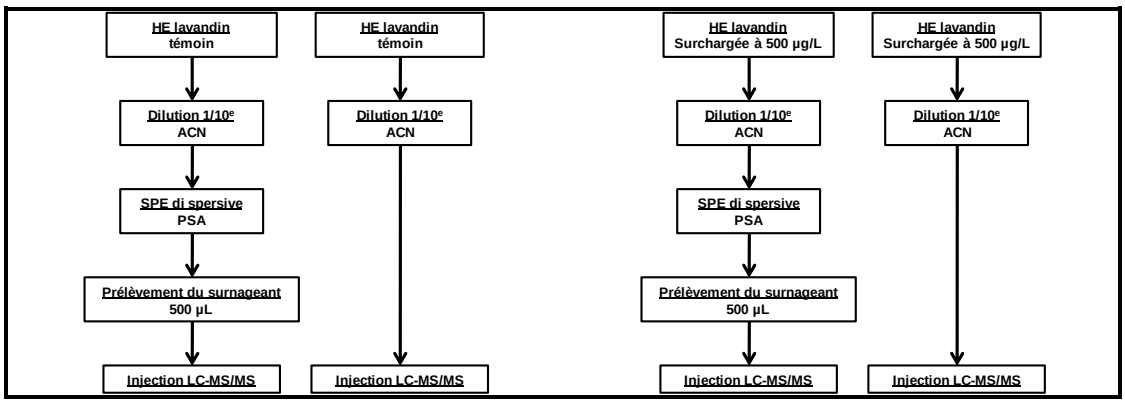


Figure 75. Protocole d'évaluation de la purification de la SPE dispersive sur l'huile essentielle de lavandin

La Figure 76 présente les chromatogrammes obtenus pour six substances actives représentatives de l'ensemble des pesticides en termes de polarité et de temps de rétention. Il s'agit de l'acétamipride, du bromacil, du diméthanamide, du propiconazole, de la deltaméthrine et du tau-fluvalinate.

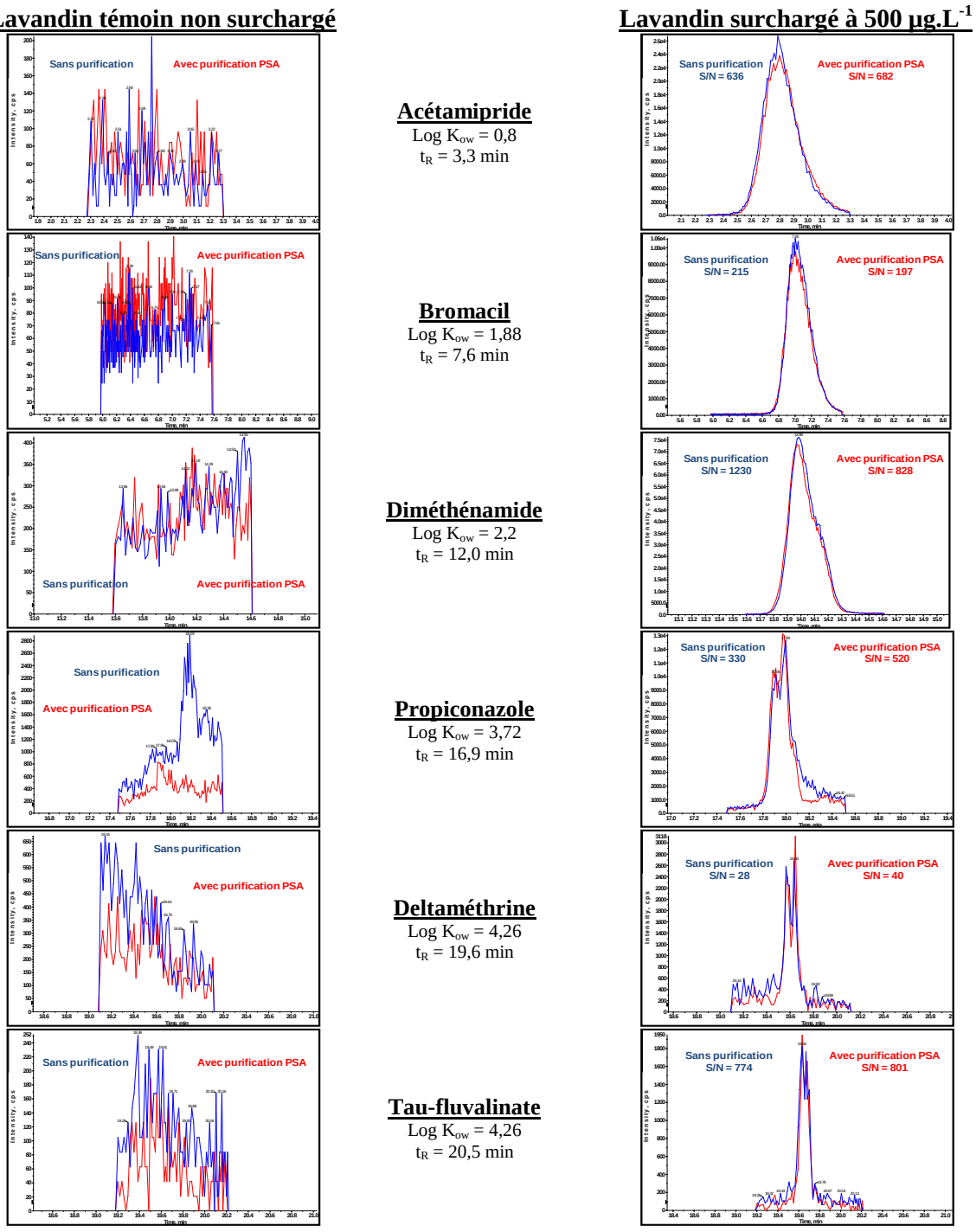


Figure 76. Chromatogrammes issus des premières transitions de six pesticides choisis pour leur t_R répartis sur l'ensemble du run chromatographique dans le cas de l'analyse LC-ESI/sSRM d'échantillons d'huile essentielle de lavandin non purifié (en bleu) et purifié (en rouge) sur PSA

La comparaison des chromatogrammes obtenus à partir d'échantillons purifiés avec ceux issus d'échantillons non purifiés permet de montrer l'importance de considérer certains aspects caractéristiques de la ligne de base comme sa hauteur et la présence ou non d'interférents.

La mise en place d'une purification a pour objectif de diminuer l'intensité de la ligne de base et donc du bruit de fond, permettant d'obtenir un meilleur rapport S/N et par suite, d'abaisser la limite de quantification de la substance active. Un second objectif concerne l'élimination d'interférents dont les élutions sont proches du composé d'intérêt. En effet, ces composés interférents peuvent engendrer des difficultés d'intégration, voire des faux positifs.

Pour les trois composés les plus polaires (acétamipride, bromacil, diméthanamide), la purification PSA n'a pas une influence significative sur le bruit de fond (Figure 76 colonne de gauche). Cette observation est confirmée par les valeurs des rapports S/N calculés pour les échantillons surchargés (Figure 76 colonne de droite) qui se révèlent égales, que l'huile essentielle ait été traitée par SPE dispersive ou non.

En revanche, pour les trois composés les moins polaires (propiconazole, deltaméthrine, tau-fluvalinate), une amélioration au niveau du bruit de fond est constatée. Si elle est légère dans les cas de la deltaméthrine et du tau-fluvalinate, elle permet d'éliminer un interférent pour le propiconazole. Cet effet est par ailleurs plus prononcé sur la seconde transition du propiconazole où l'interférent cause un épaulement du pic de propiconazole dans le cas de l'échantillon non purifié (Figure 77).

a) <u>Lavandin témoin non surchargé</u> **b) <u>Lavandin surchargé à 500 µg/L</u>**

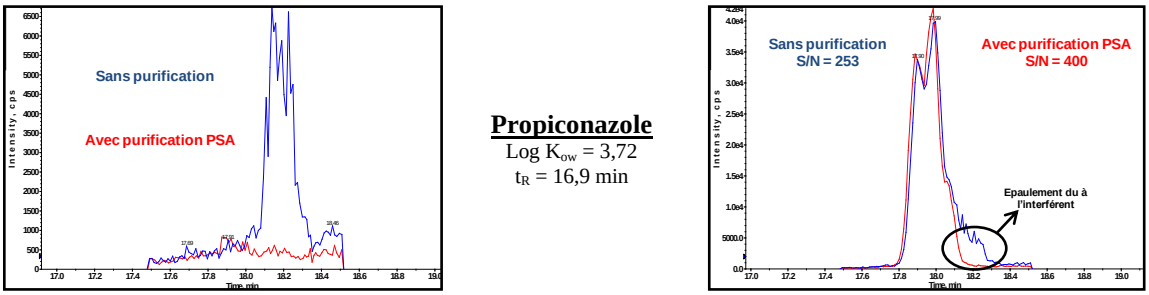


Figure 77. Chromatogrammes de masse illustrant l'effet de la purification sur la seconde transition du propiconazole (342,1→159,0) d'un échantillon d'huile essentielle de lavandin a) non suchargé et b) surchargé en propiconazole

Les données recueillies sur le propiconazole mettent en évidence que, malgré la grande spécificité du mode SRM, la présence d'interférents n'est toujours pas exclue.

II.3 Conclusion

Tout comme l'extraction sur phase solide, il apparaît difficile de mettre en place une purification par SPE dispersive dans le cadre d'une analyse multi-résidus élargie, notamment à cause de la récupération des composés acido-basiques qui nécessiteraient, de toute façon, une injection sans purification. De plus, même si ces essais ont été directement injectés dans l'acétonitrile, le chapitre I a permis d'établir que le solvant d'injection optimal était le méthanol. L'injection directe des extraits dans l'acétonitrile ou la mise en place d'une étape supplémentaire d'évaporation pour changer le solvant de reprise auraient des conséquences néfastes sur la sensibilité de la méthode.

Ces essais ont cependant mis en évidence quelques points positifs de la purification par SPE dispersive, principalement sur les pesticides peu polaires. Elle permettrait de diminuer légèrement le bruit de fond des transitions et pourrait se révéler utile pour éliminer certains interférents, à l'image de celui présent sur les transitions du propiconazole.

III. Dilution pour une injection directe des huiles essentielles

L'objectif des essais suivants était d'estimer les limites de quantification qu'il était envisageable d'obtenir si le protocole de préparation consistait à diluer les huiles essentielles pour les injecter directement en LC-MS/MS. Bien que les conditions analytiques pour une injection dans le méthanol n'étaient pas totalement optimisées lors de ces essais, ce solvant a tout de même été choisi pour la dilution des huiles essentielles (non solubles dans le MeOH/Eau).

III.1 Protocole expérimental

Afin d'évaluer l'influence de la dilution sur l'effet matrice et les limites de quantification, trois taux de dilutions $1/10^{e}$, $1/25^{e}$ et $1/50^{e}$ ont été testées pour les deux huiles essentielles de citron et lavandin.

Des témoins d'huiles essentielles non surchargées en pesticides, correspondant aux taux de dilution de $1/50^{e}$, $1/25^{e}$ et $1/10^{e}$, ont été préparés en mélangeant 20, 40 et 100 µL d'huile essentielle dans respectivement 980, 960 et 900 µL de méthanol.

Des gammes matrices comprenant sept points de gamme (0,5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 $\mu g.L^{-1}$) ont ensuite été réalisées à partir de ces témoins. La préparation d'un point de gamme matrice consiste à mélanger 90 µL de témoin et 10 µL d'un point solvant à une concentration 10 fois

supérieure à celle désirée. Par exemple, pour préparer un point de gamme matrice à 1 µg.L^{-1}, 90 µL de témoin sera mélangé avec 10 µL d'un point de gamme solvant à une concentration de 10 µg.L^{-1}.

Une gamme solvant a également été préparée pour servir de référence. Elle est constituée de six points de gamme : 0,1, 1, 5, 10, 20 et 50 µg.L^{-1}.

III.2 Résultats et discussion

III.2.1. Mise en évidence des effets matrice

Une méthode commune pour évaluer l'effet matrice consiste à comparer deux droites d'étalonnage, l'une obtenue à partir d'une gamme préparée dans le solvant, l'autre à partir d'une gamme préparée dans la matrice. La différence de réponse entre les points préparés dans la matrice et ceux dans le solvant permet de calculer l'effet matrice. Il sera qualifié de positif dans le cas d'une augmentation du signal et de négatif dans le cas d'une diminution.

Les effets matrice des huiles essentielles de lavandin et de citron ont été mis en évidence en comparant les gammes solvants et matrices de 56 pesticides. L'ensemble de ces gammes sont exposées en Annexe 7 et ordonnées par temps de rétention croissant de la substance active. Ce classement permet de visualiser plus aisément la corrélation entre le temps de rétention lié à la polarité de la molécule et l'effet matrice dû à l'huile essentielle. Le Tableau 18 présente un composé polaire (acétamipride) qui n'est pas sujet à l'effet matrice et un composé apolaire (oxadiazon) pour lequel l'influence de la matrice est clairement négative.

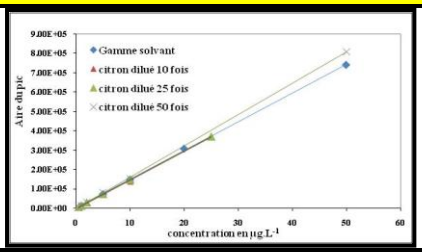
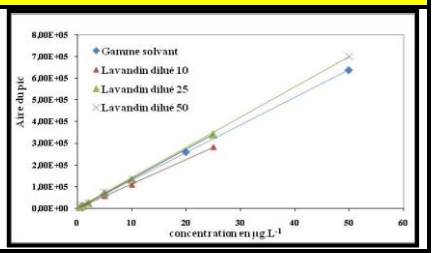
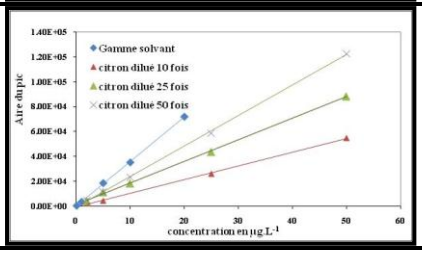
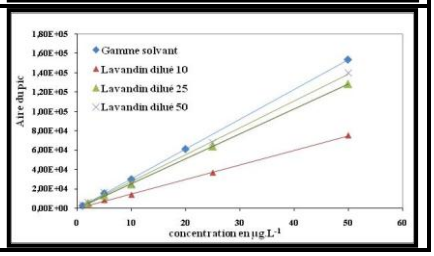
Substance active	Log K_{ow}	t_R (min)	Gammes solvant et matrice dans le citron	Gammes solvant et matrice dans le lavandin
Acétamipride	**0,8**	**3,05**		
Oxadiazon	**5,33**	**19,2**		

Tableau 18. Comparaison des gammes solvants et matrices de deux substances actives : l'acétamipride (polaire) et l'oxadiazon (apolaire)

L'observation des droites étalons de l'oxadiazon montre que l'importance de l'effet matrice diffère selon l'huile essentielle considérée. En effet, si une dilution au 1/25^{e} de l'huile essentielle de lavandin permet de dissiper presque totalement l'effet matrice (superposition des gammes solvant et matrices), même une dilution au 1/50^{e} de l'huile essentielle de citron n'aboutit pas à la suppression de l'effet matrice.

D'un point de vue général, l'effet suppresseur de la matrice est surtout observé pour les composés apolaires. En effet, seules 4 des 31 substances actives éluées dans les 16 premières minutes du run sont affectées par un effet matrice, contre 15 des 20 substances actives éluées après 16 minutes.

La comparaison de ces droites étalons reportées dans le Tableau 18 permet de mettre en évidence l'effet suppresseur de la matrice au niveau de l'ionisation electrospray. Cependant, il peut également se traduire par une augmentation du bruit de fond (ligne de base), ce qui ne modifie pas directement l'intensité du pic chromatographique de l'analyte considéré mais son rapport S/N et donc, sa limite de quantification.

III.2.2. Détermination des limites de quantification dans le solvant et les huiles essentielles de citron et lavandin

La limite de quantification se définit comme la plus petite quantité d'analyte pouvant être déterminée quantitativement. La LOQ d'un appareil analytique correspond à un rapport signal sur bruit S/N = 10. Pour faciliter l'interprétation des résultats, elle est assimilée, dans ce paragraphe, au point de gamme de concentration la plus basse pour lequel l'analyte a pu être quantifié (S/N ≥ 10). De même, il s'agit bien là des LOQs appareillage et non des LOQs dans les huiles essentielles brutes. Ces dernières peuvent toutefois être obtenues en tenant compte du facteur de dilution. Le Tableau 19 recense les LOQs des substances actives obtenues dans le solvant et pour les trois taux de dilution des deux huiles essentielles.

	LOQs Solvant (MeOH)	**LOQs dans l'huile essentielle de citron diluée au**			**LOQs dans l'huile essentielle de lavandin diluée au**		
Pesticide		**1/50^{e}**	**1/25^{e}**	**1/10^{e}**	**1/50^{e}**	**1/25^{e}**	**1/10^{e}**
Abamectine	1	2	5	5	5	5	25
Acephate	5	5	5	5	5	5	5
Acétamipride	1	0,5	0,5	0,5	0.5	0.5	0.5
Acibenzolar-S-méthyl	1	1	1	1	1	1	1
Aclonifen	5	5	5	5	5	5	5
Amidosulfuron	1	2	5	5	2	5	5
Azoxystrobine	0,1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Bifenthrine	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
Bromacil	1	0.5	0.5	0.5	1	1	1
Butraline	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Carbaryl	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Carbendazime	1	0.5	0.5	0.5	1	1	1
Carbétamide	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Chloridazone	5	5	5	5	5	5	5

Pesticide	LOQs Solvant (MeOH)	LOQs dans l'huile essentielle de citron diluée au			LOQs dans l'huile essentielle de lavandin diluée au		
		1/50e	1/25e	1/10e	1/50e	1/25e	1/10e
Chlorpyrifos	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cycloxydime	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cyhalothrine (λ)	10	10	10	25	25	25	50
Cyromazine	5	5	5	5	5	5	5
Deltaméthrine	1	1	1	2	5	10	25
Difénoconazole	0.1	0.5	0.5	0.5	0.1	0.5	0.5
Diflufénicanil	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Dimethenamid	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Dimethoate	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Diuron	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ethofumesate	1	0.5	0.5	1	1	2	2
Fluazifop-p-butyl	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Flurochloridone	1	0.5	0.5	0.5	0.5	2	Non détecté
Iprodione	5	5	5	5	5	5	5
Isoproturon	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Isoxaben	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	Pic coupé
Lénacile	1	0.5	0.5	0.5	2	2	2
Linuron	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Méfénoxam	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Métamitron	1	2	2	2	5	5	5
Métazachlore	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Méthomyl	1	0.5	0.5	0.5	1	1	1
Monocrotophos	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Napropamide	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Norflurazon	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Oxadiazon	0.1	2	2	2	2	2	2
Pendiméthaline	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Pirimicarbe	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Prometryn	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Propiconazole	0.1	0.5	0.5	0.5	5	5	5
Propyzamide	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Prosulfocarbe	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Pymetrozin	1	0.5	0.5	0.5	5	5	5
Quizalofop-p-ethyl	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Simazine	1	0.5	0.5	0.5	1	1	1
Sulfosulfuron	2	2	2	5	2	5	5
Tau-fluvalinate	5	10	10	10	5	10	10
Tebuconazole	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Tableau 19. LOQs en µg.L^{-1} des substances actives en fonction de l'huile essentielle et du taux de dilution

Avant de débuter l'interprétation du Tableau 19, il convient de préciser un point qui pourrait paraître anormal. De nombreuses molécules ont une LOQ matrice égale à 0,5 µg.L^{-1} alors que leur LOQ solvant s'élève à 1 µg.L^{-1} (ex : acétamipride). Cela ne signifie pas pour autant que, pour ces molécules, la sensibilité de la méthode est meilleure dans la matrice que dans le solvant. En fait, il faut signaler que, lors de la préparation des solutions, les points de gamme solvant n'avaient pas exactement les mêmes concentrations que les points de gamme matrice.

Ainsi, une augmentation de la LOQ dans les gammes matrice par rapport à la gamme solvant est observée pour 13 molécules (lignes bleues dans le Tableau 19) de nature polaires et apolaires. Ces augmentations sont dues soit à un effet matrice suppresseur, soit à une augmentation du bruit de fond. Malgré l'effet suppresseur de la matrice, mis en évidence en

comparant les droites étalons, les composés apolaires conservent, pour la majorité, des LOQs satisfaisantes. Ceci est principalement dû à leur grande sensibilité.

En outre, si on se focalise uniquement sur l'influence du taux de dilution, on observe que le rapport S/N de chaque pesticide augmente globalement avec le taux de dilution pour une concentration donnée. Toutefois, l'amélioration constatée sur le rapport S/N n'est pas assez importante pour induire une baisse de la LOQ à l'exception des huit molécules du Tableau 20.

Composés polaires et moyennement polaires	Composés apolaires
Amidosulfuron	Cyhalothrine-λ
Sulfosulfuron	Deltamethrine
Flurochloridone	Tau fluvalinate
Ethofumesate	Abamectine

Tableau 20. Substances actives dont la LOQ varie avec le facteur de dilution de l'huile essentielle

Si l'élévation de la LOQ est plutôt modérée pour les composés polaires et moyennement polaires, de l'ordre d'un facteur 2, elle est plus prononcée pour les molécules apolaires. Par exemple, la LOQ de la deltaméthrine évolue de 5 $\mu g.L^{-1}$ dans le lavandin dilué au $1/50^{e}$ à 25 $\mu g.L^{-1}$ pour une dilution au $1/10^{e}$.

Ces essais démontrent la faisabilité d'une dilution suivie d'une injection directe pour l'analyse multi-résidus de pesticides dans les huiles essentielles. Malgré des effets matrice moindres et des LOQs légèrement plus basses pour des dilutions au $1/25^{e}$ et $1/50^{e}$, il apparaît difficile de s'orienter sur ces taux. En effet, en termes de sensibilité dans les huiles essentielles brutes, la baisse des $LOQ_{appareillage}$ constatée pour des dilutions au $1/25^{e}$ et $1/50^{e}$ n'est pas assez importante pour compenser le taux de dilution par rapport à une dilution de $1/10^{e}$. Les LOQs correspondantes dans les huiles essentielles brutes sont par conséquent beaucoup plus élevées que pour une dilution au $1/10^{e}$. Ainsi, une substance active dont la $LOQ_{appareillage}$ serait égale à 0,5 $\mu g.L^{-1}$ conduirait à une limite de quantification dans l'huile essentielle brute (LOQ_{HE}) de 25 $\mu g.L^{-1}$ et 5 $\mu g.L^{-1}$ respectivement, pour des taux de dilutions de $1/50^{e}$ et $1/10^{e}$.

Dans le cas d'une dilution au $1/10^{e}$, une limite de quantification de 10 $\mu g.L^{-1}$ dans l'huile essentielle (soit une $LOQ_{appareillage}$ de 1 $\mu g.L^{-1}$) pourrait être obtenue pour 35 des 53 pesticides du Tableau 19.

IV. Conclusion sur les méthodes de préparation des huiles essentielles

Les essais développés dans cette partie ont permis de tester trois méthodes de préparation des huiles essentielles basées sur des procédés différents, à savoir la SPE, la SPE dispersive et la simple dilution. La SPE paraît difficilement envisageable au vu des taux de récupération extrêmenent faibles admis par plusieurs composés, à l'exemple du diflufenican (TR = 1 %). La SPE dispersive, bien que possédant des avantages notamment concernant l'élimination de certains interférents, ne peut être appliquée à l'ensemble des substances actives du fait de la sensibilité des composés acido-basiques à la variation de *pH* causée par la phase adsorbante de type PSA. Au final, la troisième et dernière méthode testée, qui consiste en une simple dilution suivie d'une injection directe en LC-MS/MS, semble être la préparation la plus adaptée à l'analyse de résidus de pesticides dans les huiles essentielles. En effet, contrairement aux deux autres procédures, elle ne pose aucun problème de récupération des composés, et les LOQs envisageables avec une dilution au $1/10^{e}$ sont encourageantes puisque, à ce stade du développement, une LOQ de 10 $\mu g.L^{-1}$ pourrait être atteinte pour un peu plus de la moitié des substances actives.

B) Développement de la méthode d'analyse : étude d'une huile essentielle de lavandin suchargée en pesticides

Compte tenu des essais préliminaires menés sur la préparation des échantillons d'huiles essentielles, la méthode retenue est une dilution au 1/10^{e} dans un solvant organique. Ce type de préparation implique que la sensibilité de la méthode d'analyse est entièrement dictée par l'analyse LC-MS/MS.

C'est pourquoi, un travail conséquent a d'abord été fourni pour optimiser les conditions chromatographiques dans le cas d'une injection dans un solvant organique pur comme le méthanol. Puis, les effets matrice ainsi que les limites de quantification d'environ 70 substances actives, ont été évalués dans l'huile essentielle de lavandin.[259] Enfin, la méthode nouvellement développée, a été appliquée à l'analyse d'échantillons réels d'huile essentielle de lavandin.

I. Optimisation des conditions d'injection d'une huile essentielle

I.1 Nature du solvant et volume d'injection

Les essais détaillés ci-dessous avaient pour objectifs d'étudier, dans un premier temps, l'impact de la nature du solvant d'injection sur la résolution chromatographique puis, dans un second temps, d'évaluer l'influence du volume d'injection.

Il est largement reconnu que les conditions chromatographiques idéales sont obtenues lorsque l'échantillon analysé est injecté dans un solvant d'injection de même nature que la composition initiale de la phase mobile. Dans notre cas, il s'agit d'un mélange MeOH/Eau (50/50). Cependant, du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles avec l'eau, il faut envisager un solvant de dilution de nature 100 % organique tel que le méthanol et l'acétonitrile. Les injections de 50 µL de trois mélanges de 54 pesticides à une concentration de 100 µg.L^{-1} préparés respectivement dans les solvants MeOH/Eau (50/50), MeOH et ACN ont abouti aux chromatogrammes de la Figure 78.

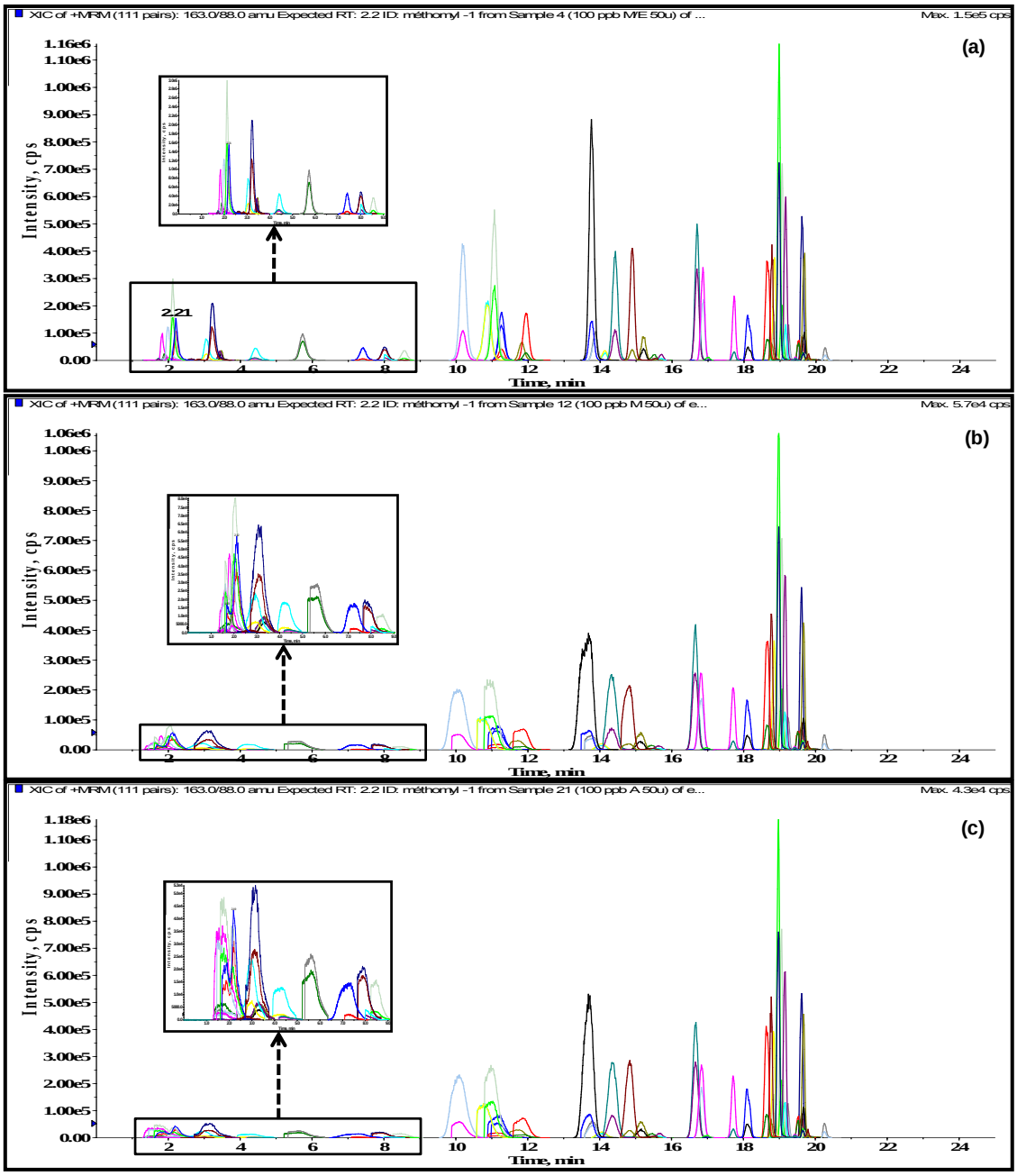


Figure 78. Chromatogrammes issus de l'injection de 50 µL d'un mélange de 54 pesticides à 100 µg.L^{-1} dans (a) du MeOH/Eau, (b) du MeOH, (c) de l'ACN

La Figure 78 montre une très nette dégradation de la résolution des pics chromatographiques lorsque l'injection est effectuée dans un solvant organique pur (b et c) par rapport à un solvant hydro-organique. Celle-ci est d'autant plus importante que le composé est polaire, c'est-à-dire caractérisé par un temps d'élution court. Ces déformations et élargissements des pics peuvent être dus à la différence de force éluotropique entre les phases mobiles et le solvant d'injection, ou à l'instabilité hydrodynamique de la bande de solvant causée par la différence de viscosités avec les phases mobiles. Etant donnée l'origine de ces

déformations, il est compréhensible qu'elles influent davantage sur les composés les moins retenus.

Quel que soit le phénomène considéré, ces déformations sont dues à des perturbations générées au moment de l'injection, l'influence du volume d'injection a donc été investiguée.

Les solutions précédentes ont été réinjectées avec des volumes d'injections de 2, 5, 10, 15, 20, 25 et 50 µL. La Figure 79 met en évidence l'évolution de la largeur du pic chromatographique du composé polaire monocrotophos (log K_{ow} = -0,22).

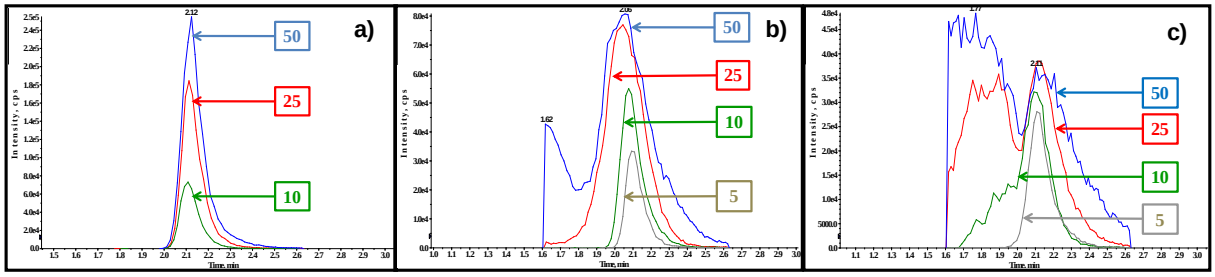


Figure 79. Evolution de la forme du pic chromatographique du monocrotophos en fonction du volume et du solvant d'injection a) MeOH/Eau, b) MeOH, c) ACN. A noter que la coupure brutale des pics est due aux bornes de la fenêtre d'acquisition du scheduled SRM.

Les 13 premières minutes des chromatogrammes de la Figure 78, dévoilant l'impact général du volume d'injection sur la résolution des pesticides polaires et moyennement polaires, sont disponibles en Annexe 8 pour les volumes d'injection de 10, 25 et 50 µL. Le volume d'injection d'un mélange de pesticides dilué dans du MeOH/Eau n'a pas d'effet significatif sur la forme des pics chromatographiques (Figure 79 a)), comportement attendu étant donné que le solvant d'injection a une composition similaire à celle de la phase mobile initiale. En revanche, dans le cas d'injections réalisées avec des solvants organiques purs, la forme du pic chromatographique varie en fonction du volume d'injection avec des déformations proportionnelles aux volumes. Selon la Figure 79 (b et c) qui montre l'évolution de l'allure du pic chromatographique du monocrotophos en fonction du volume d'injection de solvants organiques purs, le méthanol semble plus adapté que l'acétonitrile. En effet, le méthanol donne un pic de forme bien défini pour un volume d'injection allant jusqu'à 25 µL (Figure 79 b), alors que de nettes déformations sont encore observées dans l'ACN pour un volume de 10 µL (Figure 79 c). Ce phénomène peut s'expliquer par la plus faible viscosité de l'acétonitrile comparée au méthanol, *i.e.*, 0,345 contre 0,59 mPa.s. En considérant la composition initiale de la phase mobile, *i.e.*, Eau/MeOH (50/50), la différence de viscosité entre la solution d'injection et la phase mobile doit être plus importante pour l'acétonitrile que pour le méthanol.

Le solvant le plus adapté semble donc être le méthanol, qui permet d'injecter un volume de 25 µL en gardant des pics chromatographiques bien définis, même pour les composés les plus polaires. Pour atteindre une efficacité équivalente avec l'acétonitrile, il faudrait se limiter à un volume d'injection de 5 µL. Or, la sensibilité de la méthode analytique est directement reliée au volume d'injection puisqu'il définit la quantité d'analyte injectée. Par conséquent, en théorie, plus le volume d'injection est élevé, plus la quantité d'analyte injectée est grande, et meilleure sera la sensibilité. Ceci n'est pas tout à fait exact quand il est question d'injecter de la matrice. En effet, dans ce cas, une quantité supérieure d'analyte sera effectivement injectée dans le système mais également plus de matrice, ce qui peut entraîner des effets matrice plus importants, donc diminuer la sensibilité.

Dans tous les cas, une meilleure sensibilité sera obtenue avec le méthanol même si le volume d'injection devait être diminué. C'est, par conséquent, ce solvant qui a été retenu. Le volume d'injection a été fixé à 20 µL pour avoir des pics un peu plus fins qu'à 25 µL pour tirer un meilleur profit du scheduled SRM.

I.2 Effet de la quantité d'acide dans les phases mobiles et le solvant d'injection

En plus de la nature des phases mobiles et du gradient d'élution, de la nature et du volume du solvant d'injection, l'étude bibliographique a mis en évidence l'importance du taux d'acide et par conséquent du *pH*. Il influe d'une part, sur la protonation des groupements silanols et donc sur la qualité de la séparation chromatographique et, d'autre part, sur la formation de molécules protonnées en solution qui est un facteur primordial de l'ionisation electrospray. Pour ces raisons, l'influence du taux d'acide acétique a été investiguée à la fois dans les phases mobiles et dans le solvant d'injection.

A partir d'un mélange de pesticides identiques aux expériences précédentes, 4 solutions de concentrations égales à 20 $\mu g.L^{-1}$ ont été préparées dans du méthanol en faisant varier le taux d'acide acétique : 0 %, 0, 1%, 0,5 %, 1 %. Ces solutions ont ensuite été injectées en mode ESI+ et ESI- avec, lors de la première expérience, des phases mobiles acidifiées avec 0,1 % d'acide acétique et, lors de la seconde expérience, des phases mobiles acidifiés avec 1 % d'acide acétique.

I.2.1. Influence sur le temps de rétention

Si le taux d'acide acétique dans le solvant d'injection n'a pas d'influence sur le temps de rétention des pesticides, son augmentation dans les phases mobiles entraîne la variation du t_R d'une trentaine de composés. Les substances actives les plus affectées sont les molécules acides et basiques : la carbendazime, le pirimicarbe, la prometryn, l'amidosulfuron, le sulfosulfuron (molécules détectées en ESI+) ainsi que l'ensemble des composés détectés en ESI-. Seuls les composés dont le temps de rétention variait d'au moins 0,2 minutes ont été considérés et répertoriés dans le Tableau 21.

Pesticide	Phase 0,1% T_r (min)	Phases 1% T_r (min)	$T_{r\,1\%} - t_{r\,0,1\%}$ (min)	Acide/base	Pka
Acibenzolar-S-methyl	15,2	14,9	-0,3	/	/
Azoxystrobin	13,3	13	-0,3	/	/
Dimethenamid	14,1	13,8	-0,3	/	/
Diuron	11,5	11,2	-0,3	/	/
Ethofumesate	13,5	13,3	-0,2	/	/
Flurochloridone	15,5	15,2	-0,3	/	/
Iprodione	16,8	16,6	-0,2	/	/
Isoproturon	10,9	10,6	-0,3	/	/
Isoxaben	14,6	14,4	-0,2	/	/
Linuron	13,8	13,5	-0,3	/	/
Méfénoxam	10,7	10,4	-0,3	/	/
Métazachlore	10,5	10,2	-0,3	/	/
Napropamide	16,6	16,4	-0,2	/	/
Norflurazon	11,5	11,2	-0,3	/	/
Propyzamide	15	14,7	-0,3	/	/
Lénacile	15,5	15,2	-0,3	Acide très faible	10,4
Prometryn	16,4	15,6	-0,8	Acide très faible	9,95
Oryzaline	16,2	16	-0,2	Acide très faible	9,4
Pirimicarbe	9,6	7,9	-1,7	Base faible	4,4
Carbendazime	4,1	3,2	-0,9	Base faible	4,2
Triclopyr	7,5	10,9	+3,4	Acide faible	3,97
MCPA	6,2	9,7	+3,5	Acide faible	3,73
Amidosulfuron	4,2	7,7	+3,5	Acide faible	3,58
Sulfosulfuron	7,7	12	+4,3	Acide faible	3,57
Bentazone	2,2	4,4	+2,2	Acide faible	3,28
Mecoprop	9,1	12,8	+3,7	Acide faible	3,11
Fluroxypyr	2,4	4,5	+3,1	Acide fort	2,94
Haloxyfop	14,4	16,5	+2,1	Acide faible	2,9
2,4D	5,6	8,5	+2,9	Acide fort	2,87
Dicamba	2,4	3,4	+1,0	Acide fort	1,87

Tableau 21. Evolution du taux de rétention des pesticides en fonction du taux d'acide acétique dans les phases mobiles

Parmi les pesticides du Tableau 21, trois groupes se distinguent. Le premier se compose des molécules ne possédant pas de propriétés acido-basiques. Si leur t_R diminue avec l'augmentation de l'acidité, la variation reste faible et ne dépasse jamais plus de 0,3 minutes. Le second groupe est constitué par les substances actives admettant un pKa supérieur à 4 et

pour lesquelles le t_R diminue également. Enfin, le troisième groupe comprend les molécules de pKa inférieur à 4 et pour lesquelles une augmentation du t_R est observée.

Une hypothèse plausible permettant d'expliquer la variation des temps de rétention des pesticides en fonction du taux d'acide acétique concerne l'évolution de l'espèce prédominante acide ou basique en fonction du pH, et donc le changement d'interactions avec la phase stationnaire, notamment les silanols.

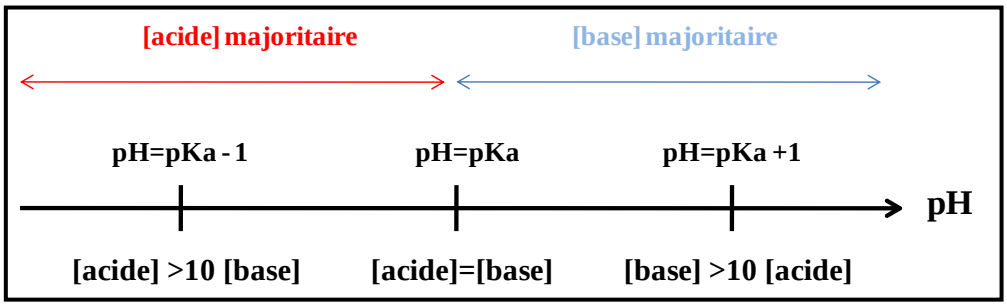


Figure 80. ***Rappel du diagramme de prédominance des espèces acide et basique en fonction du pKa et du pH***

Une explication détaillée de ce phénomène nécessiterait de connaître avec précision à tout moment *t*, le pH et les pKa de chaque molécule concernée ainsi que celui des silanols. Or, ces données sont dépendantes non seulement du pourcentage de solvant organique dans la phase mobile, mais également de la température,[210] leur détermination dépassant le cadre de cette étude. De plus, il est impossible de connaître la formule de l'endcapping polaire qui est probablement de nature alcoolique et donc vraisemblablement influencé par la valeur du pH.[257] Nous nous limiterons donc à une interprétation globale du phénomène.

Concernant le premier groupe, le changement de pH n'est pas censé affecter les substances actives. En revanche, les groupements silanols sont davantage protonés et sont donc moins susceptibles d'interagir avec les analytes. Les composés, légèrement moins retenus par la phase stationnaire, ont donc un t_R plus faible avec les phases acidifiées avec 1 % d'acide acétique.

Pour le second groupe, on distingue le lénacile, la prometryne et l'oryzaline de la carbendazime et du pirimicarbe. Les premiers ont des pKa élevés (> 9), la forme prédominante est la forme basique RCOO- quelles que soient les phases mobiles. L'élévation de pH influe seulement sur les silanols, donnant lieu à moins d'interactions et, par conséquent, à une élution légèrement plus rapide. Concernant la carbendazime et le pirimicarbe, avec les phases 0,1%, les formes acides et basiques sont en concentration à peu près égales. Lorsque le pH diminue, la forme acide devient prédominante, tout comme pour les silanols, donnant lieu à moins d'interactions et donc des t_R plus faibles.

Enfin, pour les acides de pKa < 4, la forme prédominante dans l'expérience 1 est la forme basique RCOO-, tout comme pour les silanols. Très peu de liaisons entre les silanols et les analytes interviennent, dans ce cas, dans le processus de rétention. En revanche, quand le pH diminue, les espèces acides et basiques vont coexister (idem pour les silanols) augmentant ainsi le degré d'interactions entre les analytes et la phase stationnaire et, donc, le temps de rétention.

I.2.2. Influence sur l'aire des pics chromatographiques

Les aires des pics chromatographiques des substances actives en fonction du taux d'acide acétique dans le solvant d'injection et les phases mobiles sont présentées en Annexe 9.

L'influence du taux d'acide acétique dans le solvant d'injection est faible. En effet, l'intensité des aires de chaque pic chromatographique est relativement stable quelque soit l'acidité du solvant d'injection. Le coefficient de variation pour une même phase mobile et pour les quatre solvants d'injection ne dépasse jamais 10 %. Il est d'ailleurs, pour la majorité des molécules, inférieur à 5 %.

Par contre, l'influence du taux d'acide dans les phases mobiles est à prendre en compte. Il a en effet une influence considérable sur la sensibilité des molécules, comme le montre le tableau présenté en Annexe 9. L'augmentation du taux d'acide acétique peut avoir une influence positive, par exemple pour l'abamectine (amélioration de l'intensité d'un facteur 2,8), mais a plus généralement une influence négative comme le montre le Tableau 22. Le facteur F correspond au rapport entre la moyenne des aires obtenues pour les quatre solvants d'injection des phases mobiles à 1 % sur la moyenne de celles obtenues pour les phases mobiles à 0,1 %.

	Nombre de pesticides
F > 1,1	3
0,9 < F < 1,1	22
F < 0,9	43

Tableau 22. Répartition des substances actives en fonction de la variation de l'intensité des aires des pics chromatographiques entre les taux d'acide 1 % et 0,1 % des phases mobiles

Le Tableau 22 montre très clairement l'influence négative globale d'un taux d'acide élevé (1 %). En effet, 43 pesticides admettent une baisse de sensibilité pouvant aller jusqu'à un facteur 4 (diflufenican) quand seulement trois admettent une augmentation (abamectine, carbendazime, chloridazon).

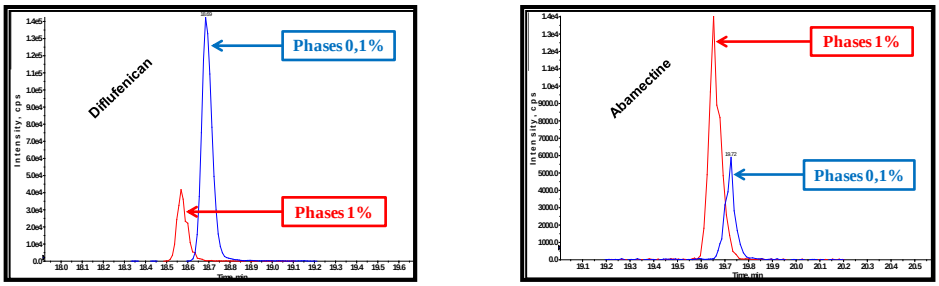


Figure 81. ***Chromatogrammes montrant l'influence négative (à gauche) et positive (à droite) de l'augmentation du taux d'acide dans les phases mobiles***

La variation d'intensité pour les 22 autres composés n'est pas très significative puisque inférieure à 10 %. Cette expérience a permis de mettre en évidence l'effet suppresseur de l'acide acétique sur l'ionisation en electrospray.

En conclusion, on s'aperçoit qu'en termes de sensibilité, les phases mobiles acidifiées avec 0,1 % d'acide acétique sont clairement plus adaptées que celles acidifiées avec 1 %. L'acidification du solvant a quant à elle une influence négligeable. L'objectif premier de ces essais était d'améliorer l'efficacité de la séparation sans pour autant négliger la sensibilité.

I.2.3. Influence sur la forme des pics chromatographiques (efficacité)

L'affinement des pics chromatographiques concerne principalement les composés acido-basiques. D'un point de vue global, les pics sont plus fins avec les phases mobiles acidifiés à 1 % avec une influence mineure de l'acidité du solvant d'injection. Concernant les phases mobiles à 0,1 %, l'influence de l'acidité du solvant d'injection est plus importante et permet d'améliorer sensiblement l'efficacité de la colonne pour certains pesticides tels que l'amidosulfuron (pKa = 3,58) présenté dans la Figure 82.

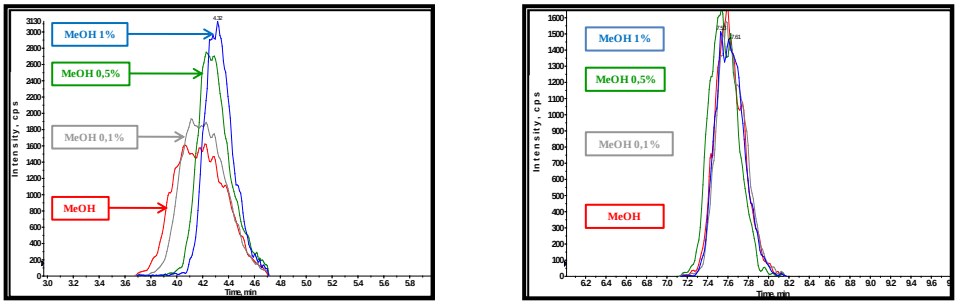


Figure 82. ***Evolution de la largeur du pic chromatographique de l'amidosulfuron en fonction du taux d'acide dans le solvant d'injection et du taux d'acide des phases mobile 0,1 % (à gauche) et 1 % (à droite)***

Comme le montre la Figure 82, avec une acidification du solvant d'injection à 1 % et des phases à 0,1 %, la largeur des pics est comparable à celle obtenue avec les phases acidifiées à 1 %. L'affinement du pic chromatographique de l'amidosulfuron peut être expliqué par le fait

qu'en augmentant le taux d'acide et donc en diminuant le pH, une seule espèce prédomine ; ce qui favorise l'homogénéisation des interactions avec la phase stationnaire et donc un étalement moindre de la bande d'élution. La même observation quant à l'amélioration de la forme des pics peut être faite pour deux autres pesticides en ESI+ (cyromazine, sulfosulfuron) et tous les pesticides analysés en ESI-, à l'exception de l'oryzaline. Pour les pesticides ne possédant pas de propriétés acido-basiques, aucune variation n'a été relevée, ni dans l'allure des pics chromatographiques, ni dans leur intensité.

I.2.4. Conclusion

Le meilleur compromis entre sensibilité et efficacité est obtenu avec l'acidification des phases mobiles à hauteur de 0,1 % et du solvant d'injection à 1 %. Assurément, les phases mobiles à 1 %, bien que présentant des pics plus fins de manière générale, sont nettement moins performantes que les phases à 0,1 % d'un point de vue sensibilité. L'explication la plus probable est la mise en évidence de l'effet suppresseur de l'acide acétique sur l'ionisation electrospray lorsqu'il est présent en quantité trop importante.

L'augmentation du taux d'acide acétique dans le solvant d'injection, dont l'influence est négligeable pour des phases mobiles à 1 %, permet d'affiner significativement les pics des composés acido-basiques pour des phases mobiles à 0,1 %. Il est même possible d'atteindre des largeurs de pics proches de celles obtenues avec les phases acidifiées à 1 %. En résumé, l'ajout de 1 % d'acide acétique dans le solvant d'injection (méthanol) conduit à une amélioration de l'allure des pics et donc du rapport S/N pour 12 des 64 pesticides testés, sans avoir d'influence négative sur les autres molécules.

A travers l'étude de la nature, du volume et de l'acidité du solvant d'injection, ainsi que du taux d'acide acétique dans les phases mobiles, l'optimisation des conditions chromatographiques a permis d'améliorer sensiblement la résolution des pics chromatographiques, principalement pour les composés polaires et acido-basiques. Ainsi, l'injection de 20 µL d'un mélange de 54 pesticides préparé dans du méthanol acidifié avec 1 % d'acide acétique à une concentration de 50 $\mu g.L^{-1}$ et des phases mobiles acidifiées avec 0,1 % donne lieu au chromatogramme de la Figure 83.

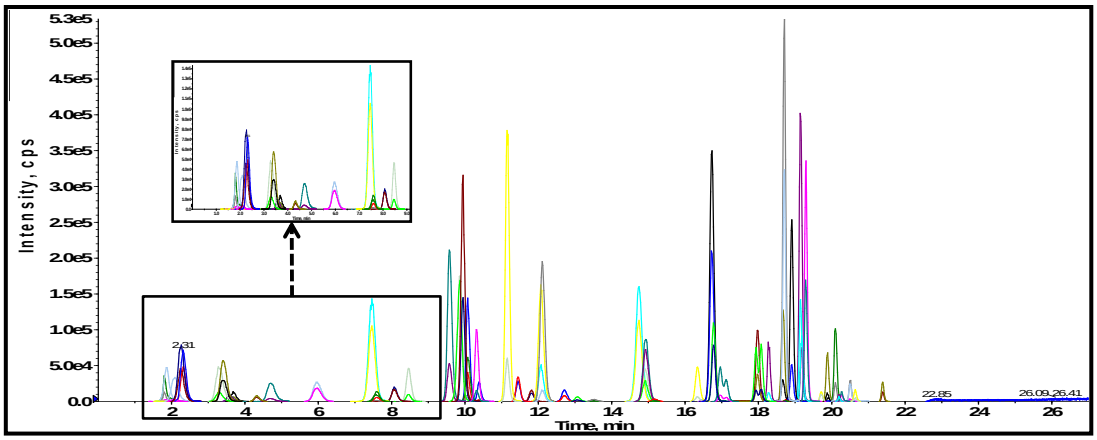


Figure 83. Chromatogramme d'un mélange de 54 pesticides à une concentration de 50 µg.L^{-1} analysés en mode ESI+

Les conditions chromatographiques permettent désormais d'injecter directement l'échantillon dans un solvant organique pur, le méthanol, tout en conservant des pics chromatographiques homogènes et de belles allures sur la totalité du run chromatographique, même pour les composés polaires.

L'huile essentielle de lavandin a été choisie pour éprouver les performances de la méthode d'analyse nouvellement optimisée. Après avoir étudié les effets matrice et vérifié la linéarité de la méthode, les limites de détection et de quantification de 70 pesticides (Tableau 12) ont été déterminées statistiquement à partir d'un plan d'optimisation de type A décrit dans la norme AFNOR NF XP T 90-210.[260]

II. Etude des effets matrice en LC-ESI/sSRM

Lors de ces essais, les gammes matrice n'ont pas été réalisées à partir du témoin dilué, contrairement aux essais précédents (*cf Chapitre IV A) III.*). Les surcharges ont en effet été effectuées directement dans l'huile essentielle brute de manière à se placer dans des conditions d'analyse d'échantillons réels.

II.1 Protocole

Pour préparer les points d'étalonnage matrice, l'huile essentielle de lavandin a été surchargée avec une solution contenant 62 pesticides. Les volumes ont été fixés de manière à limiter, dans la mesure du possible, la quantité de solvant introduit dans l'huile essentielle. Les solutions obtenues furent ensuite diluées au 1/10^{e} avec du méthanol acidifié avec 1 % d'acide acétique. Les concentrations finales de ces huiles essentielles surchargées diluées étaient comparables à celles utilisées pour la gamme solvant à savoir : 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,

2, 2,5, 5, 7,5 et 10 µg.L^{-1}. 20 µL de ces extraits furent ensuite injectés en LC-ESI/sSRM avec les paramètres analytiques résumés en Annexe 10.

II.2 Résultats

Le chromatogramme de la Figure 84 permet de juger de la bonne séparation chromatographique ainsi que de la résolution satisfaisante admise par les 54 pesticides analysés en mode ESI+ au cours de cette expérience.

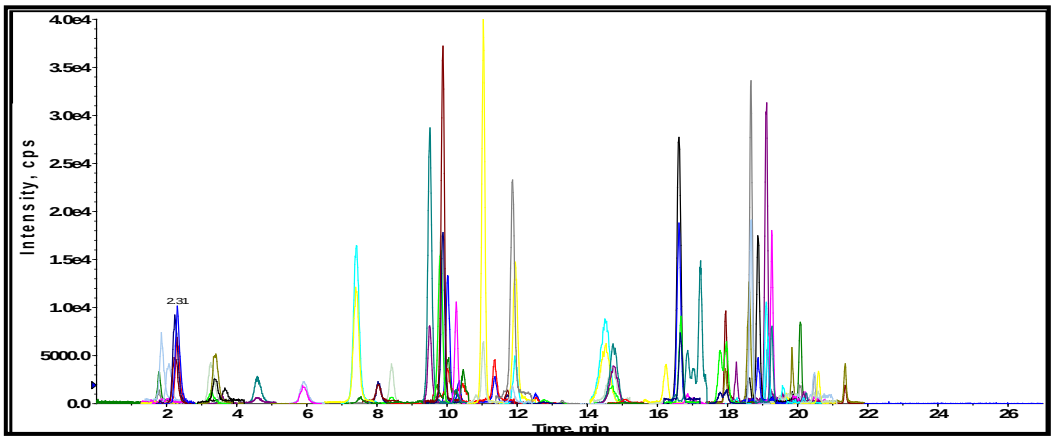


Figure 84. ***Chromatogramme acquis en ESI+ et correspondant à l'injection de 20 µL d'un mélange de 54 pesticides à une concentration de 5 µg.L^{-1} (concentration finale) dans l'huile essentielle de lavandin.***

Les effets matrice (EM) ont été mis en évidence en comparant les gammes solvant et matrice pour 62 pesticides. Ils sont exprimés en % à partir des coefficients directeurs tels que

$$EM\ (\%) = \frac{coefficent\ directeur_{matrice}}{coefficent\ directeur_{solvant}} \times 100 \qquad (87)$$

et détaillés en Annexe 11 pour 54 pesticides en ESI+ et 8 en ESI-. Les effets matrice ont été considérés comme significatifs lorsque la déviation admise par la pente de la gamme matrice était supérieure d'au moins 5 % à celle du solvant.

Les gammes solvant et matrice démontrent une bonne linéarité avec des coefficients de détermination supérieurs à 0,99. La Figure 85 présente les droites étalons solvant et matrice obtenues pour trois pesticides : prometryn, amidosulfuron et chlorpyrifos.

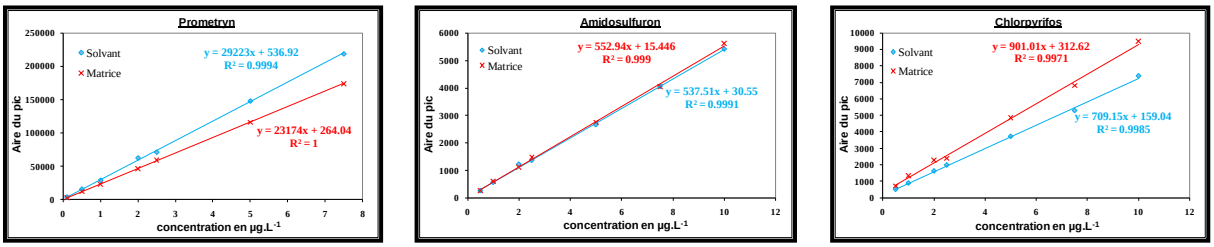


Figure 85. ***Comparaison des droites étalons solvant (bleue) et matrice (rouge) illustrant des effets matrice a) négatif pour la prometryn b) positif pour le chlorpyrifos c) nul pour l'amidosulfuron***

Le chlorpyrifos et la prometryn ont été choisis pour illustrer respectivement un effet matrice positif (augmentation du signal) et négatif (suppression du signal). Le comportement de l'amidosulfuron indique l'absence d'effet matrice. Le Tableau 23 présente une synthèse des effets matrice en fonction de leur valeur et du mode d'ionisation (ESI+ et ESI-).

ESI+		
Effet Matrice	**Nombre de s.a.**	
< -20 %	2	Effet matrice négatif
-20 % à -10 %	2	
-10 % à -5 %	1	
-5 % à 0 %	9	14
0 % à 5 %	10	Effet matrice positif
5 % à 10 %	5	
10 % à 20 %	18	
>20 %	7	40
	54	

ESI-		
Effet Matrice	**Nombre de s.a.**	
< -20 %	0	Effet matrice négatif
-20 % à -10 %	0	
-10 % à -5 %	0	
-5 % à 0 %	1	1
0 % à 5 %	1	Effet matrice positif
5 % à 10 %	0	
10 % à 20 %	1	
>20 %	5	7
	8	

ESI+ et ESI-		
Effet Matrice	**Nombre de s.a.**	
< -20 %	2	Effet matrice négatif
-20 % à -10 %	2	
-10 % à -5 %	1	
-5 % à 0 %	10	15
0 % à 5 %	11	Effet matrice positif
5 % à 10 %	5	
10 % à 20 %	19	
>20 %	12	47
	62	

Tableau 23. Evaluation de l'effet matrice en fonction du mode d'ionisation ESI+ (à gauche), ESI- (au milieu), ESI+ et ESI- (à droite) (s.a. : substances actives)

Sur les 62 pesticides étudiés, 47 sont sujets à une augmentation de l'intensité de leur signal et 18 à une diminution. Pour la majorité (48) de faibles effets matrice, égaux ou inférieurs à 20 %, sont observés dont environ la moitié sont inférieurs à 10 %. Cependant, de forts effets matrice, supérieurs à 20 %, sont constatés pour 14 pesticides, les plus importants étant observés en ESI- pour le 2,4D, le mécoprop et le MCPA, qui admettent une augmentation de leur signal supérieure à 50 %. En ESI+, les effets matrice les plus élevés sont reportés pour les composés élués après 18 minutes (abamectine, bifenthrine, prometryn, oxyfluorfen, difenoconazol, cyhalothrine-λ, cycloxidim, chlorpyrifos). L'huile essentielle de lavandin étant majoritairement constituée de composés apolaires, il est très probable qu'ils soient élués dans ces temps et interfèrent avec la détection des pesticides.

Cette étude a donc démontré des effets matrice significatifs empêchant une quantification avec une gamme solvant. C'est pourquoi la détermination des LODs et LOQs a été réalisée à partir de gammes matrice.

III. Détermination statistique des LODs et LOQs

Basé sur un plan d'optimisation de type A,[260] les performances de la méthode d'analyse ont été évaluées à l'aide de tests statistiques pertinents qui permettent de valider le modèle de régression, vérifier la linéarité du domaine d'étalonnage pour, finalement, déduire les limites de détection et de quantification. Afin d'évaluer la totalité du processus analytique, cinq gammes matrice comportant douze concentrations ont été préparées. A partir d'une solution d'huile essentielle de lavandin surchargée avec l'ensemble des 70 pesticides à une concentration de 200 µg.L^{-1}, douze points de calibrations (cinq répétas) allant de 1 à 150 µg.L^{-1} ont été préparés indépendamment. Les solutions ont ensuite été diluées au 1/10^{e} dans du MeOH 1 % pour obtenir des concentrations entre 0,1 et 15 µg.L^{-1}. Les extraits ont été injectés deux fois pour autoriser l'analyse de 61 pesticides en ESI+ dans un premier temps, et 9 en ESI- dans un second.

III.1 Description de la méthode à partir de l'analyse de l'acétamipride

Le Schéma 14 expose le déroulement des tests statistiques qui aboutissent à la détermination des limites de détection et de quantification de chacune des substances actives dans l'huile essentielle de lavandin.

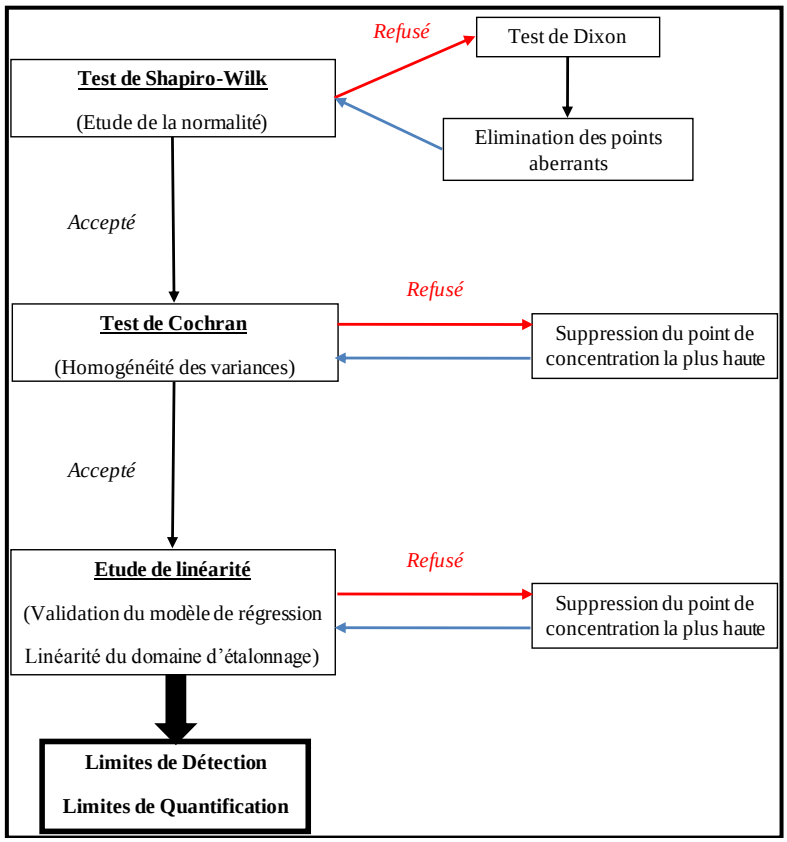


Schéma 14. Déroulement des tests statistiques conduisant à la détermination des LODs et LOQs

Dans un souci de simplifier la compréhension, un exemple d'application de ces tests à la molécule d'acétamipride va servir de support à leur explication. Une description des sigles et symboles employés est disponible en Annexe 12.

Dans un premier temps, le test de Shapiro-Wilk[261] permet de tester, au seuil de risque α = 1 %, la normalité de la distribution des cinq aires des pics chromatographiques relatives à chaque concentration.

X_i	Y_i	Z^2	d_i	a_i	$a_i d_i$	b	W	$W_{0,01}$	Conclusion
0,75	6980		2330	0,6646	1548,52				
0,75	9030								
0,75	9150	3944920	230	0,2413	55,50	**1604,02**	**0,65**	**0,686**	**L'hypothèse de normalité est rejetée**
0,75	9260								
0,75	9310								
1	11100		1100	0,6646	731,06				
1	11300								
1	11500	712000	400	0,2413	96,52	**827,58**	**0,96**	**0,686**	**L'hypothèse de normalité est retenue**
1	11700								
1	12200								
2	22200		2500	0,6646	1661,50				
2	23200								
2	23200	4112000	1200	0,2413	289,56	**1951,06**	**0,93**	**0,686**	**L'hypothèse de normalité est retenue**
2	24400								
2	24700								
2,5	26800		2700	0,6646	1794,42				
2,5	27500								
2,5	27800	3948000	500	0,2413	120,65	**1915,07**	**0,93**	**0,686**	**L'hypothèse de normalité est retenue**
2,5	28000								
2,5	29500								
5	54300		2100	0,6646	1395,66				
5	55500								
5	55700	2508000	500	0,2413	120,65	**1516,31**	**0,92**	**0,686**	**L'hypothèse de normalité est retenue**
5	56000								
5	56400								
7,5	79500		4900	0,6646	3256,54				
7,5	80000								
7,5	80300	15452000	600	0,2413	144,78	**3401,32**	**0,75**	**0,686**	**L'hypothèse de normalité est retenue**
7,5	80600								
7,5	84400								
10	103000		4000	0,6646	2658,40				
10	104000								
10	104000	10800000	2000	0,2413	482,60	**3141,00**	**0,91**	**0,686**	**L'hypothèse de normalité est retenue**
10	106000								
10	107000								
12,5	127000		7000	0,6646	4652,20				
12,5	129000								
12,5	129000	26800000	1000	0,2413	241,30	**4893,50**	**0,89**	**0,686**	**L'hypothèse de normalité est retenue**
12,5	130000								
12,5	134000								
15	152000		6000	0,6646	3987,60				
15	154000								
15	155000	22800000	3000	0,2413	723,90	**4711,50**	**0,97**	**0,686**	**L'hypothèse de normalité est retenue**
15	157000								
15	158000								

Tableau 24. Résultats du test de Shapiro-Wilk appliqué à la molécule d'acétamipride

L'hypothèse de la normalité de la distribution est admise pour toutes les concentrations, celle de 0,75 µg.L^{-1} exceptée. Cependant, l'aire de 6980 semble être un point aberrant.

Dans un deuxième temps, le test de Dixon[262] a été utilisé. Il permet de déterminer si une valeur, au sein d'une population, est aberrante ou non. Les résultats de ce test, pour la concentration de 0,75 µg.L^{-1}, sont regroupés dans le Tableau 25.

X_i	Y_i	r	$r_{0,01}$	Conclusion
0.75	6980			
0.75	9030			
0.75	9150	0,9798	0,7800	La valeur est éliminée
0.75	9260			
0.75	9310			

Tableau 25. Test de Dixon appliqué sur le point de gamme 0,75 µg.L^{-1} de l'acétamipride

D'après le test de Dixon, la valeur 6980 n'est pas représentative de la population donnée et peut être éliminée. La normalité de la distribution doit donc être vérifiée à nouveau sans cette valeur, comme le montre les résultats du test de Shapiro-Wilk (Tableau 26).

Nouveau test Shapiro		Z^2	d_i	a_i	$a_i d_i$	b	W	$W_{0,01}$	Conclusion
0,75	9030	46475	280	0,6646	186,09	**212,63**	**0,9728**	**0,6860**	L'hypothèse de normalité est retenue
0,75	9150								
0,75	9260		110	0,2413	26,54				
0,75	9310								

Tableau 26. Test de Shapiro-Wilk de nouveau appliqué au niveau 0,75 µg.L^{-1} sans la valeur aberrante du Tableau 25

La distribution étant désormais qualifiée de normale, le plan A peut se poursuivre avec la vérification de l'homogénéité des variances, réalisée à travers le test de Cochran[263] dont les résultats sont reportés dans le Tableau 27.

	X_i	Y_i	X_i	Y_i	X_i	Y_i	X_i	Y_i	X_i	Y_i	X_i	Y_i	X_i	Y_i	X_i	Y_i	X_i	Y_i
	0,75	6980	1	11100	2	22200	2,5	26800	5	54300	7,5	79500	10	103000	12,5	127000	15	152000
	0,75	9030	1	11300	2	23200	2,5	27500	5	55500	7,5	80000	10	104000	12,5	129000	15	154000
	0,75	9150	1	11500	2	23200	2,5	27800	5	55700	7,5	80300	10	104000	12,5	129000	15	155000
	0,75	9260	1	11700	2	24400	2,5	28000	5	56000	7,5	80600	10	106000	12,5	130000	15	157000
	0,75	9310	1	12200	2	24700	2,5	29500	5	56400	7.5	84400	10	107000	12,5	134000	15	158000
Variances	1182433,333		923620		25028000		1803000		134320000		112503000		258055111,1		239733777,8		5700000	
Somme S^2_i	779248942,2																	
Max (S^2_i)	258055111,1																	
C_{obs}	0,331158757																	
C_{crit}	0,564																	
Conclusion	L'hypothèse d'homogénéité des variances est acceptée																	

Tableau 27. Test de Cochran appliquée à la molécule d'acétamipride

Le test de Cochran conclut à une variance homogène, c'est-à-dire que la variance entre les différentes concentrations n'est pas significative, l'étude peut donc se poursuivre par l'étude de linéarité.

Cette dernière permet d'établir une fonction linéaire de calibration de type $y = b_0 + b_1 u$ où u et y sont respectivement la concentration et la réponse (aire du pic) de l'analyte, b_0 est l'ordonnée à l'origine, correspondant à la réponse du blanc et b_1 est la pente, correspondant à la sensibilité. Les résultats de cette étude sont visibles dans le Tableau 28.

u	y	$y(u_i)$	$(y_i-y(u_i))^2$	SCEi(y)
0,75	9030	10314	1648056	46475
0,75	9150	10314	1354352	
0,75	9260	10314	1110423	
0,75	9310	10314	1007547	
1,00	11100	12869	3129586	712000
1,00	11300	12869	2461960	
1,00	11500	12869	1874335	
1,00	11700	12869	1366709	
1,00	12200	12869	447646	
2,00	22200	23090	792550	4112000
2,00	23200	23090	12045	
2,00	23200	23090	12045	
2,00	24400	23090	1715438	
2,00	24700	23090	2591287	
2,50	26800	28201	1962372	3948000
2,50	27500	28201	491187	
2,50	27800	28201	160678	
2,50	28000	28201	40340	
2,50	29500	28201	1687798	
5,00	54300	53754	298313	2508000
5,00	55500	53754	3049146	
5,00	55700	53754	3787618	
5,00	56000	53754	5045326	
5,00	56400	53754	7002271	
7,50	79500	79307	37329	15452000
7,50	80000	79307	480537	
7,50	80300	79307	986462	
7,50	80600	79307	1672386	
7,50	84400	79307	25940766	
10,00	103000	104860	3458725	10800000
10,00	104000	104860	739195	
10,00	104000	104860	739195	
10,00	106000	104860	1300136	
10,00	107000	104860	4580607	
12,50	127000	130413	11646776	26800000
12,50	129000	130413	1995827	
12,50	129000	130413	1995827	
12,50	130000	130413	170352	
12,50	134000	130413	12868453	
15,00	152000	155966	15726855	22800000
15,00	154000	155966	3864016	
15,00	155000	155966	932596	
15,00	157000	155966	1069756	
15,00	158000	155966	4138336	

Etalonnage		
Moyenne générale	u	6,4
Moyenne générale	y	67808,0
Somme totale des carrés des étalons	SCE(u)	1082,81
Sensibilité (pente)	b_1	10221,189
Blanc (ordonnée à l'origine)	b_0	2647,874
Nombre de mesure par niveau	n	4,888888889
Nombre de niveau	p	9
Nombre totale de mesure	np	44
Variance résiduelle	s^2(res)	3271265,71
Ecart type de la sensibilté	$s(b_1)$	54,96437332
Ecart type du blanc	$s(b_0)$	443,9883133
Intervalle de confiance de la sensibilité	lim inf	10072,9
	lim sup	10369,5
Intervalle de confiance du blanc	lim inf	1450,0
	lim sup	3845,8

Test de linéarité	SCE	ddl	variance	Fcalculé	Fcritique
regression	113124351156	1	113124351156	45417	7,42
erreur de modele	50214685	7	7173526	2,88	3,20
erreur experimentale	87178475	35	2490814		
Totale	113261744316	43			
Le modèle de régression est acceptable					
Le domaine d'étalonnage choisi est validé					

Limite de détection/quantification	
Limite de détection (µg.L^{-1})	0.13
Limite de quantification (µg.L^{-1})	0.43

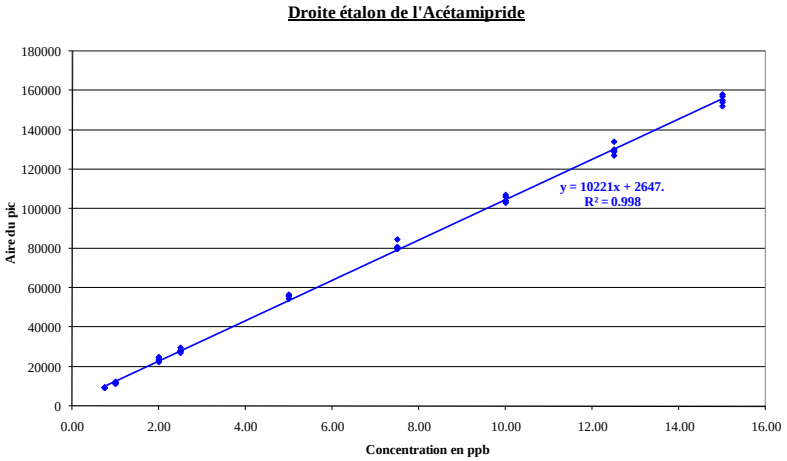


Tableau 28. Etude de linéarité appliquée à la molécule d'acétamipride

Après avoir validé le domaine d'étalonnage et vérifié l'adéquation de la distribution avec le modèle de régression linéaire, en s'assurant que l'erreur relative au modèle est inférieure à l'erreur expérimentale à travers un test de Fisher, les LODs et LOQs peuvent être déterminées. Elles sont calculées à partir de l'écart type relatif au blanc $s(b_0)$ telles que :

$$LOD = \frac{3s(b_0)}{b_1} \quad (88) \; ; \qquad LOQ = \frac{10s(b_0)}{b_1} \quad (89)$$

En appliquant cette méthodologie, l'acétamipride admet une LOD = 0,13 µg.L^{-1} et une LOQ = 0,43 µg.L^{-1} pour un domaine de linéarité compris entre 0,75 et 15 µg.L^{-1}. Elles

correspondent à des concentrations de 1,3 µg.L^{-1} et 4,3 µg.L^{-1} dans l'huile essentielle si l'on tient compte du facteur de dilution.

III.2 Résultats

Les résultats du plan d'optimisation de type A sont exposés dans le Tableau 29. Pour calculer les LODs et LOQs à l'aide des équations (88) et (89), les courbes de calibrations ont été construites en considérant au moins cinq concentrations avec cinq réplicats pour chacune. De plus, elles doivent conduire à un coefficient de détermination supérieur ou égal à 0,99. A noter que l'analyse du témoin d'huile essentielle de lavandin n'a pas révélé la moindre trace de résidus de pesticides. En outre, les molécules d'amidosulfuron, sulfosulfuron, 2,4D et MCPA ne furent pas incluses dans le plan A, les résultats ne concernent donc que 66 des 70 pesticides. En revanche, leur LOD et LOQ ont été estimées expérimentalement à partir des chromatogrammes obtenus lors de l'étude sur les effets matrice et définies comme étant la concentration minimum d'analyte donnant des rapports S/N de 3 et 10 respectivement. L'ensemble des résultats sont régroupés dans le Tableau 29.

Pesticide	t_R (min)	b_0	$s(b_0)$	b_1	R^2	Domaine de linéarité (µg.L^{-1})	LOD (µg.L^{-1})	LOQ (µg.L^{-1})	RSD (%) Maximum
2,4D[a]	6,4						0,066	0,2	
Abamectine	20,6	181,1	69,7	3461,9	0,9947	0,25-2,5	0,06	0,2	9
Acephate	1,9	486,0	421,3	11685,4	0,9970	0,5-7,5	0,11	0,36	5
Acetamipride	3,3	1438,8	358,3	10675,5	0,9981	0,75-7,5	0,11	0,34	4,3
Acibenzolar - S- methyl	13,3	237,2	24,3	364,9	0,9926	0,75-7,5	0,2	0,67	11
Aclonifen	16,5	283,8	86,9	631,4	0,9911	1-12,5	0,41	1,38	17
Acrinathrine	20,2	205,9	72,3	497,0	0,9917	2-12,5	0,44	1,45	15
Amidosulfuron[a]	5,5						0,15	0,5	
Azoxystrobine	11,1	809,3	485,1	51247,0	0,9984	0,1-2,5	0,028	0,09	10
Benalaxyl[**]	16,7	4830,5	791,1	44831,6	0,9994	0,25-10	0,05	0,18	4,8
Bentazone	2,8	11085,6	1992,3	230764,9	0,9980	0,1-2	0,03	0,09	8,5
Bifenthrine	21,4	185,3	30,7	1695,6	0,9957	0,25-2,5	0,05	0,18	4,8
Bromacil	7,6	-63,7	125,2	1179,1	0,9941	1-15	0,32	1,06	14
Buprofezine	19,1	6266,3	446,1	36815,3	0,9989	0,1-5	0,036	0,12	7,7
Butraline	20,1	-61,1	225,6	9375,8	0,9925	0,25-2,5	0,07	0,24	11,6
Carbaryl	8,5	129,0	104,8	7152,2	0,9983	0,1-5	0,04	0,15	10
Carbendazime	4,6	-362,9	165,8	6983,4	0,9995	0,5-7,5	0,07	0,24	7,6
Carbetamide	6,0	944,2	81,3	6412,2	0,9905	0,1-1	0,38	0,13	6,5
Carbofuran	7,5	-1373,9	683,9	37865,7	0,9975	0,1-5	0,054	0,18	9,6
Chlorfenvinphos	16,7	829,9	193,9	12626,6	0,9957	0,1-2,5	0,046	0,15	12,9
Chloridazone	3,5	204,2	79,0	1750,8	0,9953	0,5-7,5	0,14	0,45	15
Chlorpyrifos	19,7	364,5	104,5	1079,3	0,9923	0,75-12,5	0,29	0,97	7,4
Clopyralide	1,8	344,1	45,0	157,3	0,9840	5-15			
Cycloxydime	17,9	295,7	95,4	10973,4	0,9955	0,1-1	0,026	0,09	11,7
Cyhalothrine-λ	19,9	456,7	186,9	471,7	0,957	2-15			
Cyromazine	1,8	57,0	188,9	4563,6	0,9920	0,5-5	0,12	0,41	11
Deltamethrine	20,3	214,8	104,1	1080,4	0,9951	1-15	0,29	0,96	11,6
Dicamba	2,8	400,0	1149,3	3677,6	0,980	5-15			
Difenoconazole	18,0	531,0	215,0	19564,0	0,9991	0,1-5	0,033	0,11	4,9
Diflufenicanil	18,3	162,3	146,5	4441,9	0,9975	0,1-10	0,1	0,33	9,1
Dimethenamide	12,0	263,4	71,2	8490,5	0,9958	0,1-1	0,025	0,08	11,8
Dimethoate	3,4	540,9	92,8	11874,1	0,9964	0,1-1	0,023	0,08	10,6
Diuron	10,4	857,5	113,3	3150,0	0,9970	0,5-7,5	0,11	0,36	7,5
Ethion	19,3	370,1	242,9	17455,1	0,9965	0,1-2,5	0,04	0,14	4,5
Ethofumesate	11,4	415,6	159,2	3991,8	0,9973	0,75-7,5	0,12	0,4	7,6
Ethoprophos	14,7	675,7	174,7	5194,8	0,9974	0,5-7,5	0,1	0,34	10,6
Fluazifop-p-butyl	18,7	780,8	509,0	38448,5	0,9968	0,1-2,5	0,04	0,13	7,3
Flurochloridone	12,9	281,6	59,7	1052,8	0,9964	0,75-10	0,17	0,57	7,4
Fluroxypyr	3,1	129,9	43,7	477,2	0,9945	1-12,5	0,27	0,92	9,2

Pesticide	t_R (min)	b_0	$s(b_0)$	b_1	R^2	Domaine de linéarité (µg.L^{-1})	LOD (µg.L^{-1})	LOQ (µg.L^{-1})	RSD (%) Maximum
Haloxyfop	12,2	615,2	101,4	5862,8	0,9991	0,25-7,5	0,05	0,17	4,7
Iprodione	15,1	45,5	132,8	722,0	0,9907	2,5-15	0,6	1,84	9
Isoproturon	10,0	475,6	173,8	21423,2	0,9961	0,1-1	0,024	0,81	9,6
Isoxaben	11,9	4865,5	925,6	34526,5	0,9992	0,5-12,5	0,08	0,27	8,9
Lenacile	10,1	-1758,5	485,8	6752,1	0,9967	0,75-15	0,22	0,72	6
Linuron	11,8	132,0	69,6	1392,3	0,9963	0,5-10	0,15	0,5	9,4
MCPA[a]	7,1						0,08	0,25	
Mecoprop	9,3	3025,6	624,1	24773,8	0,9980	0,25-7,5	0,08	0,25	5,3
Mefenoxam	9,9	458,7	255,2	25959,2	0,9943	0,1-1	0,029	0,1	8,5
Metamitrone	3,7	-11,8	67,6	963,6	0,9945	0,75-10	0,21	0,7	14,2
Metazachlore	9,9	540,8	216,5	31905,3	0,9973	0,1-1	0,02	0,07	7,3
Methomyl	2,3	357,7	184,0	18695,1	0,9970	0,1-2	0,03	0,1	10,9
Monocrotophos	2,3	430,3	131,6	18801,1	0,9970	0,1-1	0,02	0,07	14,7
Napropamide	14,8	705,1	202,2	18094,9	0,9966	0,1-2	0,03	0,11	9,4
Norflurazon	10,3	319,5	122,2	13156,2	0,9977	0,1-2	0,03	0,09	14,2
Oryzaline	14,0	932,0	266,6	16173,3	0,9951	0,1-2,5	0,05	0,16	7,4
Oxadiazon	19,2	429,0	149,9	7945,7	0,9936	0,1-2,5	0,06	0,19	12
Oxyfluorfene	18,7	173,6	53,7	282,7	0,9901	2-15	0,6	1,9	15
Pendimethaline	19,9	510,4	228,7	5022,7	0,9913	0,5-5	0,14	0,46	8,8
Pirimicarbe	9,5	464,5	232,0	48805,8	0,9987	0,1-1	0,014	0,05	10,8
Prometryne	14,6	591,6	399,3	34021,0	0,9977	0,1-2,5	0,04	0,12	8,3
Propiconazole	16,9	144,8	78,1	2316,4	0,9952	0,5-5	0,1	0,34	13,2
Propyzamide	12,6	6,3	68,5	1918,2	0,9981	0,5-10	0,11	0,36	9,4
Prosulfocarbe	18,6	1277,5	410,0	16393,0	0,9919	0,25-2,5	0,08	0,25	8,4
Pymetrozine	2,1	384,5	241,5	9547,6	0,9970	0,5-5	0,08	0,25	4,9
Quizalofop-p-ethyl	18,9	833,7	232,9	22463,5	0,9971	0,1-2	0,03	0,1	11,4
Simazine	8,1	123,9	76,3	4180,6	0,9980	0,25-5	0,05	0,18	8,7
Sulfosulfuron[a]	8,8						0,15	0,5	
Tau-fluvalinate	20,5	533,7	85,2	2788,0	0,9978	0,5-7,5	0,09	0,31	6
Tebuconazole	16,3	-225,1	189,3	6866,3	0,9993	0,25-15	0,08	0,28	4,7
Triclopyr	8,1	118,3	15,4	286,1	0,9951	0,75-7,5	0,16	0,54	7,3

[a] Non inclus dans le plan A.

Tableau 29. Résultats du plan d'expérience de type A

Compte tenu des résultats du Tableau 29, la méthode d'analyse a démontré suffisament de sensibilité pour être appliquée à l'analyse quantitative de pesticides dans l'huile essentielle de lavandin. Les domaines de linéarité, LODs et LOQs exposés dans le Tableau 29 se réfèrent à la transition de quantification et aux concentrations finales d'injection. En considérant le facteur de dilution au 1/10^e, 9 des 70 pesticides admettent une LOQ inférieure ou égale à 1 µg.L^{-1}. De plus, 44 substances actives montrent une LOQ comprise entre 1 et 5 µg.L^{-1}, 9 entre 5 et 10 µg.L^{-1} et 5 entre 10 et 20 µg.L^{-1}. Trois pesticides n'ont pas pu être validés à cause d'un problème de linéarité ($R^2 < 0,99$) : la clopyralide, le dicamba et la cyhalothrine-λ.

La répétabilité de la méthode, exprimée par le coefficient de variation ou RSD (Relative Standard Deviation), a été calculée sur la base des cinq réplicats effectués pour chaque concentration. Le Tableau 29 rapporte que le RSD maximum observé sur le domaine de linéarité de chaque pesticide est acceptable, puisque tous les RSDs sont inférieurs à 17 % (aclonifen). De plus, une linéarité satisfaisante a été observée pour tous les pesticides, au moins sur le domaine d'étalonnage défini. Par conséquent, si une quantification précise des pesticides est requise, la méthode des ajouts dosés devrait être applicable. En complément de cette validation, la méthode a été appliquée à l'analyse de cinq échantillons réels.

IV. Analyse d'échantillons réels d'huile essentielle de lavandin

Trois échantillons de lavandins d'origines différentes fournis par l'Oréal (lot A, B et C), ainsi qu'un échantillon de lavandin bio et un échantillon de lavande AOC achetés dans le commerce, ont été analysés avec la méthode analytique précédemment validée. La quantification a été réalisé au moyen de points de gamme matrice préparés dans l'huile essentielle de lavandin bio mais également avec la méthode des ajouts dosés.

De manière à quantifier les teneurs en pesticides présents dans les échantillons, trois points de calibration matrice aux concentrations de 1, 10 et 100 µg.L^{-1} ont été préparés à partir de l'échantillon d'huile essentielle de lavandin bio ayant servi lors de la validation.

- HE Lavandin bio surchargé à 100 µg.L^{-1} : 970 µL d'huile essentielle de lavandin bio + 10 µL de 3 mélanges à 10 mg.L^{-1} contenant les 70 substances actives.
- HE Lavandin bio surchargé 10 µg.L^{-1} : 450 µL d'huile essentielle de lavandin bio + 50 µL d'huile essentielle de lavandin bio surchargé à 100 µg.L^{-1}.
- HE Lavandin surchargé 1 µg.L^{-1} : 450 µL d'huile essentielle de lavandin bio + 50 µL d'huile essentielle de lavandin bio surchargé à 10 µg.L^{-1}.

Les ajouts dosés ont été préparés en surchargeant les échantillons avec 10 µL d'un mélange de pesticides à 1 mg.L^{-1} dans 990 µL d'échantillon de manière à obtenir une surcharge en pesticides égale à 10 µg.L^{-1}.

Les échantillons, ainsi que les huiles essentielles surchargées (points de gamme et ajouts dosés), ont été dilués au 1/10^{e} en mélangeant 100 µL d'huile essentielle avec 900 µL de méthanol acidifié avec 1 % d'acide acétique.

Sur les cinq huiles essentielles, deux échantillons se sont révélés positifs. Le premier est le lot C pour lequel le chlorpyrifos-éthyl (Tableau 29 : LOQ_{HE} = 9,7 µg.L^{-1}) a pu être détecté et quantifié, comme le montre le Tableau 30.

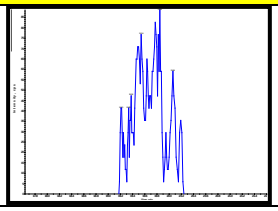
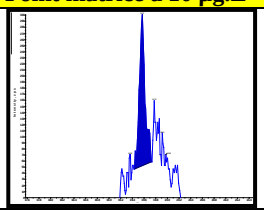
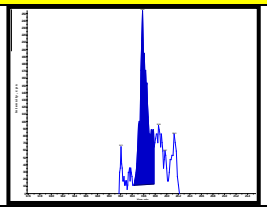
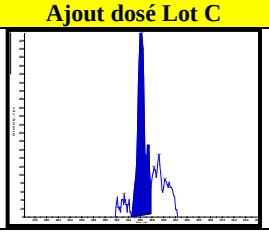
Témoin	Point matrice à 10 µg.L^{-1}	Lot C	Ajout dosé Lot C
			
	Aire = 1670 S/N = 14	Aire = 2080 S/N = 18	Aire = 3920 S/N = 37

Tableau 30. Chromatogrammes du chlorpyrofos-éthyl dans le témoin et l'échantillon lot C

Les concentrations en chlorpyrifos-éthyl, calculées à partir du point de gamme matrice à 10 µg.L^{-1} ou de l'ajout dosé à 10 µg.L^{-1}, sont très proches, respectivement égales à 12,4 µg.L^{-1} et 11,3 µg.L^{-1}.

Dans l'huile essentielle de lavande AOC, c'est la substance active diflufenican (Tableau 29 : LOQ_{HE} = 3,3 µg.L^{-1}) qui a été détectée et quantifiée (Tableau 31).

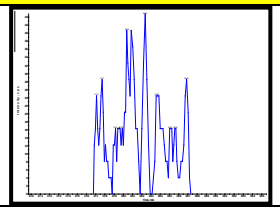
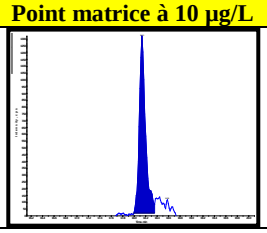
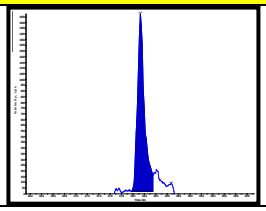
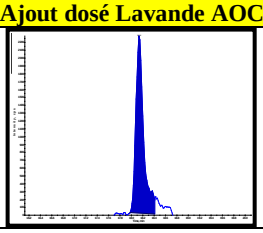
Témoin	Point matrice à 10 µg/L	Lavande AOC	Ajout dosé Lavande AOC
			
	Aire = 9810 S/N = 270	Aire = 13300 S/N = 220	Aire = 21600 S/N = 285

Tableau 31. Chromatogrammes du diflufenican dans le témoin et l'échantillon lot C

De même que pour le chlorpyrifos-éthyl, la concentration en diflufenican selon qu'elle soit calculée par rapport au point de gamme matrice ou à l'ajout dosé est sensiblement la même, respectivement égale à 13,5 µg.L^{-1} et 16,0 µg.L^{-1}.

V. Conclusion

L'étude des conditions chromatographiques dans le cas d'une injection dans un solvant organique pur a permis d'établir les conditions d'analyse optimales. Ainsi, il a pu être mis en évidence que l'acidification des phases mobiles avec 0,1 % d'acide acétique conduisait aux meilleurs résultats. Concernant l'injection, un volume de 20 µL de méthanol acidifié avec 1 % d'acide acétique semble être le compromis le plus adapté.

Après avoir mis en évidence la manifestation d'effets matrice, les limites de détection et de quantification de 67 des 70 substances actives ont pu être validées statistiquement dans l'huile essentielle de lavandin grâce à l'application d'un plan d'expérience de type A. Sur ces 67 pesticides, 62 admettent une limite de quantification inférieure à 10 µg.L^{-1} et 5 entre 10 et 20 µg.L^{-1}. La méthode analytique a ensuite été appliquée à quatre échantillons réels d'huile essentielle de lavandin et un échantillon de lavande AOC.

L'analyse de ces échantillons a révélé la présence de deux substances actives à des teneurs supérieures à leur limite de quantification : le chlorpyrifos-éthyl a été détecté à une

concentration de 11,3 µg.L^{-1} dans l'échantillon « lot C » et le diflufenican à une concentration de 16 µg.L^{-1} dans l'échantillon de lavande AOC. Il est particulièrement intéressant de noter que le diflufenican est une substance active référencée par l'ACTA comme étant appliquée sur les cultures de lavande et lavandin.

Cette étude a permis de démontrer la faisabilité de la mise en place d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles consistant en une dilution au 1/10^{e} suivie d'une injection directe en LC-MS/MS.

C) Analyse d'huiles essentielles peu solubles dans le méthanol : le cas de l'huile essentielle de citron

Certaines variétés d'huiles essentielles, telles que celles provenant des hespéridés, posent un problème de solubilité dans le méthanol du fait de la présence de fractions lourdes comme les cires. En effet, la dilution de l'huile essentielle de citron, par exemple, provoque la formation de microbulles en suspensions. C'est pourquoi plusieurs méthodes de purification ont été testées sur cette huile essentielle en vue d'éliminer les cires et d'obtenir un extrait bien homogène. La non-solubilité de l'huile essentielle de citron dans le méthanol pourrait avoir plusieurs conséquences sur les résultats. En plus des éventuels problèmes de répétabilité lors des injections dus à l'hétérogénéité de la solution, se pose la question de savoir si une partie des pesticides ne s'adsorbent pas sur les cires, ce qui pourrait occasionner un biais dans le dosage.

L'ajout d'une étape de purification visant à éliminer les cires a donc été mise en place à travers le test de quatre protocoles. Une fois la préparation d'échantillon déterminée, la méthode a été appliquée aux dosages de fractions d'huiles essentielles de citron et d'une huile essentielle d'orange dans le cadre d'un essai interlaboratoire.

I. Mise en place d'une méthode de purification adaptée

Le procédé envisagé pour retirer les cires de l'huile essentielle de citron est d'abaisser la température de la solution afin de faire précipiter les cires. Deux types de congélations ont été testés : la congélation dans l'azote liquide et la congélation classique à environ -18°C. Parallèlement à ces deux méthodes, une simple centrifugation et une injection après dilution ont également été expérimentées pour évaluer l'utilité de la congélation. Les expériences ont été conduites sur 32 substances actives.

I.1 Protocole

En vue de comparer les quatre méthodes de préparation décrites dans la Figure 86, le protocole suivant a été établi. L'huile essentielle de citron a été surchargée à 100 µg.L^{-1} en mélangeant 2,450 mL d'huile essentielle de citron avec 25 µL de deux mélanges contenant l'ensemble des substances actives à 10 mg.L^{-1}.

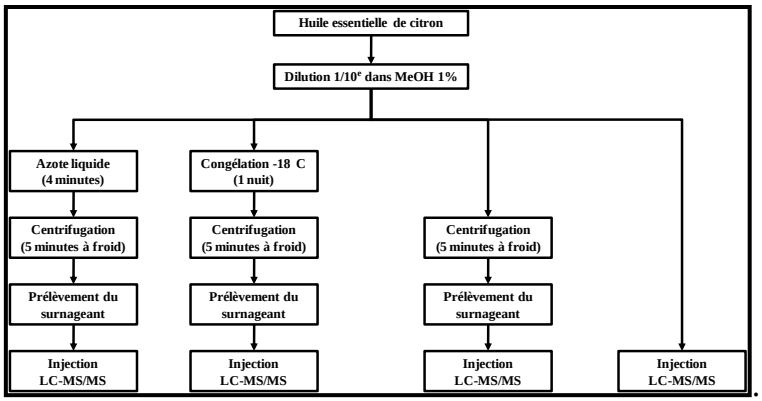


Figure 86. Protocole des essais de purification sur l'huile essentielle de citron

Cinq taux de récupération et un témoin ont été réalisés pour chacune des méthodes. Le témoin a permis de préparer des points de gamme matrice et ainsi calculer le taux de récupération des pesticides. Trois points de gamme à 10 µg.L^{-1} (90 µL de témoin + 10 µL d'un point solvant à 100 µg.L^{-1}) ont été systématiquement effectués afin d'évaluer l'influence de la préparation du témoin sur la répétabilité.

Il est important de remarquer que la quantité de cires précipitée est visuellement plus importante dans le cas de l'azote liquide d'un facteur de l'ordre de 1,5 à 3 par rapport à la congélation et à la centrifugation.

I.2 Résultats et discussion

Les quatre méthodes de préparation ont été comparées au moyen de l'étude de la répétabilité des points de gamme, des taux de récupération, et de l'importance des effets matrice.

La répétabilité des points de gamme a été évaluée à partir des coefficients de variation des aires des pesticides, obtenues pour les trois points de gamme des quatre méthodes de préparation (Tableau 32). Pour chaque pesticide, le meilleur CV obtenu parmi les quatre procédés est surligné en bleu.

	CV_{azote}	$CV_{congélation}$	$CV_{centrifugation}$	$CV_{dilution}$
Abamectine	1,9	8,3	4,1	6,7
Acephate	1,1	9,1	5,3	3,9
Acibenzolar-S-méthyl	2,8	4,9	3,1	4,7
Aclonifen	5,4	13,4	13,2	7,0
Acrinathrine	6,6	6,4	2,1	6,4
Amidosulfuron	0,6	4,3	3,4	5,4
Azoxystrobine	1,2	5,6	1,6	3,3
Bifenthrine	4,3	6,9	1,7	2,7
Buprofézine	1,1	5,4	3,0	2,0
Butraline	4,4	4,8	2,1	5,5
Carbétamide	0,2	5,8	2,0	2,8
Chloridazone	0,3	4,3	3,2	4,3
Chlorpyrifos	5,3	12,1	3,4	6,5
Cycloxydime	3,3	8,8	0,8	3,3
Cyhalothrine-(λ)	3,3	4,0	14,1	8,3

	CV_{azote}	$CV_{congélation}$	$CV_{centrifugation}$	$CV_{dilution}$
Dimethenamid	0,1	8,0	3,9	0,7
Ethoprophos	1,5	5,3	1,4	1,5
Fluazifop-p-butyl	1,2	4,9	0,6	2,5
Iprodione	3,4	4,6	9,6	6,4
Isoxaben	1,9	4,5	6,1	1,0
Lénacile	0,1	6,6	2,0	4,4
Linuron	4,6	5,9	4,6	2,2
Méfénoxam	1,7	5,9	1,5	1,7
Métamitrone	6,2	6,7	7,6	2,0
Monocrotophos	2,3	5,9	2,8	2,3
Napropamide	2,0	7,7	1,1	1,4
Norflurazon	1,1	6,0	1,7	4,4
Prometryn	1,3	5,4	2,7	3,0
Pymetrozin	2,2	10,9	1,8	3,6
Simazine	2,8	4,5	0,9	0,6
Tau-fluvalinate	12,3	12,2	12,3	6,0
Tebuconazole	1,1	4,2	3,7	3,4
Nombre de meilleur CV	17	0	10	5

Tableau 32. Répétabilité des points de gamme exprimée en CV (%) en fonction du procédé de purification

Les points de gammes préparés avec le « témoin azote » assurent pour la majorité des substances actives une meilleure répétabilité qui peut être attribuée à une homogénéité supérieure de la solution.

Les taux de récupération moyen (TR_{moy}) calculés pour les quatre procédés à partir des cinq répétats sont exposés dans le Tableau 33 avec leur CV correspondant.

	TR_{moy} (%)				CV (%)			
	azote	**congélation**	**centrifugation**	**dilution**	**azote**	**congélation**	**centrifugation**	**dilution**
Abamectine	105,6	102,8	111,1	113,5	1,6	1,8	2,1	4,6
Acephate	109,1	100,4	100,5	105,7	2,7	1,7	4,4	5,0
Acibenzolar-S-méthyl	93,7	96,9	96,9	93,3	1,8	3,4	4,1	2,9
Aclonifen	99,7	79,9	108,9	83,5	5,0	13,1	8,3	1,5
Acrinathrine	88,0	99,7	96,0	98,4	5,4	6,9	6,7	2,9
Amidosulfuron	107,7	106,2	114,2	109,3	3,4	1,7	2,1	0,5
Azoxystrobine	100,8	94,5	98,6	96,6	2,5	2,4	2,6	1,4
Bifenthrine	92,3	92,8	101,6	95,8	3,6	1,9	3,5	3,0
Buprofézine	106,2	102,1	110,7	107,7	3,1	2,8	2,7	2,0
Butraline	101,1	107,8	112,6	107,5	3,0	3,3	4,3	3,1
Carbétamide	107,8	106,3	107,7	105,8	2,7	1,9	2,1	1,5
Chloridazone	105,9	104,7	111,1	107,4	4,1	1,8	4,2	1,9
Chlorpyrifos	91,2	92,1	103,8	96,4	4,7	4,1	1,8	7,0
Cycloxydime	101,0	102,6	108,7	101,2	5,1	2,4	6,2	1,4
Cyhalothrine-(λ)	106,4	99,4	95,6	87,2	6,3	8,0	9,6	7,7
Dimethenamid	97,1	94,6	98,4	96,5	2,0	1,0	3,2	1,0
Ethoprophos	96,4	90,3	97,3	92,9	2,3	3,0	3,5	2,9
Fluazifop-p-butyl	106,3	102,3	106,4	105,4	3,0	1,9	2,2	2,2
Iprodione	94,3	97,1	105,7	92,9	6,2	10,7	7,1	4,7
Isoxaben	106,5	105,8	112,1	110,1	3,7	3,6	3,4	2,2
Lénacile	114,1	104,4	115,7	107,7	3,1	3,9	4,8	2,5
Linuron	111,6	101,5	108,8	107,2	4,3	2,5	1,8	2,6
Méfénoxam	98,7	93,5	98,3	97,8	2,7	1,3	1,2	1,5
Métamitrone	80,4	100,7	74,9	71,6	3,9	1,4	7,3	3,2
Monocrotophos	109,1	107,7	111,0	107,6	2,5	2,7	1,1	1,2
Napropamide	110,2	100,5	108,0	103,4	1,6	1,9	2,5	2,4
Norflurazon	103,3	99,6	107,1	106,3	2,6	2,1	2,7	2,8
Prometryn	106,2	103,6	108,6	106,4	2,8	2,3	0,7	1,2
Pymetrozin	111,7	104,6	108,5	110,2	2,0	2,3	1,7	1,7
Simazine	97,0	94,2	99,3	95,2	1,8	2,9	1,0	3,3
Tau-fluvalinate	100,4	95,9	107,7	92,7	6,4	6,3	8,1	9,4
Tebuconazole	94,5	96,1	99,6	95,0	3,0	2,3	2,6	2,0

Tableau 33. TR_{moy} et CV en % obtenus pour chaque pesticide en fonction du procédé de purification

Les taux de récupération et les coefficients de variation sont conformes au guide SANCO.[252] Ils sont en effet inclus dans l'intervalle 70-120 % pour les TRs et inférieurs à 20 % pour les CVs et ce, pour toutes les méthodes. La très grande majorité des TRs sont d'ailleurs compris entre 95 et 105 %. Seuls quatre composés possèdent des rendements un peu plus faibles, qui dépendent du procédé de purification. Il s'agit de :

- l'aclonifen (congélation : 79,9 % ; dilution : 83,5 %) ;
- l'acrinathrine (azote : 88 %) ;
- la cyhalothrine-λ (dilution : 87,2 %) ;
- la métamitrone (azote : 80,4 % ; centrifugation : 74,9 % ; dilution : 71,6 %).

Il faut bien mentionner que ces résultats ne mettent pas en évidence la supériorité d'une méthode par rapport à une autre. Les quatre méthodes sont adaptées à l'analyse des pesticides dans l'huile essentielle de citron. Au vue de ces résultats, il semblerait donc que l'adsorption des pesticides par les cires soit minime et ne concernerait que quelques substances. Toutefois, les TRs_{moy} et CVs obtenus pour ces molécules sont tout de même satisfaisants et assurent d'une bonne quantification.

La méthode de purification a donc peu d'influence sur la quantification. Néanmoins, pour des résultats équivalents, il est préférable de privilégier une purification car l'injection de cires peut causer un encrassement du système LC-MS/MS, de même qu'avoir une influence sur les effets matrice.

Dans le but d'évaluer l'influence de la méthode de purification, les effets matrice observés suite à une purification dans l'azote liquide ont été comparés à ceux des autres méthodes. Les effets matrice ont été calculés pour chaque pesticide à l'aide de la relation (90).

$$EM\ (\%) = \frac{[Aire\ du\ point\ de\ gamme\ matrice\ 10\,\mu g.L^{-1}]}{[Aire\ du\ point\ de\ gamme\ solvant\ 10\,\mu g.L^{-1}]} \times 100 \qquad (90)$$

Pour chaque substance active l'effet matrice le plus faible, entre les deux méthodes comparées, a été surligné en bleu dans le Tableau 34. Seule une différence supérieure à 5 % entre les effets matrice a été considérée comme significative.

	EM azote	EM dilu	EM azote	EM centri	EM azote	EM cong
Abamectine	26,9	21,7	26,9	26,5	26,9	32,6
Acéphate	7,3	12,1	7,3	19,4	7,3	22,5
Acibenzolar-S-méthyl	21,4	21,2	21,4	17,8	21,4	17,3
Aclonifen	-38,8	-33,2	-38,8	-33,9	-38,8	-33,9
Acrinathrine	-9,0	-19,5	-9,0	-12,9	-9,0	-12,0
Amidosulfuron	16,6	19,2	16,6	15,6	16,6	19,6
Azoxystrobine	11,3	27,3	11,3	23,4	11,3	23,3
Bifenthrine	31,2	21,5	31,2	29,7	31,2	29,7
Buprofézine	-0,6	-0,6	-0,6	-2,4	-0,6	3,7
Butraline	10,2	4,1	10,2	0,4	10,2	5,7
Carbétamide	9,6	18,3	9,6	14,8	9,6	14,9
Chloridazone	9,9	11,8	9,9	7,9	9,9	12,8
Chlorpyrifos	22,1	15,4	22,1	11,5	22,1	23,8
Cycloxydime	-8,0	-11,4	-8,0	-13,3	-8,0	-7,3
Cyhalothrine-(λ)	7,9	15,8	7,9	14,9	7,9	13,2
Dimethenamid	7,1	14,3	7,1	12,8	7,1	13,3
Ethoprophos	-20,5	-16,5	-20,5	-19,4	-20,5	-15,2
Fluazifop-p-butyl	-3,9	-3,4	-3,9	-3,2	-3,9	0,0
Iprodione	-1,3	11,6	-1,3	0,0	-1,3	-0,2
Isoxaben	18,9	17,9	18,9	18,2	18,9	19,8
Lénacile	10,4	15,4	10,4	11,0	10,4	15,8
Linuron	0,0	2,6	0,0	3,4	0,0	8,3
Méfénoxam	17,4	23,9	17,4	22,6	17,4	25,0
Métamitrone	4,8	8,5	4,8	6,9	4,8	8,7
Monocrotophos	8,8	13,5	8,8	11,3	8,8	12,5
Napropamide	-15,7	-10,8	-15,7	-11,9	-15,7	-10,0
Norflurazon	-17,7	-24,5	-17,7	-21,6	-17,7	-16,8
Prométryne	-17,6	-14,4	-17,6	-17,3	-17,6	-15,0
Pymétrozine	10,9	15,4	10,9	16,6	10,9	21,0
Simazine	13,3	15,9	13,3	11,9	13,3	17,5
Tau-fluvalinate	-85,8	-84,1	-85,8	-85,9	-85,8	-84,9
Tébuconazole	7,9	8,2	7,9	6,7	7,9	7,9
Nbr d'EM plus faibles	10	5	8	2	9	2

Tableau 34. Etude de l'influence de la méthode de purification sur les effets matrice (EM) en %

Globalement, les résultats du Tableau 34 mettent en évidence des effets matrice moins élevés dans le cas où l'huile essentielle de citron est purifiée dans l'azote liquide. A noter l'importance de l'effet matrice dans le cas du tau-fluvalinate qui admet une diminution de son signal d'environ 85 % quelque soit la méthode.

I.3 Conclusion

Compte tenu des résultats obtenus, la méthode de préparation de l'huile essentielle de citron la plus appropriée est la congélation des extraits dans l'azote liquide. Cette étape de purification permet de faire précipiter les cires de l'huile essentielle en quantité plus importante que les autres méthodes testées, notamment la congélation à -18 °C qui nécessite de surcroît, davantage de temps (une nuit). Le traitement à l'azote liquide semble avoir une influence sur les effets matrice qui sont dans l'ensemble moins prononcés et prévient surement de l'encrassement de la colonne chromatographique et/ou du spectromètre de masse, point très important dans le cadre d'analyse de routine.

Les taux de récupération sont très satisfaisants puisque compris entre 90 et 115 % à l'exception de deux molécules. L'acrinathrine et la métamitrone admettent en effet des TRs inférieurs à 90 %, respectivement 88 % et 80 %. Ces TRs restent néanmoins très corrects. D'après les TRs admis par l'ensemble des pesticides, leur éventuelle adsorption sur les cires ne se révèle pas significative.

La méthode de préparation pour l'huile essentielle de citron, qui sera probablement étendue à toutes les huiles essentielles d'hespéridés, est résumée dans la Figure 87.

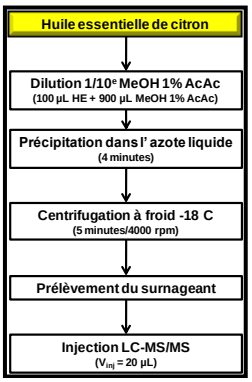


Figure 87. Synopsis de la méthode de préparation pour l'analyse de l'huile essentielle de citron

La centrifugation à froid à -18 °C qui fait suite à la congélation dans l'azote liquide permet de garder compactes les cires au fond du vial et de faciliter le prélèvement du surnageant. Cette méthode a ainsi pu être testée sur deux types d'échantillons réels : des fractions d'huiles essentielles de citron ayant subi différents traitements et sur une huile essentielle d'orange provenant d'un essai inter-laboratoire FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme).

II. Application à l'analyse d'échantillons réels

Quatre fractions d'huile essentielle de citron ont été analysées avec la méthode analytique précédemment décrite. Les fractions, naturellement contaminées en pesticides, proviennent de différents traitements de l'huile essentielle de citron :

- HE 1 : huile essentielle de citron sans traitement ;
- HE 2 : fraction volatile correspondant au distillat de l'huile essentielle de citron obtenue à l'issue d'une distillation.
- HE 3 : fraction correspondant au surnageant de l'huile essentielle de citron après une précipitation par glaçage ;
- HE 4 : fraction correspondant au surnageant de l'huile essentielle de citron après homogénéisation et repos.

Ces fractions ont fait l'objet de deux séries d'analyse, la première pour détecter et estimer la concentration des pesticides, la seconde pour évaluer l'influence d'une agitation avant le prélèvement sur la répétabilité du dosage. Lors de ces analyses, le screening de pesticides était constitué d'environ 200 substances actives (Annexe 13).

II.1.1. Analyse par LC-ESI/sSRM

Parallèlement à l'analyse des fractions, quatre points de gamme extraits ont été préparés à partir de l'huile essentielle de citron bio. Une douzaine de pesticides ont été détectés dans les fractions (0). Les concentrations en $\mu g.L^{-1}$ ont été calculées à partir du point de gamme le plus proche de la concentration estimée 0,1, 0,5, 1, 5 $\mu g.L^{-1}$.

Pesticides	HE 1 (normale)	HE 2 (distillation fraction volatile)	HE 3 (glacé+précipitation)	HE 4 (Homogénisation Repos + surnageant)
Azimphos méthyl	4	< LOD	4,42	4,60
Buprofézine	12,5	< LOD	13,8	10,5
Carbaryl	2,7	< LOD	3,16	3,2
Chlorpyrifos	34	< LOD	35	31,2
Fénazaquin	16,8	< LOD	15,4	12,3
Fenthion sulfoxide	6,7	< LOD	6,9	6,6
Hexythiazox	5,1	< LOD	4	4,9
Malathion	5,5	< LOD	7,3	7,2
Méthidathion	76	< LOD	70	73
Phosmet	1,52	< LOD	1,78	1,6
Tébuconazol	4,9	< LOD	4,1	4,1
Endosulfan sulfate	1,06	< LOD	1,14	1,14

Tableau 35. Concentrations en $\mu g.L^{-1}$ des pesticides détectés dans les fractions d'huiles essentielles de citron

Les substances actives en blancs ne font pas parties de la liste des molécules fournie par L'Oréal. Le Tableau 36 présente le bilan de la détection pour cette liste de molécules détectées lors d'une analyse réalisée par un laboratoire *x*.

Substances actives à rechercher	Etat de la détection
Azimphos méthyl	Quantifiée (0)
Bromopropylate	**Non analysé**
Chlorpyrifos methyl	**Non détecté (LOQ~100ppb)**
Chlorpyrifos ethyl	Quantifiée (0)
Diazinon	**Non détecté (LOQ~5 ppb)**
Dicofol	**Non analysé**
Diméthoate	**Non détecté (LOQ~5 ppb)**
Diphénylamine	**Non détecté (LOQ~50 ppb)**
Fénitrothion	**Non analysé**
Fenthion	Le métabolite sulfoxide a été Quantifiée (0)
Malathion	Quantifiée (0)
Méthidathion	Quantifiée (0)
Ortho-phenylphenol	**Non analysé**
Parathion méthyl	**Non analysé**
Parathion éthyl	**Non détecté (LOQ~50 ppb)**
Pendiméthaline	**Non détecté (LOQ~5 ppb)**
Phosalone	**Non détecté (LOQ~5 ppb)**
Pipéronyl butoxide	**Non détecté (LOQ~5 ppb)**
Quinalphos	**Non détecté (LOQ~10 ppb)**
Sulfotep	**Non détecté (LOQ~5 ppb)**
Trifluraline	**Non analysé**

Tableau 36. Bilan de la détection concernant la liste des substances actives à rechercher fournie par l'Oréal

Suite à ces résultats qui diffèrent de ceux attendus en termes de pesticides détectés mais aussi de concentrations, la question de la répétabilité de l'analyse s'est posée. En effet, les différentes fractions ne présentent pas le même aspect, certaines ont beaucoup plus de matières en suspension que les autres. La question de l'impact de l'homogénéité de la solution lors du prélèvement s'est alors posée, conduisant à la mise en place d'un protocole pour étudier son influence.

II.1.2. Seconde série d'analyse : évaluation de la répétabilité du prélèvement

Les quatre fractions HE1, HE2, HE3 et HE4 ont été analysées de deux façons différentes. Trois répétats ont été effectués avec un prélèvement avant agitation, et trois avec un prélèvement après agitation, suivant le protocole illustré dans la Figure 83.

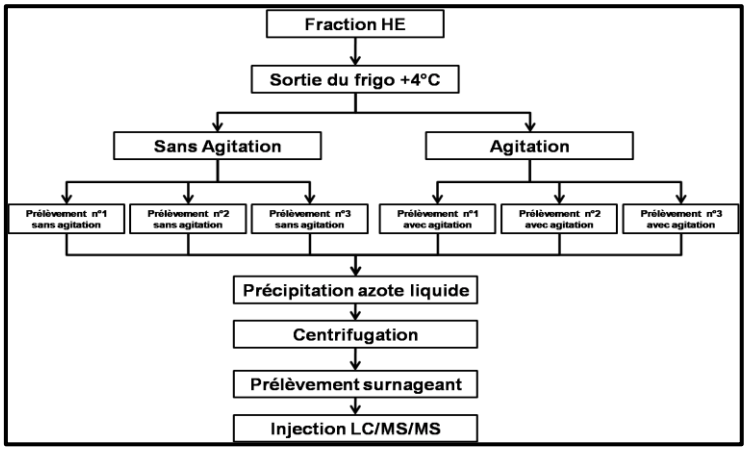


Figure 88. Illustration du protocole permettant d'évaluer l'impact de l'homogénéité de l'huile essentielle sur les concentrations détectées et sur la répétabilité de l'analyse

Les concentrations des pesticides détectés (en µg.L^{-1}), ainsi que leur CV (en %), calculés à partir des concentrations détectées pour les trois répétats, sont réportés dans le Tableau 37. Les résultats concernant l'HE2 ne sont pas exposés puisqu'aucun résidu n'a été détecté. L'endosulfan sulfate n'est pas présent non plus car les essais n'ont été injectés qu'en mode ESI+.

	HE1				HE3				HE4			
	Sans agitation		Avec agitation		Sans agitation		Avec agitation		Sans agitation		Avec agitation	
	Moyenne	CV	Moyenne	CV	Moyenne	CV	Moyenne	CV	Moyenne	CV	Moyenne	CV
Azimphos méthyl	7,2	2,9	6,6	4,8	4,6	11,9	4,2	4,8	4,0	7,7	3,4	6,7
Buprofézine	15,3	1,9	13,9	4,8	10,6	6,7	10,2	1,5	9,7	1,2	8,2	3,7
Carbaryl	3,6	2,5	3,5	1,3	3,2	5,4	3,0	5,1	2,7	9,4	2,5	6,9
Chlorpyrifos	33,1	3,7	29,8	25,7	27,5	0,0	23,9	18,4	22,2	5,2	20,6	3,1
Fenazaquin	23,9	5,5	25,3	3,1	19,7	18,4	24,2	6,8	24,4	1,6	23,8	2,7
Fenthion sulfoxide	6,0	3,5	5,8	4,3	4,9	7,2	4,8	8,4	4,2	8,2	3,5	7,1
Hexythiazox	6,7	5,9	6,5	6,2	4,4	7,9	3,7	11,0	3,7	6,2	3,3	28,9
Malathion	7,7	3,7	8,0	10,8	9,3	6,7	9,2	4,1	9,1	5,6	8,2	7,0
Méthidathion	157,3	5,1	159,7	4,4	138,7	6,9	132,7	3,9	165,7	1,3	155,0	2,8
Phosmet	2,6	2,2	2,4	4,7	2,0	10,2	1,9	5,5	2,0	5,0	1,7	3,5
Tébuconazole	3,5	0,0	3,4	8,6	2,8	7,1	2,7	2,1	2,7	7,8	2,6	4,4

Tableau 37. Concentration en pesticides (µg.L^{-1}) et répétabilité (CV en %) en fonction de l'agitation ou non de l'extrait

Il est difficile de tirer une tendance générale des résultats obtenus au cours de ces essais. Les concentrations détectées sont comparables avec ou sans agitation même si une baisse des concentrations est observée dans chaque cas pour les prélèvements avec agitation. En fait, les concentrations ont tendance à diminuer de la gauche vers la droite du tableau, ce qui correspond à l'ordre d'injection des fractions d'huile essentielle. Cette baisse peut être due à un encrassement de la colonne et/ou du spectromètre de masse.

La répétabilité de l'analyse, exprimée par les CVs ne semble pas être influencée par l'agitation de l'huile essentielle avant le prélèvement. En effet, aucune variation significative des CVs pour l'ensemble des pesticides favorisant l'une ou l'autre des méthodes n'est constatée. La modification des CVs en fonction du prélèvement et de la fraction n'est pas unilatérale pour un même pesticide. C'est-à-dire que, dans une fraction d'huile essentielle, une augmentation du CV peut avoir lieu en cas d'agitation (ex : HE1 buprofézine) et dans une autre fraction, l'inverse sera observé (ex : HE3 : buprofézine).

A l'exception de quelques coefficients de variation élevés (surlignés en bleu), la répétabilité des concentrations détectées est généralement satisfaisante quel que soit le mode de prélèvement, avec des CV inférieurs à 10 %.

II.1.3. Conclusion

L'analyse des fractions d'huile essentielle a montré que la distillation permettait de traiter efficacement les pesticides puisqu'aucun résidu n'a pu être détecté dans la fraction HE2. Concernant les trois autres fractions, douze pesticides ont été détectés à des teneurs équivalentes. Il faut remarquer que les substances actives détectées au GIRPA sont sensiblement différentes de celles *a priori* retrouvées par le laboratoire *x* (Tableau 36). Plusieurs cas sont à distinguer selon que les substances actives aient été détectées par les deux laboratoires, uniquement par le laboratoire *x* ou uniquement par le GIRPA.

Les pesticides détectés par les deux laboratoires sont l'azimphos méthyl, le chlorpyrifos, le malathion, le méthidathion et peut être le fenthion puisque le métabolite sulfoxide de ce dernier est détecté.

Quinze pesticides ont été uniquement détectés par le laboratoire *x*. Parmi eux, on distingue les pesticides bromopropylate, dicofol, fénitrothion, parathion méthyl et trifluraline qui n'ont pas été analysés lors de cette étude puisque ces composés sont dédiés à l'analyse GC-MS. Ensuite, les molécules de chlorpyrifos méthyl, diphénylamine et parathion méthyl admettent des LOQs relativement hautes (LOQ > 50 $\mu g.L^{-1}$) avec la méthode développée. Il est donc tout à fait possible que le laboratoire *x* les ait détectées. En revanche sept molécules (diazinon,

diméthoate, pendiméthaline, phosalone, pipéronil butoxide, quinalphos et sulfotep) n'ont pas été détectées lors de ces analyses alors qu'elles possèdent des LOQs relativement basses (< 10 $\mu g.L^{-1}$) et il est peut probable que l'autre laboratoire dispose d'une méthode avec des LOQ inférieures à celles-ci.

Finalement, il faut signaler que sept autres pesticides ont été détectés par le GIRPA alors qu'ils ne sont pas présents dans la liste demandée. Il s'agit de la buprofézine, du carbaryl, du fénazaquin, de l'hexythiazox, du phosmet, du tébuconazole et de l'endosulfan sulfate.

Les concentrations en résidus détectés sont comparables entre les deux séries d'analyse. Une nette différence est cependant observée pour le méthidation. Elle provient sûrement d'un problème de quantification dû à la contamination du témoin par cette molécule. Les résultats n'ont cependant pas été confirmés par la technique des ajouts dosés. L'homogénéisation de l'huile essentielle ne semble pas être une étape obligatoire. Les concentrations et les CVs sont en effet équivalents, que l'huile soit prélevée avant ou après son agitation.

De manière à évaluer la justesse de la méthode par rapport à d'autres laboratoires, nous avons procédé à l'analyse d'une huile essentielle d'orange distribuée par l'organisme FAPAS lors d'essais inter-laboratoire.[1]

II.2 Analyse d'une huile essentielle d'orange

Dans notre cas, une huile essentielle d'orange commerciale naturellement contaminée a été soumise aux analyses d'une vingtaine de laboratoire. La liste des substances actives à rechercher, donnée par le FAPAS, se composait de neuf molécules :

- Azoxystrobine
- Carbendazime
- Monocrotophos
- Oxamyl
- Imidachlorpride
- Fenbuconazole
- Pyraclostrobine
- Trifloxystrobine
- Spinosad

II.2.1. Analyse par LC-ESI/sSRM

Une première analyse de l'huile essentielle d'orange, menée avec la méthode de préparation développée pour l'huile essentielle de citron, a conduit aux résultats reportés dans le Tableau 38.

[1] La participation à des essais inter-laboratoire est une des conditions nécessaires à l'obtention de l'accréditation ISO 17025. Ces tests permettent de comparer les résultats analytiques de différents laboratoires, obtenus à partir d'un même échantillon généralement surchargé avec une quantité connue de pesticides.

Substance active détectée	Substance active non détectée
Azoxystrobine Carbendazime Pyraclostrobine Trifloxystrobine	Monocrotophos Oxamyl Imidachlopride Fenbuconazole Spinosade

Tableau 38. Substances actives détectées et non détectées par rapport à la liste de pesticides fournie par le FAPAS

La concentration de ces substances actives a été estimée avec un point de gamme réalisé à partir d'un témoin d'huile d'essentielle de citron bio. Ces teneurs ont permis d'effectuer des ajouts dosés lors de la seconde analyse.

II.2.2. Résultats et discussion dans le contexte d'une analyse interlaboratoire

Un mélange, contenant les quatre pesticides à quantifier, a été préparé de manière à surcharger l'huile essentielle avec des teneurs en pesticides équivalentes à celles déjà présentes :

- Azoxystrobine : 1 $mg.L^{-1}$
- Carbendazime : 500 $\mu g.L^{-1}$
- Pyraclostrobine : 1 $mg.L^{-1}$
- Trifloxystrobine : 200 $\mu g.L^{-1}$

L'huile essentielle d'orange a ensuite été surchargée avec ce mélange de pesticides à raison de 100 µL dans 900 µL d'huile essentielle d'orange FAPAS.

L'huile essentielle d'orange non surchargée (éch HE) et son ajout dosé (éch AJ) ont ensuite été analysés selon le protocole de la Figure 87. Il faut noter que l'ajout dosé a été réalisé en duplicat (éch AJ1 et éch AJ2) et que les échantillons ont fait l'objet de trois injections chacun pour s'assurer, une fois de plus, de la répétabilité.

II.2.3. Résultats

Le Tableau 39 présente les résultats obtenus pour les quatre molécules recherchées.

	Azoxystrobine			Carbendazime			Trifloxystrobine			Pyraclostrobine		
	Aires	Moyenne	CV	Aires	Moyenne	CV	Aires	Moyenne	CV	Aires	Moyenne	CV
éch HE (1)	5.58E+05			7.80E+04			1.01E+05			1.92E+06		
éch HE (2)	5.61E+05	5.66E+05	2.0%	7.65E+04	7.64E+04	2.1%	1.05E+05	1.04E+05	2.2%	1.96E+06	1.93E+06	1.6%
éch HE (3)	5.79E+05			7.48E+04			1.05E+05			1.90E+06		
éch AJ1 (1)	1.28E+06			1.59E+05			6.10E+05			1.90E+06		
éch AJ1 (2)	1.30E+06	1.29E+06	0.9%	1.65E+05	1.63E+05	2.0%	5.94E+05	6.05E+05	1.5%	1.87E+06	1.91E+06	2.1%
éch AJ1 (3)	1.30E+06			1.64E+05			6.10E+05			1.95E+06		
éch AJ2 (1)	1.30E+06			1.65E+05			6.02E+05			1.89E+06		
éch AJ2 (2)	1.31E+06	1.31E+06	0.4%	1.60E+05	1.62E+05	1.6%	6.12E+05	6.07E+05	0.8%	1.90E+06	1.91E+06	1.4%
éch AJ2 (3)	1.31E+06			1.61E+05			6.06E+05			1.94E+06		

Tableau 39. Résultats obtenus lors de l'analyse de l'huile essentielle d'orange non surchargée (éch HE) et des ajouts dosés (éch AJ1 et éch AJ2) exprimés en aires, moyenne des aires et CV, pour les quatre pesticides recherchés

Les résultats exposés dans le Tableau 39 permettent, une nouvelle fois, de démontrer la répétabilité de l'analyse aussi bien en termes de préparation (Aires éch AJ1 et AJ2) que d'injection (CVs ≤ 2,1 %). A l'exception de la pyraclostrobine, les aires des trois autres pesticides correspondant aux « éch AJ » sont plus élevées d'au moins un facteur deux comparée « l'éch HE ». La constance des aires observée pour le pic de pyraclostrobine pourrait être expliquée par une saturation de détecteur due à l'intensité élevée du signal. Cette hypothèse n'a malheureusement pas été vérifiée.

A partir du Tableau 39, les teneurs initiales en pesticides dans l'huile essentielle d'orange ont pu être calculées et comparées à celles publiées par la FAPAS. En fonction des résultats envoyés par l'ensemble des laboratoires, le FAPAS établit une concentration moyenne à laquelle est associé un écart standard cible pour le test σ_P (Target Standard Deviation). En fonction de ces deux termes, un « z-score » peut être calculé pour chaque participant et chaque substance active tel que :

$$z = \frac{(x - X)}{\sigma_p} \tag{91}$$

Dans l'équation (91), x est la concentration rapportée par le laboratoire participant, X la valeur moyenne et σ_P l'écart standard de déviation. Pour être qualifié de recevable, le « z-score » doit satisfaire $|z| \leq 2$.

Le Tableau 40 présente les concentrations en pesticides reportées par le FAPAS, auxquelles sont comparées celles retrouvées par le GIRPA avec son « z-score » associé.

Substance active	FAPAS	GIRPA	*z*-score
Azoxystrobine	108	72,5	-1,49
Carbendazime	47	40,5	-0,63
Trifloxystrobine	39	20,4	2,16
Pyraclostrobine	/	/	/

Tableau 40. Concentrations en pesticides (µg.L^{-1}) reportées par le FAPAS et le GIRPA

Les résultats concernant les substances actives azoxystrobine et carbendazime sont en adéquation avec ceux donnés par le FAPAS ($|z| \leq 2$). En revanche, le *z*-score de la trifloxystrobine est supérieur à 2. Cependant, il faut remarquer à ce sujet que le rapport FAPAS précise qu'il existe une grande incertitude sur la valeur moyenne de la concentration en trifloxystrobine qui peut affecter le *z*-score des participants. Ces derniers ne sont donc communiqués qu'à titre informatif. Concernant la pyraclostrobine, aucune valeur moyenne

n'a pu être définie étant donné la grande variabilité des résultats communiqués par les laboratoires.

En plus de ces quatre substances actives, seize autres pesticides ont été détectés dans l'huile essentielle d'orange parmi lesquels trois l'ont également été par d'autres laboratoires. Quatre substances actives parmi les seize ont pu être quantifiées du fait de leur présence dans les mélanges de surcharge.

Pesticide	Concentration ($\mu g.L^{-1}$)	Détecté par d'autres laboratoires
Bifenthrine	16	
Buprofezine	Non quantifié	
Carbofuran	Non quantifié	
Clomazone	Non quantifié	
Difenoconazole	Non quantifié	
Dimethoate	2,65	
Etofenprox	Non quantifié	
Famoxadone	43	
Fenthion sulfoxide	Non quantifié	
Flufenoxuron	Non quantifié	X
Hexythiazox	Non quantifié	
Malathion	Non quantifié	
Methidathion	Non quantifié	X
Phosmet	Non quantifié	
Propargite	Non quantifié	X
Pyriproxyfen	19,2	

Tableau 41. Pesticides détectés non inclus dans la liste de substances actives à rechercher

II.2.4. Conclusion

L'analyse de l'huile essentielle d'orange a permis d'évaluer la capacité de la méthode analytique à détecter les pesticides. Elle a aussi contribué à comparer ses performances par rapport aux analyses proposées par d'autres laboratoires. Ainsi, il apparaît que les limites de quantification proposées varient généralement entre 10 et 500 $\mu g.L^{-1}$ selon les laboratoires. En fait, si deux laboratoires avancent des limites de quantification inférieures à 10 $\mu g.L^{-1}$ pour un ou deux pesticides, leurs résultats ne semblent pas satisfaisants compte tenu de leur *z*-score.

Concernant les résultats obtenus au GIRPA (non communiqués au FAPAS), plusieurs points positifs sont à noter. Parmi la liste des molécules à rechercher, seules les substances actives bien présentes ont été détectées. Rappelons qu'il s'agit de l'azoxystrobine, de la carbendazime, de la trifloxystrobine et de la pyraclostrobine. La quantification des deux premières est en adéquation avec les concentrations rapportées par le FAPAS. Par contre, il est difficile de conclure sur la trifloxystrobine et la pyraclostrobine qui ont toutes les deux posé des problèmes d'analyse aux laboratoires et sur lesquelles les données délivrées par le FAPAS ne le sont qu'à titre informatif. En conséquence, puisque les critères de satisfaction de

cet essai étaient basés sur l'identification des quatre pesticides ciblés, ainsi que sur la quantification de l'azoxystrobine et de la carbendazime, on peut conclure qu'ils ont été remplis par la méthode d'analyse développée au GIRPA. En fait, il faut savoir que sur les 20 laboratoires participants à cet essai, seuls 5 d'entre eux (25 %) ont rempli ces conditions.

Un autre point positif concerne les trois substances actives détectées par les autres laboratoires qui ont également été identifiées au sein du GIRPA. En plus de ces trois molécules, treize autres substances actives pour un total de seize, ont été détectées lors de l'analyse de l'huile essentielle d'orange.

Au cours de cet essai inter-laboratoire, notre méthode analytique a démontré sa capacité à identifier et quantifier correctement les pesticides. Elle a aussi permis de mettre en évidence sa polyvalence importante en nombre de résidus analysés au vu des substances actives supplémentaires détectées.

Chapitre V

Vers un Screening Plus Etendu de Pesticides dans les Huiles Essentielles, Plus Sensible et Plus Fiable

L'étude des huiles essentielles de lavandin et de citron a permis de mettre en évidence les performances de la méthode d'analyse mise au point précédemment. Elle consiste en une dilution au 1/10^{e}, suivie ou non d'une purification, et enfin d'une injection directe en LC-ESI/sSRM. Elle a conduit à détecter et quantifier environ soixante-dix substances actives dans des huiles essentielles surchargées.

Ce dernier chapitre se propose, non seulement d'appliquer la méthode précitée à la détection et la quantification de 250 substances actives, mais aussi de comparer une nouvelle méthode de préparation basée sur une évaporation des huiles essentielles sous azote. Il est en effet possible d'envisager une amélioration des limites de détection avec cette technique. L'analyse de matrices complexes telles que les huiles essentielles en LC-ESI/sSRM se traduit par la présence de nombreux interférents qui peuvent, dans certains cas, être la source de faux positifs, c'est pourquoi une méthode de confirmation en mode SRM-EPI a été développée dans une seconde partie. Enfin, dans une ultime partie, les performances et la fiabilité de la méthode analytique développée tout au long de ce manuscrit seront évaluées à travers l'analyse d'échantillons réels d'huiles essentielles.

A) L'évaporation sous azote comme méthode ad-hoc d'enrichissement en pesticides

Les huiles essentielles, de part leur composition, sont des extraits relativement volatils. Comme décrit à la fin du chapitre précédent, il apparaît ainsi possible, grâce à un procédé de distillation, de recueillir une fraction volatile sous forme de distillat qui ne contient aucun pesticides. La question d'évaporer les composés volatils des huiles essentielles à une température plus basse que celle utilisée pour la distillation s'est alors posée. Elle permettrait de concentrer les pesticides avant de les reprendre dans le solvant d'injection. En effet, une concentration de ce type conduirait, *a priori*, à une amélioration de la sensibilité de la méthode analytique. Dans un premier temps, la faisabilité d'une évaporation sous azote assistée par chauffage a été testée sur les huiles essentielles de citron et cyprès. Dans un second temps, les performances de cette méthode ont été comparées avec celles de la simple dilution.

I. Mise au point de la méthode évaporation sous azote

Les huiles essentielles de citron et cyprès ont été choisies pour tester l'évaporation sous azote, car ces deux huiles admettent un point éclair relativement bas, en moyenne de l'ordre de 35 °C[264] et 46 °C.[79] L'application d'une température de cet ordre, associée à un flux d'azote, devrait donc permettre d'évaporer ces huiles essentielles.

I.1 Protocole expérimental

Pour chacune des deux huiles essentielles, deux surcharges d'un volume de 1 mL ont été réalisées à partir d'un mélange de pesticides à une concentration de 1 $mg.L^{-1}$. Les taux de surcharge à 10 et 50 $\mu g.L^{-1}$ ont respectivement été préparés en mélangeant 990 µL d'huile essentielle avec 10 µL d'un mélange de pesticides à 1 $mg.L^{-1}$ et 950 µL d'huile essentielle avec 50 µL du même mélange de pesticides.

Le millitre a ensuite été réparti dans trois vials, à raison de 300 µL par vial pour tester trois volumes de reprise différents (300 µL, 600 µL et 900 µL) après l'évaporation. Les 100 µL restants ont servi à réaliser une analyse classique (dilution au $1/10^{e}$) pour servir de comparaison. Un témoin a également été préparé pour chacun des volumes de reprise afin de

calculer au plus juste les taux de récupération. Le protocole mis en place est illustré par le Schéma 15.

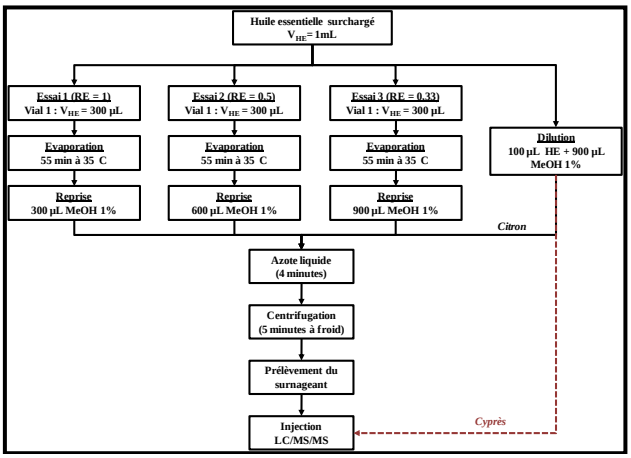


Schéma 15. Schéma du protocole de mise au point de la méthode d'évaporation sous azote

Concernant l'huile essentielle de cyprès, si une simple dilution au 1/10^{e} dans le MeOH 1 % conduit à une solution homogène qui ne nécessite pas d'étape de purification dans l'azote liquide, ce n'est pas le cas lorsque cette huile est traitée par évaporation. En effet, dans ce cas, la reprise dans le solvant donne une solution trouble qui, lorsque la purification à l'azote liquide est employée, mène à la formation d'un résidu visqueux au fond du vial. Ce dernier ne se révèle pas problématique pour prélever le surnageant.

L'objectif de ce protocole est, dans un premier temps, d'évaluer si une amélioration significative de la sensibilité est apportée par l'évaporation sous azote comparée à la dilution et, si c'est le cas, de déterminer dans un second temps le volume de reprise et donc le RE le plus adapté.

I.2 Résultats et discussion

Etant donné que le but principal de cette expérience est d'ordre qualitatif, les résultats ne sont pas autant détaillés que pour les études précédentes. Ils se focalisent sur les points essentiels, à savoir les taux de récupération des substances actives d'un point de vue global et l'évolution des rapports S/N.

I.2.1. L'huile essentielle de citron

Les taux de récupération sont satisfaisants pour la majorité des composés. Des rendements entre 80 et 110 % sont obtenus pour une reprise dans 900 µL. Ces TRs sont un peu plus faibles dans le cas d'une reprise dans 600 µL (60-80 %) et 300 µL (60-90 %). Un composé admet un TR très faible, il s'agit du thiophanate-méthyle dont le rendement n'atteint que 5 %.

Cependant, ce pesticide se dégrade en carbendazime qui est également une substance active analysée, le problème est donc limité.

La récupération des pesticides ne semble donc pas être un facteur limitant de l'évaporation sous azote. Mais cette technique a-t-elle un impact sur le rapport S/N ? Pour estimer son intérêt, regardons l'évolution du rapport S/N de quelques composés dont les limites de quantification ne sont pas très satisfaisantes avec une simple dilution.

Le Tableau 42 présente l'évolution du rapport S/N pour les substances actives abamectine, parathion éthyl et chlorpropham en fonction du volume de reprise et donc du facteur de dilution. Les concentrations précisées dans le Tableau 42 correspondent à la concentration de ces pesticides dans l'huile essentielle. Les chromatogrammes obtenus avec la dilution au 1/10^{e} servent de témoin.

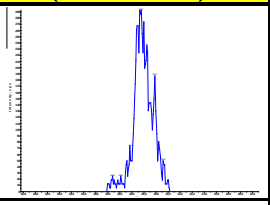
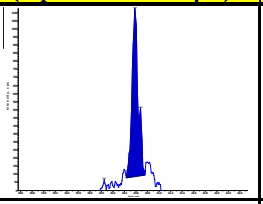
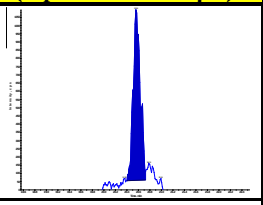
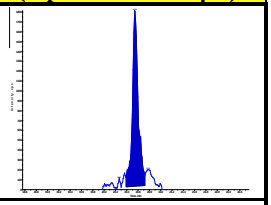
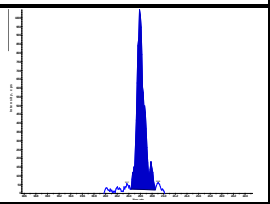
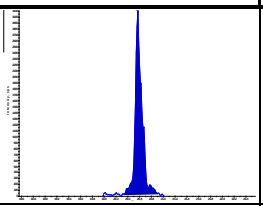
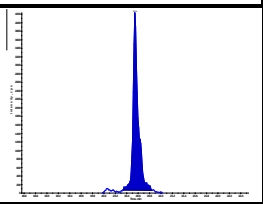
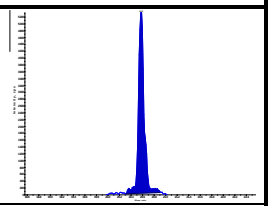
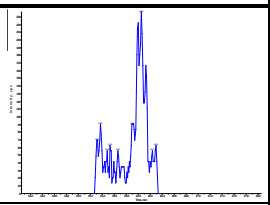
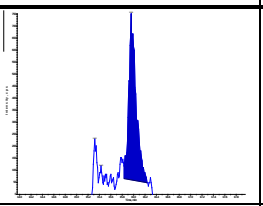
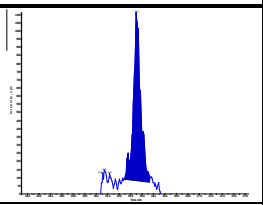
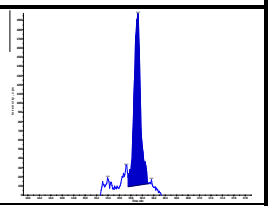
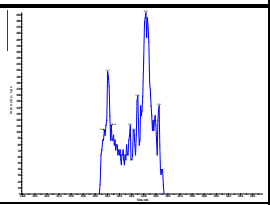
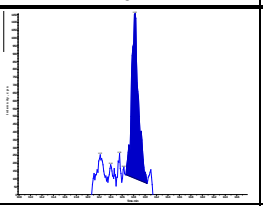
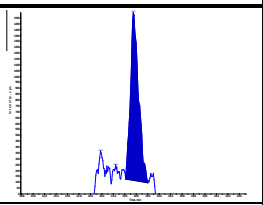
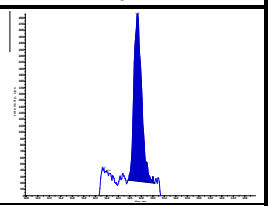
	RE = 0,1 (Dilution 1/10^{e})	**RE = 0,33 (reprise dans 900 µL)**	**RE = 0,5 (reprise dans 600 µL)**	**RE = 1 (reprise dans 300 µL)**
Abamectine (10 µg.L^{-1})				
Aire	/	7710	8940	12700
S/N	< 10	36	70	73
Abamectine (50 µg.L^{-1})				
Aire	8810	22800	25800	36300
S/N	75	200	240	371
Parathion éthyl (50 µg.L^{-1})				
Aire	/	6030	8070	14700
S/N	< 10	20	43	67
Chlorpropham (50 µg.L^{-1})				
Aire	/	8780	14000	24300
S/N	< 10	24	39	50

Tableau 42. Evolution du rapport S/N de l'abamectine, parathion éthyl et chlorpropham en fonction de rapport d'extraction

Les chromatogrammes exposés dans le Tableau 42 mettent en évidence une augmentation du rapport S/N pour les trois substances actives avec l'augmentation du RE. L'accroissement du rapport S/N n'est cependant pas strictement proportionnel au rapport entre les RE, c'est-à-dire que le gain par exemple d'un facteur trois n'est pas toujours observé entre les rapports S/N des pics correspondant à un RE de 0,33 (reprise dans 900 µL) et 1 (reprise dans 300 µL). Ce constat peut s'expliquer par une augmentation de l'intensité qui n'est pas proportionelle au RE mais également une concentration des composés de la matrice qui cause un accroissement du bruit de fond. Dans certains cas, aucune variation du rapport S/N n'est observée, à l'image de la métrafénone dont les chromatogrammes sont exposés dans le Tableau 43.

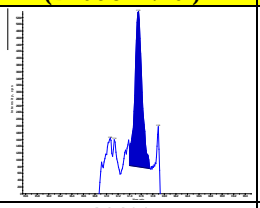
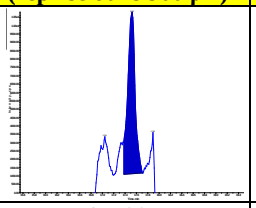
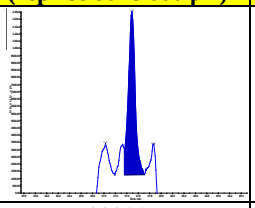
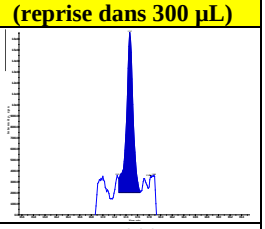
	RE = 0,1 (Dilution 1/10^e)	**RE = 0,33 (reprise dans 900 µL)**	**RE = 0,5 (reprise dans 600 µL)**	**RE = 1 (reprise dans 300 µL)**
Métrafénone (10 µg.L^{-1})				
Aire	39600	87200	93300	114000
S/N	14	14	15	20

Tableau 43. Evolution du rapport S/N de la métrafénone en fonction du rapport d'extraction

Le même profil chromatographique ainsi qu'un rapport S/N presque constant est observé pour la métrafénone quelle que soit la méthode de préparation. Entre la simple dilution et l'évaporation sous azote (RE = 0,33), une augmentation de l'aire du pic chromatographique de 39600 à 87200 est bien constatée. Cependant la ligne de base, représentative du bruit de fond, évolue dans les mêmes proportions, ce qui explique que le rapport S/N reste constant. De plus, les aires relatives aux différents RE ne progressent que très peu (87200 pour un RE = 0,33 à 114000 pour un RE = 1) en conservant un bruit de fond constant. Ce phénomène pourrait être la conséquence d'effets matrice suppresseurs plus élevés avec l'augmentation du RE.

Le bilan de cette expérience concernant l'huile essentielle de citron se révèle très positif puisque l'évaporation sous azote permettrait d'améliorer la sensibilité d'une bonne partie des molécules sans en défavoriser d'autres, exception faite du thiophanate-méthyle qui admet un TR de seulement 5 %.

I.2.2. L'huile essentielle de cyprès

Concernant l'huile essentielle de cyprès, seuls les vials correspondant à un RE = 0,33 et RE = 0,5 ont été injectés. Les résultats sont relativement similaires à ceux de l'huile

essentielle de citron. Des taux de récupération de l'ordre de 60 à 90 % sont obtenus par les substances actives pour une reprise dans 900 µL et plutôt de l'ordre de 50 à 80 % avec une reprise dans 600 µL. Quelques pesticides tels que le bifénazate et le thiophanate-méthyle admettent de faibles TR de l'ordre de 10 % pour le premier et 30 % pour le second. Cependant, étant donné la bonne sensibilité de ces composés, des LOQs d'environ 10 $\mu g.L^{-1}$ devraient pouvoir être atteintes.

Du point de vue de l'évolution du rapport S/N, des conclusions analogues à celles établies pour l'huile essentielle de citron peuvent être faites. Le Tableau 44 présente les chromatogrammes relatifs au trichlorfon.

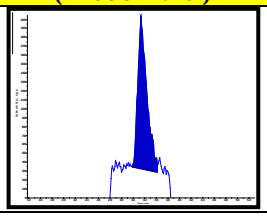
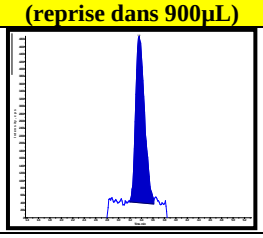
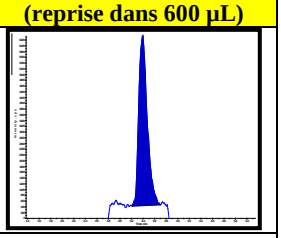
	RE = 0,1 (Dilution 1/10^e)	**RE = 0,33 (reprise dans 900µL)**	**RE = 0,5 (reprise dans 600 µL)**
Trichlorfon (50 $\mu g.L^{-1}$)			
Aire	18500	48400	60900
S/N	50	90	101

Tableau 44. Evolution du rapport S/N du trichlorfon dans l'huile essentielle de cyprès en fonction du rendement d'extraction

Les chromatogrammes du Tableau 44 mettent bien en évidence une amélioration du rapport S/N du trichlorfon en fonction du volume de reprise.

I.3 Conclusion

L'objectif de ces essais était d'évaluer l'intérêt de mettre en place une étape d'évaporation sous azote afin de limiter la dilution de l'échantillon et d'accroître ainsi la sensibilité. Les premiers résultats obtenus dans les huiles essentielles de citron et cyprès sont encourageants. Les taux de récupération des pesticides sont dans l'ensemble satisfaisants (généralement supérieurs à 70 %) avec cependant des rendements faibles pour certains (bifenazate, thiophanante-methyle).

Une amélioration du rapport S/N est notée dans un bon nombre de cas, ce qui permettrait d'abaisser les LOQs. Le volume de reprise le plus adapté semble être celui conduisant à un RE égal à 1. Il est néanmois important de noter que la concentration des constituants de la matrice entraîne une nette augmentation du bruit de fond de certaines transitions SRM (métrafénone : Tableau 43). Ils sont, de plus, probablement responsables d'un accroissement de la suppression du signal au niveau de l'ionisation electrospray qui expliquerait une certaine stagnation de l'intensité du signal malgré une dilution plus faible des extraits.

Le matériel utilisé lors de ces premiers essais n'était pas très adapté pour maîtriser toutes les conditions opératoires telles que la température de chauffage ou le débit d'azote. Un appareil plus adapté a donc été commandé afin de pouvoir poursuivre ces manipulations dans de meilleures conditions et permettre de tester cette méthode sur des huiles essentielles de moindre volatilité (lavandin, mélisse) et ainsi, de pouvoir comparer la sensibilité admise par les méthodes « dilution » et « évaporation sous azote ».

II. Quantification de 250 pesticides dans 4 huiles essentielles : comparaison des méthodes de dilution et d'évaporation sous azote

L'objectif est, ici, de comparer les méthodes de « dilution » et « d'évaporation sous azote » sur quatre huiles essentielles de composition et de volatilité différentes : citron,[79] cyprès,[264] lavandin[265] et mélisse. Parallèlement, la répétabilité de l'évaporation sous azote a été testée à travers la réalisation de cinq taux de récupération à deux concentrations de surcharge.

II.1 Protocole expérimental

Pour chaque huile essentielle, cinq taux de surcharge ont été préparés à partir d'un mélange de surcharge de pesticides à une concentration de 1 $mg.L^{-1}$ de la manière suivante :

- Huile essentielle surchargée à 50 $\mu g.L^{-1}$ (V = 3 mL)

Mélange de 2850 µL d'huile essentielle + 150 µL du mélange de pesticides à 1 $mg.L^{-1}$.

- Huile essentielle surchargée à 25 $\mu g.L^{-1}$ (V = 1 mL)

Mélange de 975 µL d'huile essentielle + 25 µL du mélange de surcharge à 1 $mg.L^{-1}$.

- Huile essentielle surchargée à 10 $\mu g.L^{-1}$ (V = 3 mL)

Mélange de 2970 µL d'huile essentielle + 30 µL du mélange de surcharge à 1 $mg.L^{-1}$.

- Huile essentielle surchargée à 5 $\mu g.L^{-1}$ (V = 1 mL)

Mélange de 900 µL d'huile essentielle + 100 µL d'HE surchargée à 50 $\mu g.L^{-1}$.

- Huile essentielle surchargée à 1 $\mu g.L^{-1}$ (V = 1 mL)

Mélange de 900 µL d'huile essentielle + 100 µL d' d'huile essentielle surchargée à 10 $\mu g.L^{-1}$.

La procédure expérimentale, basée sur les protocoles de « dilution » et « d'évaporation sous azote » établis précédemment, est décrite dans le Schéma 16. Elle a été appliquée à l'ensemble des extraits surchargés et au témoin (huile essentielle non suchargée).

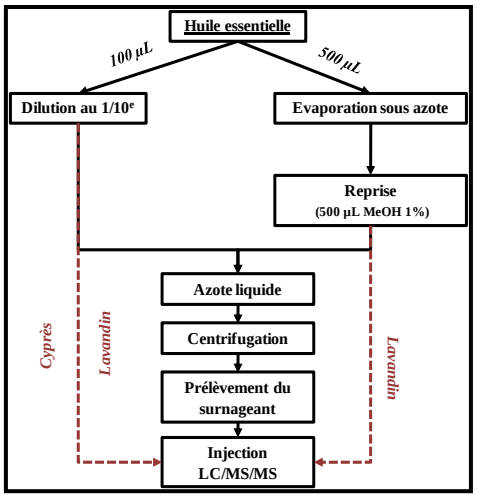


Schéma 16. Protocole expérimental de comparaison des méthodes « dilution » et « évaporation sous azote »

Dans le cas de l'évaporation sous azote, un rapport d'extraction de 1 a été choisi, compte tenu des résultats précédents. Ainsi, un volume de 500 µL d'huile essentielle est évaporé, puis repris dans un volume équivalent de MeOH acidifié. Les concentrations attendues à l'injection en LC-MS/MS en fonction de la méthode de préparation et du taux de surcharge de l'huile essentielle sont détaillées dans le Tableau 45 :

Surcharge de l'huile essentielle	Dilution au 1/10e	Evaporation sous azote
50 µg.L^{-1}	5 µg.L^{-1}	50 µg.L^{-1}
25 µg.L^{-1}	2,5 µg.L^{-1}	25 µg.L^{-1}
10 µg.L^{-1}	1 µg.L^{-1}	10 µg.L^{-1}
5 µg.L^{-1}	0,5 µg.L^{-1}	5 µg.L^{-1}
1 µg.L^{-1}	0,1 µg.L^{-1}	1 µg.L^{-1}

Tableau 45. Concentrations attendues dans les extraits injectés en LC-MS/MS

Pour évaluer la répétabilité de l'évaporation sous azote, cinq répétats (5 TRs) ont été effectués pour les huiles essentielles surchargées à 10 et 50 µg.L^{-1}. Afin de calculer les taux de récupération de chaque substance active, deux points de gamme matrice à 10 et 50 µg.L^{-1} ont été préparés à partir de l'extrait provenant du témoin non surchargé.

Il faut noter que la dilution des huiles essentielles de lavandin et de cyprès ainsi que l'évaporation sous azote de l'huile essentielle de lavandin n'ont pas nécessité de purification dans l'azote liquide. De plus, il est important de remarquer que l'évaporation de l'huile essentielle de citron a nécessité l'application d'une température de 40 °C pendant environ 45 minutes, celle de cyprès 40 °C pendant 45 minutes, puis 45 °C pendant 15 minutes. Les huiles essentielles de lavandin et de mélisse requièrent une température bien plus élevée, à savoir 80 °C pendant 30 à 45 minutes pour le lavandin et 90 °C pendant une heure puis 95 °C pendant 1/2 heure pour la mélisse.

Les extraits issus de la dilution et de l'évaporation sous azote d'une huile essentielle donnée ont été injectés successivement le même jour pour s'assurer que le spectromètre de masse soit dans des conditions d'analyse identique, notamment, en termes de sensibilité.

Afin de faciliter l'interprétation des résultats, les huiles essentielles ont été ordonnées selon la température d'évaporation appliquée. Pour chacune d'elles sont détaillés un bilan général des TRs et CVs obtenus avec la méthode d'évaporation sous azote, ainsi qu'un état des lieux des LOQs en fonction de la méthode de préparation de l'huile essentielle.

II.2 Analyse de l'huile essentielle de citron surchargée en pesticides

II.2.1. Résultats et discussion

Les résultats concernant l'huile essentielle de citron sont exposés dans le Tableau 46. Les couleurs bleue, verte et rouge se réfèrent respectivement aux composés admettant des TRs < 70 %, aux composés détectés dans le témoin et aux composés non détectés ou présentant des particularités. Ces derniers seront détaillés ultérieurement.

	Limite de Quantification (µg.L^{-1})		Technique appropriée	TR 10 µg.L^{-1}		TR 50 µg.L^{-1}	
Pesticide	**Dilution**	**Evaporation**		**Moyenne**	**CV**	**Moyenne**	**CV**
Abamectine	25	10	Evaporation	86,2	10,1	93,4	7,4
Acephate	5	5	Dilution/Evaporation	80,4	3,1	84,8	1,7
Acetamipride	1	1	Dilution/Evaporation	88,2	2,2	86,4	1,9
Acibenzolar-S-methyl	25	5	Evaporation	84,6	5,8	88,0	2,6
Aclonifen	50	25	Evaporation			84,7	5,8
Alachlore	10	10	Dilution/Evaporation	89,9	3,3	86,5	4,4
Aldicarbe	5	1	Evaporation	79,5	3,7	82,1	5,0
Aldicarbe sulfone	5	1	Evaporation	88,2	3,9	90,7	1,9
Aldicarbe sulfoxyde	1	1	Dilution/Evaporation	86,8	2,1	87,8	1,2
Ametryn	5	1	Evaporation	85,0	1,9	86,7	1,7
Amidosulfuron	10	5	Evaporation	88,2	5,2	87,4	2,3
Amitraz	5	5	Dilution/Evaporation	89,0	24,5	33,9	30,2
Atrazine	1	1	Dilution/Evaporation	89,1	1,5	84,5	2,3
Azaconazole	/	/	/	93,8	2,7	89,9	2,5
Azimphos-methyl	10	10	Dilution/Evaporation	87,2	2,5	83,0	1,9
Azoxystrobine	1	1	Dilution/Evaporation	87,0	1,9	86,2	2,2
Benalaxyl	5	5	Dilution/Evaporation	85,6	2,4	85,5	1,5
Bendiocarb	1	1	Dilution/Evaporation	86,3	1,5	84,4	1,6
Benfuracarbe	5	1	Evaporation	93,3	3,5	83,8	2,2
Benomyl	ND	ND	/	/	/	/	/
Benoxacore	10	5	Evaporation	88,7	2,0	86,3	2,8
Bifenazate	1	1	Dilution/Evaporation	80,7	1,8	82,0	2,4
Bifenthrine	25	25	Dilution/Evaporation			86,5	4,2
Bitertanol	/	/	Dilution/Evaporation	85,8	2,4	81,0	2,3
Boscalid	5	1	Evaporation	89,7	1,5	87,2	1,3
Bromacil	10	5	Evaporation	87,0	4,0	90,3	1,9
Bromuconazole iso1	10	10	Dilution/Evaporation	95,1	5,6	86,2	3,2
Bromuconazole iso2	25	10	Evaporation	100,5	6,8	87,7	3,5
Bupirimate	1	1	Dilution/Evaporation	87,3	1,8	82,3	2,0
Buprofezine	1	1	Dilution/Evaporation	89,4	3,0	84,9	2,4
Butraline	1	1	Dilution/Evaporation	82,4	2,2	83,4	2,2
Carbaryl	5	1	Evaporation	88,4	1,5	85,7	1,9
Carbendazime	D	D	/	/	2,9	/	2,8
Carbetamide	5	1	Evaporation	90,5	2,4	88,2	2,4
Carbofuran	1	1	Dilution/Evaporation	89,4	2,3	92,0	1,6
Carbofuran-3 OH	5	5	Dilution/Evaporation	79,0	2,1	91,2	1,7

	Limite de Quantification (µg.L^{-1})		Technique appropriée	TR 10 µg.L^{-1}		TR 50 µg.L^{-1}	
Pesticide	**Dilution**	**Evaporation**		**Moyenne**	**CV**	**Moyenne**	**CV**
Carbosulfan	1	1	Dilution/Evaporation	111,7	4,4	87,5	7,5
Carboxin	1	1	Dilution/Evaporation	65,1	2,9	63,0	6,5
Carfentrazone éthyle	1	1	Dilution/Evaporation	89,1	2,3	86,2	1,8
Chlorfenvinphos iso1	25	10	Evaporation	80,0	7,4	85,9	2,9
Chlorfenvinphos iso2	10	10	Dilution/Evaporation	78,2	3,6	86,1	2,6
Chloridazone	10	5	Evaporation	85,1	6,2	86,7	2,5
Chlorotoluron	5	1	Evaporation	85,4	1,9	86,2	2,8
Chlorpropham	ND	50	Evaporation			87,5	3,7
Chlorpyrifos	/	/	Dilution/Evaporation	87,1	2,9	87,2	4,2
Chlorsulfuron	5	5	Dilution/Evaporation	85,6	3,3	87,0	2,2
Clofentezine	10	10	Dilution/Evaporation	61,0	6,4	77,3	19,2
Clomazone	1	1	Dilution/Evaporation	84,2	2,3	87,7	2,1
Coumaphos	10	5	Evaporation	86,6	3,2	85,5	1,7
Cyanazine	1	1	Dilution/Evaporation	89,4	1,9	86,9	2,1
Cyazofamide	5	1	Evaporation	92,4	3,8	89,6	4,4
Cycloxydime	5	5	Dilution/Evaporation	68,2	4,8	64,8	6,5
Cymoxanil	10	5	Evaporation	87,8	2,4	87,2	3,4
Cyproconazole-iso1	10	10	Dilution/Evaporation	92,7	4,2	86,3	3,2
Cyproconazole-iso2	10	5	Evaporation	88,1	2,3	85,7	2,5
Cyprodinil	5	5	Dilution/Evaporation	88,2	2,8	83,4	0,9
Cyromazine	10	5	Evaporation	61,7	4,4	64,6	8,9
Deltamehtrine	ND	50	Evaporation	/	/	81,3	4,5
Desmedipham	1	1	Dilution/Evaporation	90,7	2,6	86,9	2,1
Diazinon	5	5	Dilution/Evaporation	90,6	1,7	81,8	2,6
Dichlofluanid	10	5	Evaporation	93,9	3,6	87,9	3,5
Dichlorvos	10	5	Evaporation	68,8	6,2	59,8	9,6
Diethofencarb	5	5	Dilution/Evaporation	87,2	2,7	84,7	3,3
Difenoconazole	5	5	Dilution/Evaporation	76,2	5,9	86,1	12,9
Diflufenicanil	5	1	Evaporation	88,0	1,1	85,2	3,5
Dimetachlor	10	10	Dilution/Evaporation	83,8	18,8	85,2	3,7
Dimethenamid	1	1	Dilution/Evaporation	87,5	1,9	86,5	2,1
Dimethoate	1	1	Dilution/Evaporation	89,3	1,9	87,1	1,6
Dimethomorph iso1	5	5	Dilution/Evaporation	88,9	2,2	87,1	1,7
Dimethomorph iso2	5	5	Dilution/Evaporation	91,3	2,1	87,4	2,2
Diniconazole	10	5	Evaporation	91,4	2,7	83,3	1,7
Disulfoton	50	10	Evaporation	79,4	1,5	88,6	7,3
Diuron	5	1	Evaporation	90,2	2,6	86,1	1,6
Epoxyconazole	5	5	Dilution/Evaporation	91,2	3,2	89,1	2,0
Ethion (diethion)	10	10	Dilution/Evaporation	99,3	8,4	90,9	5,4
Ethofumesate	25	10	Evaporation	92,8	7,5	86,5	5,4
Ethoprophos	5	5	Dilution/Evaporation	87,1	3,1	84,5	3,7
Etofenprox	25	25	Dilution/Evaporation	/	/	84,6	2,7
Etoxazol	5	5	Dilution/Evaporation	88,6	3,7	87,5	3,6
Famoxadone	10	5	Evaporation	85,7	10,6	86,1	4,6
Fénamidone	1	1	Dilution/Evaporation	88,3	2,9	86,3	1,4
Fenamiphos	/	/	Dilution/Evaporation	88,5	3,3	84,8	2,0
Fenarimol	5	5	Dilution/Evaporation	89,7	3,5	86,5	3,2
Fenazaquin	10	10	Dilution/Evaporation	83,6	2,6	84,0	2,6
Fenbuconazole	10	10	Dilution/Evaporation	93,9	10,8	83,1	3,7
Fenhexamid	10	5	Evaporation	88,7	3,7	84,7	3,8
Fenoxycarbe	5	1	Evaporation	90,6	2,5	87,4	2,0
Fenpropimorphe	/	/	Dilution/Evaporation	86,2	3,5	89,1	9,1
Fenpyroxymate	5	1	Evaporation	85,0	3,9	86,4	1,3
Fenthion	25	10	Evaporation	93,4	6,5	84,7	4,2
Fenthion sulfone	10	10	Dilution/Evaporation	93,4	4,9	89,3	2,4
Fenthion sulfoxide	/	/	Dilution/Evaporation	91,9	1,1	85,6	1,7
Fipronil	25	10	Evaporation	100,2	4,3	97,0	3,8
Flazasulfuron	5	1	Evaporation	91,9	2,7	87,6	3,4
Fluazifop-p-butyl	1	1	Dilution/Evaporation	86,2	2,2	85,9	2,5
Flufenacet	1	1	Dilution/Evaporation	90,4	1,2	89,6	1,9
Flufenoxuron	5	5	Dilution/Evaporation	81,7	2,6	84,6	4,1
Fluquinconazole	10	5	Evaporation	86,3	4,7	87,8	2,5
Flurochloridone	25	10	Evaporation	84,3	1,7	87,5	2,5
Flusilazol	10	5	Evaporation	85,9	2,5	86,5	1,5
Flutolanil	1	1	Dilution/Evaporation	90,4	2,0	87,1	1,4
Flutriafol	10	10	Dilution/Evaporation	91,3	3,1	87,4	2,5
Fomesafen	5	5	Dilution/Evaporation	87,3	5,3	85,8	2,9
Formetanate	1	1	Dilution/Evaporation	92,1	5,4	91,9	3,3
Fosthiazate	1	1	Dilution/Evaporation	88,6	1,5	87,8	1,0

	Limite de Quantification (µg.L^{-1})		Technique appropriée	TR 10 µg.L^{-1}		TR 50 µg.L^{-1}	
Pesticide	**Dilution**	**Evaporation**		**Moyenne**	**CV**	**Moyenne**	**CV**
Furathiocarb	10	10	Evaporation	85,6	2,5	86,3	1,9
Hepténophos	5	5	Dilution/Evaporation	87,3	2,1	86,3	2,2
Hexaconazole	5	5	Dilution/Evaporation	88,1	2,6	81,8	0,8
Hexazinone	/	/	Dilution/Evaporation	93,1	3,2	85,3	3,1
Hexythiazox	/	/	Dilution/Evaporation	83,4	5,0	81,7	4,9
Imazalil	10	10	Dilution/Evaporation	81,5	4,2	89,5	5,5
Imidaclopride	10	5	Evaporation	89,4	3,2	88,2	2,8
Indoxacarbe	5	5	Dilution/Evaporation	87,1	3,5	85,4	1,6
Iprodione	50	25	Evaporation	/	/	81,4	5,8
Iprovalicarbe	5	5	Dilution/Evaporation	89,9	1,5	86,9	2,2
Isofenphos	5	1	Dilution/Evaporation	91,5	3,5	84,3	2,9
Isoproturon	1	1	Dilution/Evaporation	84,2	3,3	84,3	3,5
Isoxaben	5	1	Evaporation	88,5	2,8	87,5	2,7
Isoxaflutol	10	5	Evaporation	90,4	4,0	88,0	3,9
Kresoxim methyl	5	1	Evaporation	92,6	3,0	81,5	2,0
Lenacile	5	1	Evaporation	91,6	2,3	87,1	1,6
Linuron	10	1	Evaporation	100,8	3,8	90,2	3,6
Lufenuron	25	10	Evaporation	73,2	5,6	86,2	6,0
Malaoxon	1	1	Dilution/Evaporation	83,9	1,4	86,9	2,3
Malathion	/	/	Dilution/Evaporation	89,1	5,1	87,7	2,1
Mefenoxam	/	/	Dilution/Evaporation	87,6	5,1	87,4	2,6
Mepanipyrim	10	10	Dilution/Evaporation	81,0	7,3	86,0	2,0
Mepronil	/	/	Dilution/Evaporation	88,1	1,9	87,9	1,3
Mesosulfuron methyl	5	1	Evaporation	85,8	2,1	87,2	2,9
Metamitrone	25	10	Evaporation	84,4	5,9	79,8	2,2
Metazachlore	5	1	Evaporation	86,6	2,2	87,8	0,7
Metconazole	10	5	Evaporation	87,4	4,6	82,7	3,0
Methabenzthiazuron	5	5	Dilution/Evaporation	85,3	1,9	86,1	1,5
Methamidophos	1	1	Dilution/Evaporation	83,1	2,7	81,0	1,3
Methidathion	/	/	/	97,0	0,9	89,1	2,9
Methiocarbe	5	5	Dilution/Evaporation	92,5	2,4	86,8	1,4
Methiocarbe sulfone	5	1	Evaporation	88,9	2,8	87,2	1,1
Methiocarbe sulfoxide	1	1	Dilution/Evaporation	86,5	1,8	90,2	1,6
Methomyl	1	1	Dilution/Evaporation	85,7	2,2	86,6	1,7
Methoxyfenozid	5	5	Dilution/Evaporation	99,1	7,0	90,8	3,9
Métobromuron	10	5	Evaporation	90,3	3,9	88,1	2,2
Metolachlor	10	5	Evaporation	88,1	3,0	85,8	2,8
Métoxuron	5	1	Evaporation	83,4	2,8	85,1	2,6
Metrafenone	25	25	Dilution/Evaporation			86,7	2,5
Metribuzine	/	/	/	93,1	4,1	84,7	2,9
Mevinphos iso1	5	5	Dilution/Evaporation	86,2	2,6	86,5	2,1
Mevinphos iso2	5	5	Dilution/Evaporation	87,0	4,0	92,0	2,1
Molinate	25	5	Evaporation	94,0	7,3	80,9	3,4
Monocrotophos	5	5	Dilution/Evaporation	90,9	1,3	88,2	1,8
Myclobutanil	5	1	Evaporation	85,7	3,9	86,2	2,4
Napropamide	1	1	Dilution/Evaporation	90,2	3,0	88,8	3,5
Norflurazon	1	1	Dilution/Evaporation	87,8	3,1	87,2	2,2
Nuarimol	5	1	Evaporation	88,6	2,7	85,0	2,7
Ométhoate	5	1	Evaporation	83,9	2,6	84,6	1,2
Oxadiazon	5	5	Dilution/Evaporation	88,1	7,3	83,4	2,8
Oxamyl	/	/	Dilution/Evaporation	90,2	4,9	93,3	0,6
Oxycarboxin	5	5	Dilution/Evaporation	90,5	1,0	87,3	2,6
Paclobutrazol	5	1	Evaporation	86,3	3,0	88,1	2,6
Paraoxon methyl	25	5	Evaporation	88,7	5,1	89,4	5,3
Parathion ethyl	ND	25	Evaporation	/	/	87,5	5,5
Penconazole	5	1	Evaporation	89,0	2,9	83,8	2,0
Pencycuron	5	5	Dilution/Evaporation	89,1	4,9	82,3	1,6
Pendimethaline	5	5	Dilution/Evaporation	82,9	1,9	84,4	2,6
Permethrin	25	25	Dilution/Evaporation	/	/	87,5	2,4
Phenmedipham	5	1	Evaporation	91,0	2,2	90,0	1,9
Phenthoate	10	5	Evaporation	89,5	4,7	85,5	2,6
Phorate	50	10	Evaporation	96,8	7,2	86,5	2,1
Phosalone	5	5	Dilution/Evaporation	90,2	4,4	86,2	3,2
Phosmet	/	/	/	101,3	1,8	100,5	1,5
Phosphamidon	5	1	Evaporation	86,4	3,4	84,6	3,0
Picolanifen	10	10	Dilution/Evaporation	87,2	8,1	78,4	2,5
Picoxystrobin	1	1	Dilution/Evaporation	89,1	1,9	85,0	1,3
Piperonyl butoxide	10	10	Dilution/Evaporation	95,3	4,0	87,3	1,5
Pirimicarbe	1	1	Dilution/Evaporation	86,5	2,2	86,0	1,7

	Limite de Quantification (µg.L^{-1})		Technique appropriée	TR 10 µg.L^{-1}		TR 50 µg.L^{-1}	
Pesticide	**Dilution**	**Evaporation**		**Moyenne**	**CV**	**Moyenne**	**CV**
Pirimicarbe desmethyl	1	1	Dilution/Evaporation	75,3	3,7	75,1	3,5
Pirimiphos-éthyl	1	1	Dilution/Evaporation	87,2	1,3	85,9	2,2
Pirimiphos-methyl	10	5	Evaporation	84,3	4,1	85,5	1,6
Prochloraz	5	1	Evaporation	87,2	2,5	85,8	1,1
Profenofos	5	5	Dilution/Evaporation	82,9	3,3	85,6	1,4
Prometryn	5	5	Dilution/Evaporation	85,6	3,3	83,7	1,2
Propachlore	5	5	Dilution/Evaporation	77,4	1,8	84,4	2,7
Propaquizafop	5	5	Dilution/Evaporation	90,2	6,8	79,5	2,8
Propargite	10	25	Dilution	/	/	84,5	2,1
Propazin	5	5	Dilution/Evaporation	83,4	2,7	84,9	3,1
Propiconazole	10	10	Dilution/Evaporation	91,5	6,5	85,4	1,9
Propoxur	10	5	Evaporation	84,7	1,7	87,1	2,0
Propyzamide	/	/	Dilution/Evaporation	89,9	2,2	88,4	2,1
Proquinazid	10	5	Evaporation	83,7	3,0	85,4	2,9
Prosulfocarbe	5	5	Dilution/Evaporation	85,1	3,6	89,5	1,8
Prosulfuron	25	10	Evaporation	97,5	3,0	87,0	4,1
Pymetrozin	10	5	Evaporation	89,6	3,8	88,9	1,7
Pyraclostrobine	1	1	Dilution/Evaporation	89,8	1,7	85,3	2,2
Pyridaben	5	5	Dilution/Evaporation	84,0	4,1	84,3	2,2
Pyridafenthion	5	5	Dilution/Evaporation	86,9	3,2	86,6	2,3
Pyridate	5	5	Dilution/Evaporation	90,4	3,8	88,3	2,1
Pyrimethanil	10	5	Evaporation	85,8	4,5	85,4	3,8
Pyriproxyfen	10	10	Dilution/Evaporation	83,6	2,4	80,2	3,0
Quinalphos	25	10	Evaporation	88,4	8,2	88,3	3,7
Quinoclamine	50	25	Evaporation	/	/	78,4	4,3
Quinoxyfen	5	5	Dilution/Evaporation	81,4	4,8	80,6	2,9
Quizalofop-p-ethyl	5	5	Dilution/Evaporation	85,7	2,3	84,9	1,8
Resmethrin	25	25	Dilution/Evaporation	/	/	96,3	3,9
Rimsulfuron	5	1	Evaporation	87,5	2,3	85,1	2,2
Rotenone	10	5	Evaporation	88,8	3,1	83,9	0,8
Sethoxydim	5	5	Dilution/Evaporation	70,9	1,3	71,0	4,7
Simazine	5	5	Dilution/Evaporation	88,3	1,3	85,1	2,0
Spinosad A	5	1	Evaporation	86,9	4,6	90,6	4,1
Spinosad D	10	1	Evaporation	95,3	1,7	90,9	2,2
Spiroxamine	1	1	Dilution/Evaporation	86,5	1,8	86,6	2,5
Sulfosulfuron	5	1	Evaporation	87,2	4,3	85,2	2,5
Sulfotep	10	5	Evaporation	84,3	1,9	82,8	2,0
Tau-fluvalinate	ND	ND	/	/	/	/	/
Tebuconazole	5	5	Dilution/Evaporation	91,5	3,9	85,5	3,5
Tebufenozide	5	5	Dilution/Evaporation	87,8	4,7	85,9	1,4
Tebufenpyrade	10	10	Dilution/Evaporation	86,3	3,4	83,5	0,7
Terbufos	50	5	Evaporation	86,5	12,3	96,8	3,3
Terbuthylazine	5	1	Evaporation	85,8	1,7	88,1	2,4
Terbutryn	1	1	Dilution/Evaporation	88,6	3,0	85,5	1,6
Tetraconazole	/	/	Dilution/Evaporation	90,7	2,6	87,8	1,7
Thiabendazol	5	1	Evaporation	86,7	3,4	86,9	2,9
Thiachlopride	5	5	Dilution/Evaporation	87,7	2,0	88,5	2,5
Thiametoxam	5	5	Dilution/Evaporation	87,1	6,6	87,0	1,1
Thiodicarbe	5	1	Evaporation	87,7	1,4	84,9	1,8
Thiophanate methyl	25	ND	Dilution	/	/	/	/
Tolyfluanide	5	5	Dilution/Evaporation	86,2	3,8	85,0	2,6
Triadimefon	5	1	Evaporation	84,9	4,7	84,4	2,1
Triadimenol	5	1	Evaporation	88,1	1,1	86,6	4,4
Trichlorfon	25	10	Evaporation	96,5	4,5	85,7	2,2
Trifloxystrobine	1	1	Dilution/Evaporation	87,7	1,0	88,3	2,2
Triflusulfuron méthyl	1	1	Dilution/Evaporation	86,5	2,4	87,6	2,6
Triticonazol	5	1	Evaporation	89,0	3,3	87,5	3,2
Vamidothion	1	1	Dilution/Evaporation	78,5	2,4	90,7	1,7
Zoxamide	10	10	Dilution/Evaporation	85,7	4,1	87,4	4,6
2,4d	25	5	Evaporation	100,4	9,0	88,6	17,8
Bentazone	1	1	Dilution/Evaporation	92,6	1,3	91,2	0,9
Bromoxynil	5	1	Evaporation	112,7	28,5	101,8	60,0
Chlorfluazuron	5	1	Evaporation	92,6	1,8	89,6	2,2
Cyclanilid	1	1	Dilution/Evaporation	92,3	1,3	90,3	1,0
Dichlorprop-p	10	5	Evaporation	88,7	3,3	87,9	1,2
Diflubenzuron	25	5	Evaporation	94,0	4,8	111,2	11,2
Dithianon	10	10	Dilution/Evaporation	3,5	13,6	14,5	9,9
Endosulfan sulfate	/	/	Dilution/Evaporation	92,9	2,4	86,9	2,0
Fluazinam	5	1	Evaporation	95,8	1,3	87,5	1,3

	Limite de Quantification (µg.L^{-1})		Technique appropriée	TR 10 µg.L^{-1}		TR 50 µg.L^{-1}	
Pesticide	**Dilution**	**Evaporation**		**Moyenne**	**CV**	**Moyenne**	**CV**
Fludioxonil	25	5	Evaporation	120,8	55,8	207,7	57,2
Fluroxypyr	50	10	Evaporation	87,6	8,9	87,1	1,9
Haloxyfop-p	10	5	Evaporation	86,4	3,4	87,5	1,4
Hexaflumuron	5	1	Evaporation	94,5	1,3	88,0	2,2
Ioxynil	1	1	Dilution/Evaporation	91,6	3,4	89,9	10,6
Mcpa	25	5	Evaporation	88,5	3,3	90,3	1,1
Mecoprop	10	5	Evaporation	92,6	1,4	88,5	0,6
Mesotrione	50	10	Evaporation	99,0	8,1	84,1	1,4
Oryzaline	10	5	Evaporation	81,1	3,3	74,8	8,6
Quizalofop	25	5	Evaporation	100,9	7,8	96,6	5,4
Teflubenzuron	10	1	Evaporation	90,8	1,4	88,0	0,6
Triclopyr	25	5	Evaporation	87,2	7,1	87,2	5,3
Triflumuron	5	1	Evaporation	99,1	2,7	88,0	4,5

Tableau 46. Résultats de l'analyse de l'huile essentielle de citron exposant les LOQs obtenues avec les méthodes de dilution et d'évaporation ainsi que les TRs et CVs en % (n=5) issus des surcharges de l'huile essentielle à 10 et 50 µg.L^{-1}

Les TRs et CVs obtenus dans l'huile essentielle de citron sont très satisfaisants. A l'exception des molécules présentées dans le Tableau 47, les substances actives admettent des TRs compris entre 70 et 120 %.

			TR 10 µg.L^{-1}		TR 50 µg.L^{-1}	
Pesticide	**LOQ$_{dilution}$ (µg.L^{-1})**	**LOQ$_{évaporation}$ (µg.L^{-1})**	**Moyenne (%)**	**CV (%)**	**Moyenne (%)**	**CV (%)**
Carboxin	1	1	65,1	2,9	63,0	6,5
Cycloxydime	5	5	68,2	4,8	64,8	6,5
Cyromazine	10	5	61,7	4,4	64,6	8,9
Dichlorvos	10	5	68,8	6,2	59,8	9,6
Dithianon	10	10	3,5	13,6	14,5	9,9
Thiophanate methyl	25	ND	/			

Tableau 47. Substances actives admettant un TR inférieur à 70 %

Bien que présentant des TRs inférieurs à 70 %, les quatre premières substances actives du Tableau 47 sont récupérées correctement, à hauteur de 60 à 70 %. De plus, elles admettent des CVs très satisfaisants puisqu'inférieurs à 10 %. Au vu de ces résultats, la quantification de ces composés peut donc être assurée, d'autant que les LOQs$_{évaporation}$ sont inférieures ou égales aux LOQs$_{dilution}$.

II.2.2. Cas des molécules de dithianon, bromoxynil et fludioxonil

Le dithianon admet quant à lui un TR beaucoup plus faible, entre 3 et 15 % avec des CVs de l'ordre de 10 %. La différence de TR et la variabilité des résultats des essais à 10 et 50 µg.L^{-1} peuvent s'expliquer, en partie, par une détection du pic à la limite de la fenêtre de détection du sSRM. Cependant, malgré ce faible rendement, le dithianon est détecté à une concentration de 10 µg.L^{-1}. Par conséquent, si une quantification précise est nécessaire, elle pourra toujours être réalisée lors d'une seconde analyse en utilisant la simple dilution comme méthode de préparation.

Les substances actives bromoxynil et fludioxonil présentent des CVs très élevés (> 20 %). Ces résultats ne sont pas dus à une mauvaise répétabilité de la manipulation mais, tout comme dans le cas du dithianon, à un mauvais calage de la fenêtre de détection.

II.2.3. Cas du thiophanate-méthyle et de l'amitraz

Concernant le thiophanate-méthyle, l'évaporation sous azote de l'huile essentielle conduit, comme le laissait supposer les essais préliminaires, à sa dégradation en carbendazime. En effet, la carbendazime, bien qu'étant une susbtance active, est également un métabolite du bénomyl et du thiophanate-méthyle.[124] Pour cette raison, elle n'a pas été incluse dans le mélange de surcharge, de même que le bénomyl, pour étudier la dégradation du thiophanate-méthyle. Toutefois, cette dégradation semble être reproductible et linéaire en fonction de la concentration (Figure 89).

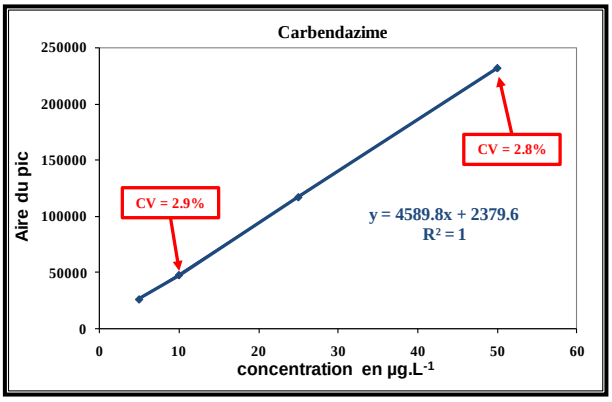


Figure 89. Droite étalon de la carbendazime représentative de la dégradation reproductible du thiophanate méthyl

Même si la droite étalon n'est composée que de quatre points, la linéarité de la gamme est clairement mise en évidence, de même que la répétabilité des aires pour des TRs de 10 µg.L^{-1} (CV = 2,9 %) et 50 µg.L^{-1} (CV = 2,8 %). La détection de la molécule de carbendazime après une évaporation sous azote pourrait donc nécessiter une seconde analyse par simple dilution pour déterminer l'origine de la carbendazime : carbendazime, benomyl ou thiophanate-méthyle.

Les coefficients de variations, calculés sur la base des cinq répétats réalisés pour les surcharges à 10 et 50 µg.L^{-1}, sont tous inférieurs à 20 %. A 50 µg.L^{-1}, 90 % des substances actives admettent un CV < 5 %. Seuls les résultats de la molécule d'amitraz présentent une variabilité importante.

			TR 10 µg.L^{-1}		TR 50 µg.L^{-1}	
Pesticide	**LOQ$_{dilution}$ (µg.L^{-1})**	**LOQ$_{évaporation}$ (µg.L^{-1})**	**Moyenne (%)**	**CV (%)**	**Moyenne (%)**	**CV (%)**
Amitraz	5	5	89,0	24,5	33,9	30,2

Tableau 48. TRs et CVs (n=5) de l'amitraz

Les données du Tableau 48 s'expliquent par une dégradation de l'amitraz au cours des injections (Tableau 49).

		TR 10 µg.L^{-1}				
TR 5 µg.L^{-1}	GM 10 µg.L^{-1}	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5
22100	26100	30600	27100	22300	19900	16300

		TR 50 µg.L^{-1}				
TR 25 µg.L^{-1}	GM 50 µg.L^{-1}	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5
28100	98900	48400	37400	31700	28200	21700

Tableau 49. Evolution de l'aire du pic chromatographique de l'amitraz au cours des injections

La diminution de l'aire des pics chromatographiques de l'amitraz est aisément remarquable pour les cinq TRs réalisés à 10 et 50 µg.L^{-1}. En effet, un facteur environ égal à 2 est observé entre l'aire du premier TR injecté et le cinquième. Cette dégradation s'explique par une sensibilité importante de l'amitraz au solvant, et notamment à l'acide, comme le montre la cinétique de dégradation de l'amitraz réalisée à 60 °C dans cinq solvants : MeOH, MeOH 1 %, MeOH/Eau, MeOH/Eau 1 % et ACN.

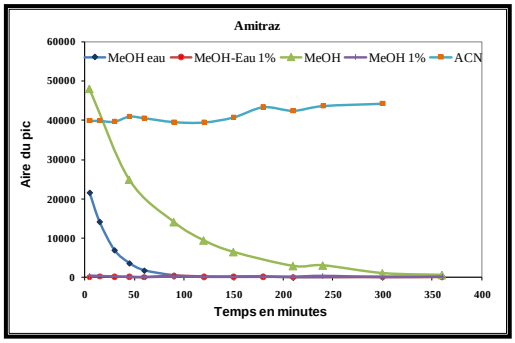


Figure 90. Courbes de cinétiques de dégradation de l'amitraz dans différents solvants à une température de 60 °C

La Figure 90 montre, d'une part, que l'ajout d'acide accélère significativement la dégradation de l'amitraz et, d'autre part, que le seul solvant capable de conserver correctement cette molécule parmi les cinq testés est l'acétonitrile. Le MeOH 1 % n'est donc assurément pas le solvant le plus adapté à l'analyse de l'amitraz. Cependant, c'est celui qui a démontré les meilleures propriétés de conservation sur l'ensemble des 244 substances actives testées, lors de l'étude des cinétiques de dégradation (Annexe 14). En cas de détection de l'amitraz, une quantification peut être envisagée en utilisant l'acétonitrile comme solvant de dilution.

II.2.4. Bilan des limites de quantification

Le Tableau 50 présente une synthèse comparative des performances des méthodes de dilution et d'évaporation sous azote pour l'analyse de 250 substances actives dans l'huile essentielle de citron.

Huile essentielle de citron		
Limite de quantification	nombre de substances actives	
	dilution	évaporation
LOQ ≤ 1 µg.L^{-1}	44	91
1 < LOQ ≤ 5 µg.L^{-1}	95	93
5 < LOQ ≤ 10 µg.L^{-1}	58	38
10 < LOQ ≤ 25 µg.L^{-1}	27	10
25 < LOQ ≤ 50 µg.L^{-1}	8	2
ND	6	4
Total	238	238
Substance actives non incluses	19	19

Tableau 50. Limites de quantification des substances actives dans l'huile essentielle de citron en fonction de la méthode de préparation

D'après le Tableau 50, l'évaporation sous azote permet d'améliorer significativement les LOQs de nombreuses substances actives. Ainsi, le nombre de molécules détectées à une LOQ ≤ 1 µg.L^{-1} est doublé lorsqu'est appliquée l'évaporation sous azote. De même, cette méthode permet la détection de 222 substances actives à une teneur inférieure ou égale à 10 µg.L^{-1} contre 197 pour la dilution.

Globalement, 111 substances actives admettent une LOQ inférieure avec l'évaporation sous azote, 122 conservent la même LOQ et seulement 2 montrent une augmentation (Annexe 15). Il s'agit du thiophanate-méthyle, dont la cause a déjà été abordée, et de la propargite (Tableau 51).

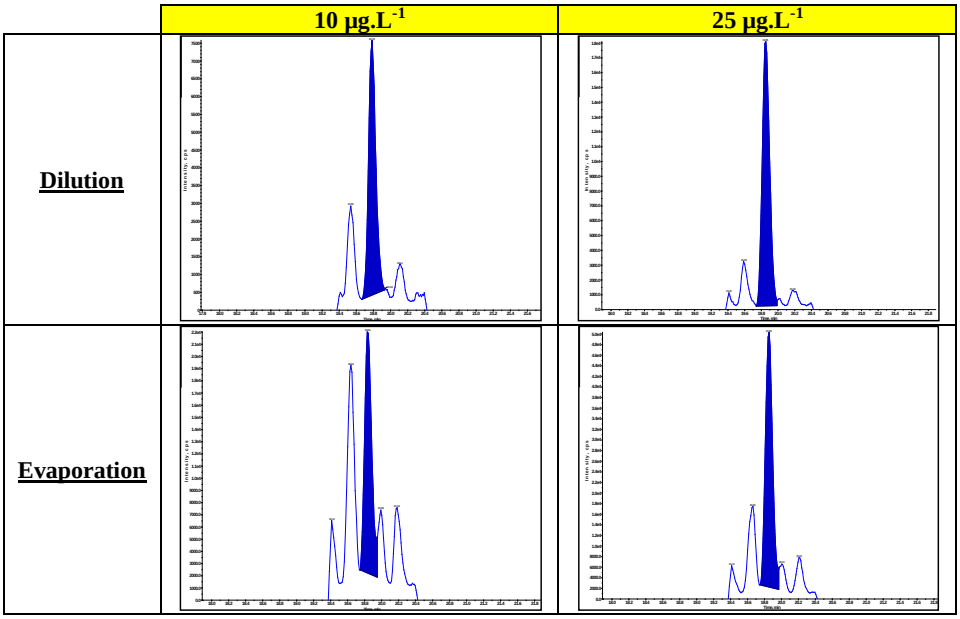


Tableau 51. Chromatogrammes de la propargite obtenus pour une huile essentielle de citron surchargée à 10 et 25 µg.L^{-1} et préparées par dilution et évaporation sous azote

Comme le montre les chromatogrammes du Tableau 51, l'augmentation de la LOQ de la propargite est due à une concentration des interférents de la matrice.

II.3 L'huile essentielle de cyprès

II.3.1. Résultats et discussion

L'ensemble des résultats concernant l'huile essentielle de cyprès sont exposés dans l'Annexe 16. Comme dans l'huile essentielle de citron, les taux de récupérations des substances actives dans l'huile esssentielle de cyprès sont très majoritairement compris en 70 et 120 %. Cependant, un nombre légèrement plus important de pesticides admettent des TRs < 70 % (Tableau 52).

			TR 10 µg.L^{-1}		TR 50 µg.L^{-1}	
Pesticide	**LOQ$_{dilution}$ (µg.L^{-1})**	**LOQ$_{évaporation}$ (µg.L^{-1})**	**Moyenne (%)**	**CV (%)**	**Moyenne (%)**	**CV (%)**
Bifenazate	5	5	15,0	5,9	17,4	4,9
Carbofuran	5	1	36,4	6,4	39,4	1,8
Carboxin*	10	10	72,2	2,3	67,5	1,5
Clofentezine	5	25	/	/	13,1	15,5
Cycloxydime*	5	5	68,2	6,8	66,4	2,1
Dichlorvos*	25	10	70,9	6,9	62,7	2,5
Disulfoton	25	10	63,5	10,3	63,5	7,7
Fluazinam	5	1	66,1	8,4	60,6	5,7
Sethoxydim	10	10	69,2	2,7	70,5	2,9
Thiophanate methyl*	10	25	/	/	7,8	8,3

*Substance active admettant un TR < 70% dans l'huile essentielle de citron

Tableau 52. Substances actives admettant des TR < 70%

En plus de quatre substances actives (carboxin, cycloxidime, dichlorvos, thiophanate-méthyle) qui admettent déjà des TRs inférieure à 70 % dans l'huile essentielle citron, les TRs de six pesticides supplémentaires sont à souligner dans l'huile essentielle de cyprès. Trois d'entre eux (bifénazate, carbofuran, clofentézine) présentent, notamment, des TRs < 50 %. Cependant, les CVs de tous ces composés demeurent inférieurs à 10 % à l'exception de la clofentézine (15,5 %).

Pour le reste des composés, une nouvelle fois à l'exception de l'amitraz, les CVs sont tous inférieurs à 20 % et très majoritairement inférieurs à 5 % (environ 90 % des CVs).

II.3.2. Bilan des limites de quantification

Le Tableau 53 présente une synthèse comparative des performances des méthodes de dilution et d'évaporation sous azote pour l'analyse de 250 substances actives dans l'huile essentielle de cyprès.

Huile essentielle de cyprès		
Limite de quantification	nombre de substances actives	
	dilution	évaporation
LOQ ≤ 1 µg.L^{-1}	36	78
1 < LOQ ≤ 5 µg.L^{-1}	88	100
5 < LOQ ≤ 10 µg.L^{-1}	73	52
10 < LOQ ≤ 25 µg.L^{-1}	34	10
25 < LOQ ≤ 50 µg.L^{-1}	13	8
ND	7	3
total	251	251
Substance actives non incluses	6	6

Tableau 53. Limites de quantification des substances actives dans l'HE de cyprès en fonction de la méthode de préparation

Les résultats du Tableau 53, obtenus pour l'huile essentielle de cyprès, sont relativement similaires à ceux obtenus pour le citron. C'est-à-dire que, d'un point de vue général, l'évaporation sous azote permet d'améliorer significativement les LOQs, et donc la détection d'un nombre important de molécules. Ainsi 230 substances actives sont détectées à une teneur inférieure ou égale à 10 µg.L^{-1} avec l'évaporation, contre 197 pour la dilution.

Globalement, 114 substances actives admettent une LOQ inférieure avec l'évaporation sous azote, 128 conservent la même LOQ et seulement 2 montrent une augmentation (Annexe 16). Il s'agit du thiophanate-méthyle et de la clofentézine qui se caractérisent par des TRs faibles, respectivement de 13,1 % et 7,8 %.

II.4 L'huile essentielle de lavandin

II.4.1. Résultats et discussion

L'ensemble des résultats concernant l'huile essentielle de lavandin sont exposés dans l'Annexe 17. Contrairement aux huiles essentielles de citron et cyprès, les taux de récupération obtenus pour l'huile essentielle de lavandin sont plus problématiques, avec 45 substances actives présentant des TR inférieurs à 70 %. Parmi elles, une dizaine ne sont plus détectées (Tableau 54).

Substance active	**LOQ$_{dilution}$ (µg.L^{-1})**	**LOQ$_{évaporation}$ (µg.L^{-1})**
2,4D	25	ND
Carboxin	1	ND
Clofentezine	10	ND
Cycloxydime	5	ND
Disulfoton	50	ND
Dithianon	25	ND
MCPA	10	ND
Quinoclamine	50	ND
Séthoxydim	10	ND
Thiophanate méthyl	10	ND

Tableau 54. Substances actives non détectées avec la méthode d'évaporation sous azote appliquée à l'huile essentielle de lavandin

Les faibles taux de récupération, reportés dans le Tableau 54, s'expliquent par la dégradation et/ou l'évaporation des substances actives dues à la température de chauffage relativement élevée nécessaire à l'évaporation de l'huile essentielle de lavandin (T °C = 85 °C). Les autres substances actives admettent des TRs et CVs satisfaisants, respectivement entre 70 et 120 %, et inférieurs à 20 %. Une légère augmentation générale des CVs est toutefois notée puisque seulement 75 % admettent un CVs < 5 % contre 90 % pour les deux huiles essentielles précédentes.

II.4.2. Bilan des limites de quantification

Le Tableau 55 présente une synthèse comparative des performances des méthodes de dilution et d'évaporation sous azote pour l'analyse de 250 substances actives dans l'huile essentielle de lavandin.

Huile essentielle de lavandin		
Limite de quantification	nombre de substances actives	
	dilution	évaporation
LOQ ≤ 1 µg.L^{-1}	28	49
1 < LOQ ≤ 5 µg.L^{-1}	70	82
5 < LOQ ≤ 10 µg.L^{-1}	89	77
10 < LOQ ≤ 25 µg.L^{-1}	37	18
25 < LOQ ≤ 50 µg.L^{-1}	17	12
ND	9	12
total	250	250
Substance actives non incluses	7	7

Tableau 55. Limites de quantification des substances actives dans l'huile essentielle de lavandin en fonction de la méthode de préparation

Le bilan des LOQs concernant l'huile essentielle de lavandin est plus mitigé que pour les deux huiles essentielles précédentes. En effet, si globalement une amélioration des LOQs est constatée avec l'utilisation de l'évaporation sous azote, le nombre de substances actives non détectées augmentent parallèlement. Néanmoins, l'évaporation sous azote permet la détection de 208 substances actives à une teneur inférieure ou égale à 10 µg.L^{-1}, contre 187 pour la dilution.

De façon plus spécifique, 92 substances actives observent une diminution de leur LOQ avec l'évaporation sous azote, 139 conservent une LOQ sensiblement égale à celle obtenue avec la dilution, et 18 admettent une augmentation de leur LOQ pouvant conduire à une non détection pour une dizaine d'entre elles.

II.5 L'huile essentielle de mélisse

II.5.1. Résultats et discussion

L'ensemble des résultats concernant l'huile essentielle de mélisse sont exposés dans l'Annexe 18. L'évaporation sous azote de l'huile essentielle de mélisse entraîne la dégradation et/ou l'évaporation partielle ou totale de près de la moitié des substances actives (116/250). La température élevée (90-95 °C) nécessaire à l'évaporation de l'huile essentielle engendre des taux de récupération globalement inférieurs à ceux observés pour les trois huiles essentielles précédentes. De même que dans le cas de l'huile essentielle de lavandin, certains pesticides ne sont plus détectés (Tableau 56).

Substance active	$LOQ_{dilution}$ ($\mu g.L^{-1}$)	$LOQ_{évaporation}$ ($\mu g.L^{-1}$)
Butraline	10	ND
Clofentezine*	ND	ND
Dichlorvos	50	ND
Pencycuron	5	ND
Dithianon*	ND	ND
Fluazinam	5	ND
Mesotrione	50	ND

*détecté dans les points de gamme matrice

Tableau 56. Substances actives non détectées à cause de l'évaporation sous azote

En plus des substances actives détaillées dans le Tableau 56, une quinzaine d'autres admettent des TRs inférieurs à 20 % qui sont généralement associées à de CVs élevés supérieurs à 10 voire 20 %. Ces données ne permettent pas d'envisager une quantification convenable pour ces composés. Néanmoins, le reste des pesticides (environ la moitié) se caractérisent par des TRs et CVs satisfaisants garant d'une quantification appropriée.

II.5.2. Bilan des limites de quantification

Le Tableau 57 présente une synthèse comparative des performances des méthodes de dilution et d'évaporation sous azote pour l'analyse de 250 substances actives dans l'huile essentielle de mélisse.

Huile essentielle de mélisse		
Limite de quantification	nombre de substances actives	
	dilution	évaporation
LOQ ≤ 1 $\mu g.L^{-1}$	32	59
1 < LOQ ≤ 5 $\mu g.L^{-1}$	85	72
5 < LOQ ≤ 10 $\mu g.L^{-1}$	57	60
10 < LOQ ≤ 25 $\mu g.L^{-1}$	28	16
25 < LOQ ≤ 50 $\mu g.L^{-1}$	16	15
ND	23	19
total	241	241
Substance actives non incluses	16	16

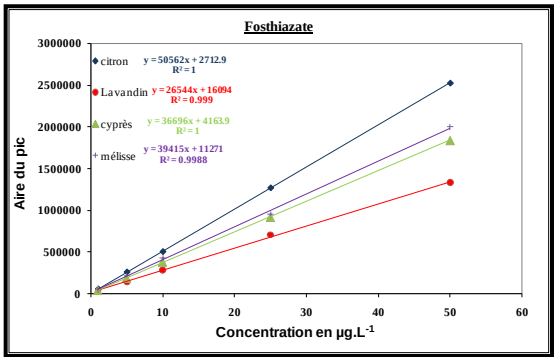
Tableau 57. Limites de quantification des substances actives dans l'HE de mélisse en fonction de la méthode de préparation

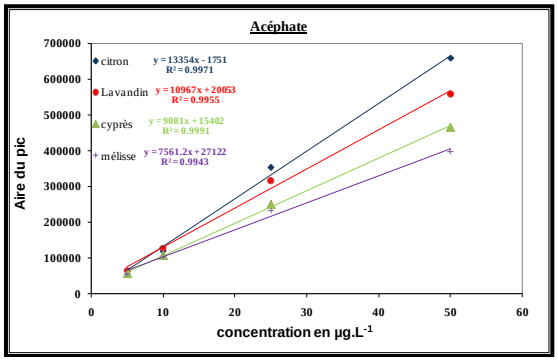
L'amélioration des limites de quantification par la mise en place d'une étape d'évaporation sous azote est, dans le cadre de l'huile essentielle de mélisse, nettement moins probante que pour les huiles essentielles précédentes. Sans tenir compte des problèmes de quantification dus aux faibles TRs et aux CVs élevés, 191 substances actives admettent une LOQ inférieure ou égale à 10 µg.L^{-1} avec l'évaporation sous azote, contre 174 pour la dilution. Chacune des deux techniques présente des avantages et inconvénients en termes de détection, selon la molécule concernée. Par exemple, l'évaporation sous azote est capable de détecter le chlorpropham et le disulfoton à une LOQ de 25 µg.L^{-1}, quand la dilution ne le permet pas à 50 µg.L^{-1}. Inversement la dilution autorise une quantification du pencyuron et du fluazinam à des teneurs de l'ordre de 5 µg.L^{-1}, alors que l'évaporation sous azote ne permet pas leur détection, du moins à des teneurs inférieures ou égales à 50 µg.L^{-1}.

De façon plus spécifique, 75 substances actives observent une diminution de leur LOQ avec l'évaporation sous azote, 132 conservent une LOQ sensiblement égale à celle obtenue avec la dilution et 21 admettent une augmentation de leur LOQ pouvant conduire à une non détection pour certaines d'entre elles (Annexe 18).

II.6 Vérification de la linéarité de la réponse

En plus de caractériser la méthode d'évaporation sous azote en termes de répétabilité, l'objectif de ces essais était de comparer la sensibilité de cette méthode avec la dilution en déterminant les LOQs de chaque substance active dans quatre huiles essentielles traitées avec les deux méthodes. Avant de discuter des avantages et inconvénients de la mise en pratique de l'évaporation sous azote, il a fallu s'assurer de sa linéarité en fonction de la concentration des substances actives. Les quatre graphiques de la Figure 91 représentent les droites étalons réalisées à partir des TRs obtenues dans les quatre huiles essentielles pour quatre substances actives.





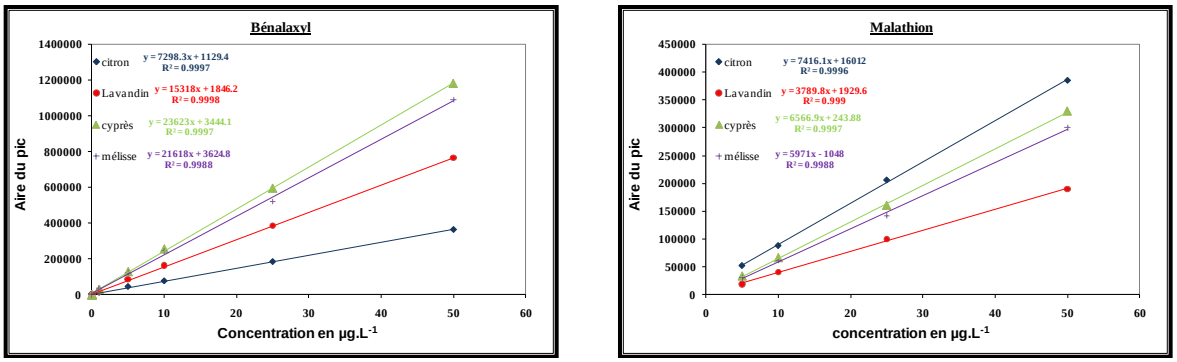


Figure 91. Droites étalons issues de la méthode évaporation sous azote de quatre substances actives en fonction de l'huile essentielle

Les droites étalons de la Figure 91 démontrent une très bonne linéarité ( ) de la réponse LC-MS/MS en fonction de la concentration. Ces graphiques mettent également en évidence des effets matrice plus ou moins importants selon la substance active et la nature de l'huile essentielle considérées. L'huile essentielle de citron occasionne, par exemple, l'effet matrice le plus élevé des quatre huiles essentielles sur le bénalaxyl et le moins élevé sur le fosthiazate.

II.7 Conclusion

Au vu de l'ensemble des données recueillies au cours de cette expérience, les huiles essentielles peuvent être classées en deux catégories, en fonction de leur température d'évaporation. D'un coté se trouvent les huiles essentielles de citron et de cyprès qui se caractérisent par une température d'évaporation inférieure à 45 °C et, d'un autre coté, les huiles essentielles de lavandin et de mélisse qui admettent une température supérieure.

Concernant les huiles essentielles de citron et cyprès, la mise en place d'une évaporation sous azote assistée par chauffage semble tout-à-fait adaptée et préférable à la dilution. En effet, les taux de récupération, de même que la répétabilité exprimée en fonction du CV sont satisfaisants. De plus, comparer à la simple dilution, l'évaporation sous azote permet de diminuer significativement les LOQs de plus d'une centaine de molécules.

L'application de l'évaporation sous azote aux huiles essentielles de lavandin et mélisse semble plus délicate. La température élevée requise pour évaporer ces huiles essentielle entraîne probablement la dégradation ou l'évaporation de nombreuses substances actives. Ce phénomène, aux conséquences multiples, est d'autant plus prononcé dans le cas de l'huile essentielle de mélisse du fait d'une température d'évaporation (90-95 °C) supérieure à celle du lavandin (80 °C). La diminution des taux de récupération, parfois critique (TR < 20 %), et l'augmentation des CVs, compliquent la quantification d'un certain nombre de molécules.

Néanmoins, la comparaison des LOQs avec la dilution montre que l'évaporation sous azote présente un intérêt certain, notamment en améliorant la sensibilité d'un bon nombre de composés en fonction de l'huile essentielle considérée. En fait, si l'évaporation sous azote ne peut clairement pas être appliquée pour ce type d'huile essentielle en temps que méthode unique, elle se révèle être complémentaire de la dilution. Les deux méthodes de préparation n'étant pas très coûteuses en temps, il est dès lors envisageable d'analyser un échantillon d'huile essentielle selon ces protocoles afin d'assurer une détection optimale de l'ensemble des substances actives.

B) Développement d'une méthode de confirmation en mode SRM-EPI

L'analyse de pesticides avec un spectromètre de masse de type triple quadripôle est généralement réalisée par l'acquisition de deux transitions SRM, qualifiées respectivement de transition de quantification et de confirmation. Lorsqu'un pesticide est détecté dans un échantillon, la transition de quantification est utilisée pour déterminer sa concentration, mais le résultat est déclaré positif si et seulement si la transition de confirmation est également détectée. Le ratio entre les intensités des deux transitions peut faire l'objet d'un critère supplémentaire de validation. L'un des inconvénients de ce procédé provient de la différence de sensibilité des transitions SRM qui rend la confirmation des positifs délicate lorsqu'il s'agit de faibles concentrations. Quelques pesticides ne présentent d'ailleurs qu'un chemin de fragmentation qui conduit à une transition SRM unique, c'est le cas notamment de l'isoxaflutol, du MCPA et du Mécoprop. De plus, dans le cas des huiles essentielles, qui ne subissent pas de purification à proprement dite, certaines transitions sont sujettent à une augmentation du bruit de fond causant une diminution de leur sensibilité (exemple de l'acéphate : Tableau 58).

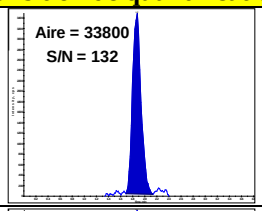
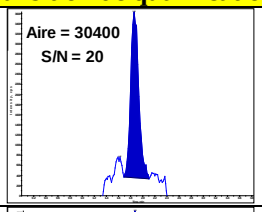
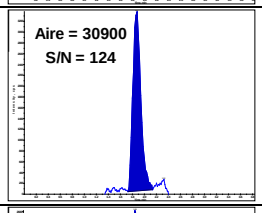
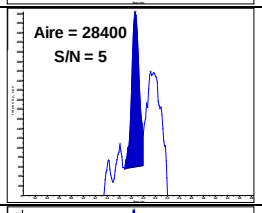
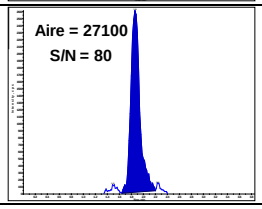
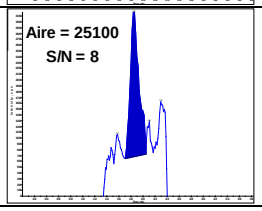
	SRM 1 (transition de quantification)	**SRM 2 (transition de qualification)**	**Ratio SRM 1/SRM 2**
Solvant			1,11
Lavandin			1,09
Citron			1,08

Tableau 58. Evolution des transitions SRM de l'acéphate en fonction de la matrice à une concentration de 10 µg/L

L'utilisation d'un spectromètre de masse de type QqLIT offre la possibilité de fonctionner en mode EPI qui permet d'obtenir le spectre de masse caractéristique de l'ion précurseur

assurant, en théorie, une idenfication plus fiable qu'une seconde transition. L'intérêt de cette technique dans le cadre de la confirmation de la présence de pesticide a donc été éprouvé.

I. Principe et spécificité du mode SRM-EPI

Le principe du mode SRM-EPI consiste à employer le mode d'acquisition SRM en tant que scan de surveillance qui va permettre le déclenchement d'un scan EPI en fonction de critères IDA (Information Dependant Acquisition), le critère de base étant l'intensité de la transition SRM. Ainsi, lorsqu'une transition SRM dépasse un seuil d'intensité défini, le spectromètre de masse passe du mode SRM au mode EPI afin de réaliser un spectre de masse de l'ion précurseur de la transition, avant de revenir au scan de surveillance SRM (Figure 92).

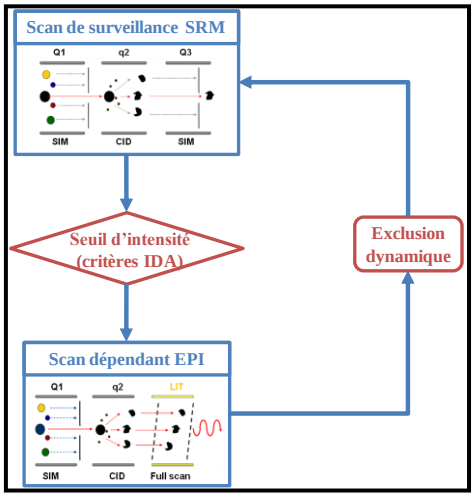


Figure 92. Principe de fonctionnement du mode SRM-EPI

Idéalement, la combinaison de ces deux modes d'acquisition devrait permettre de quantifier et confirmer les pesticides au cours d'une analyse unique. Cependant la mise en place de ce procédé dans le cadre d'une analyse multi-résidus comportant un nombre conséquent de molécules (environ 250) se révèle assez délicate. La principale difficulté tient au fait que, contrairement au mode SRM où chaque pesticide est analysé selon des critères optimisés, les paramètres de détection du mode EPI sont communs à tous les composés.

L'acquisition en mode EPI nécessite donc de définir une tension de déclusterisation DP unique et donc commune à tous les composés. Une fois l'ion précurseur sélectionné en Q_1 de la même manière qu'en SRM, il va subir une fragmentation de type CID dans la cellule de collision q_2. L'introduction du paramètre CES (Collision Energy Spread) permet de réaliser un spectre de masse de l'ion précurseur résultant de la somme des données obtenues à trois niveaux d'énergies de collision différents. Ce procédé permet d'obtenir des spectres de masse

plus riches en fragments. Ces derniers pénètrent ensuite dans la trappe d'ions linéaire dont les principaux paramètres sont le temps de remplissage de la trappe (fill time en ms) et la vitesse d'acquisition (scan rate en Da/s) qui vont jouer un rôle primordial sur la sensibilité et la résolution du spectre de masse.

L'ensemble des paramètres doivent être définis de manière à être applicable à un maximum de pesticides. Les principales difficultés posées par le mode SRM-EPI consistent :

- à obtenir un spectre de masse au bon moment, c'est-à-dire vers le sommet du pic chromatographique ;
- à obtenir des spectres de masse répétables ;
- en un allongement du temps de cycle ;
- en une sensibilité inférieure au mode SRM.

Il apparaît donc compliqué de satisfaire tous ces critères à la fois, pour disposer d'une analyse qualitative qui permette d'obtenir tous les spectres d'intérêt tout en conservant une analyse quantitative d'une sensibilité équivalente au sSRM.

L'approche envisagée consiste à effectuer une première injection en mode sSRM avec une transition SRM unique pour chaque pesticide, de repérer les positifs éventuels, puis de construire une méthode SRM-EPI spécifique, avec seulement les transitions SRM relatifs aux pesticides détectés (Figure 93).

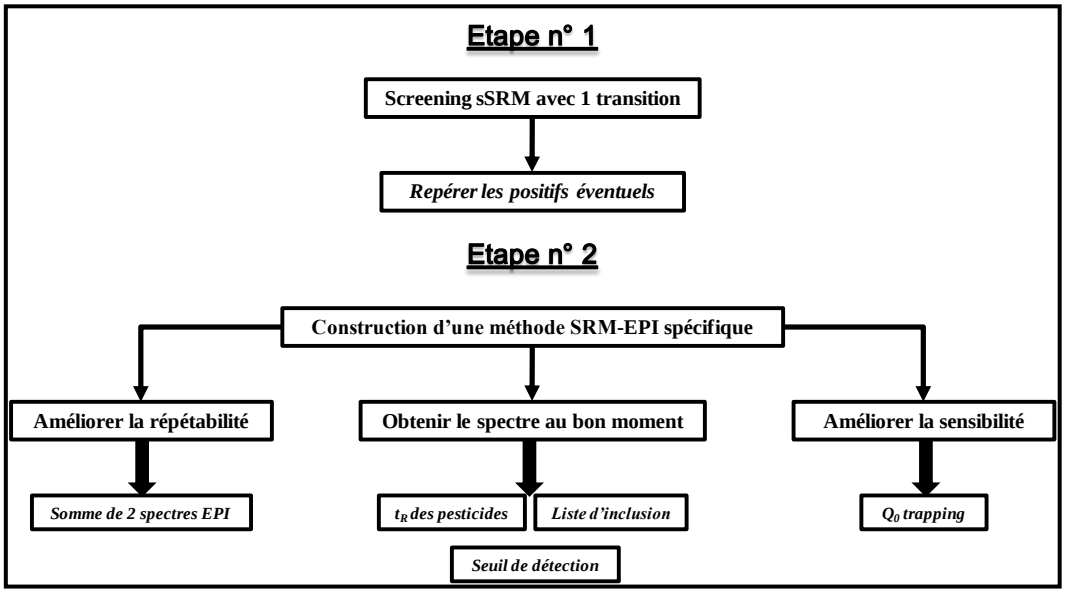


Figure 93. Approche SRM-EPI envisagée pour la confirmation des positifs

II. Optimisation des conditions de détection en mode SRM-EPI

En considérant l'approche énoncée précédemment, le nombre de transitions SRM scannées dans la méthode SRM-EPI est considérablement réduit. Le spectromètre de masse dispose donc d'un temps nettement supérieur pour effectuer les différentes opérations. Il est dès lors possible d'optimiser la qualité et la sensibilité des spectres de masse.

II.1 Détermination de la valeur globale optimum de la DP

La DP est l'un des paramètres les plus influants sur la sensibilité. Or, contrairement au mode SRM où elle est spécifiée pour chaque composé, le passage en mode EPI nécessite de déterminer une DP commune. Il est donc évident que certaines molécules subiront une perte de sensibilité non négligeable. Les DP des 233 substances actives analysées en ESI+ se répartissent comme suit :

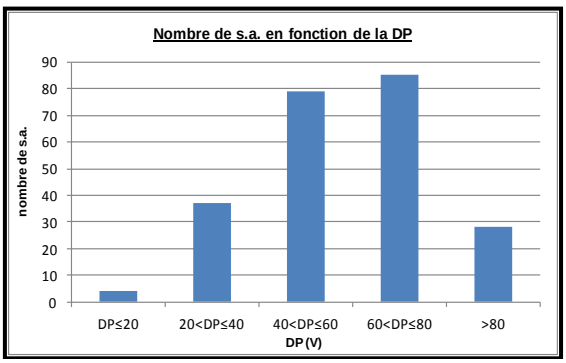


Figure 94. Répartition des DP des 233 substances actives analysées en ESI+

Les DP s'étendent de 1 V pour le bitertanol à 111 V pour le fenthion sulfone avec une très grande majorité des DP comprises entre 40 et 80V. Au vu du graphique de la Figure 94, une DP commune de 40 V semble être un bon compromis.

II.2 Les critètres IDA

Les critères IDA permettent de faire le lien entre le mode SRM et le mode EPI, c'est-à-dire qu'il détermine à quel moment le spectromètre de masse bascule du mode SRM au mode EPI. Il est ainsi possible de définir deux niveaux de critères dont le premier est illustré par la Figure 95.

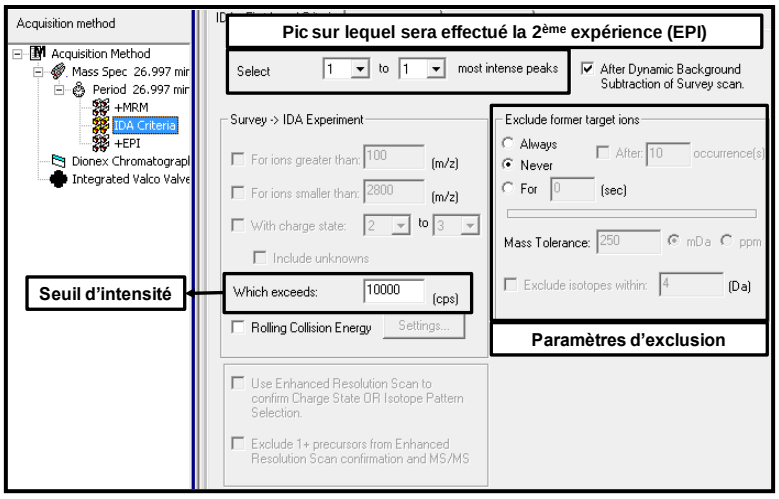


Figure 95. Illustration du premier niveau de critère IDA

Ces critères permettent de déterminer sur quel(s) ion(s) sera(ont) réalisée(s) l(es)'expérience(s) EPI en fonction de l'intensité des transitions au moment *t*. L'application du Dynamic Background Substract (DBS) permet de ne sélectionner que la(es) transition(s) dont l'(es) intensité(s) est(sont) en train d'augmenter. Cette option évite d'effectuer l'EPI constamment sur la même transition. En effet, dans le cas où une transition serait très intense, le spectromètre de masse n'effecturait pas l'EPI sur une autre transition dont l'intensité serait plus faible.

Le second critère est le seuil d'intensité des transitions SRM pour lequel l'analyseur doit basculer en mode EPI. Enfin, les derniers paramètres concernent l'exclusion dynamique des ions. Ils permettent en effet, après avoir effectué un spectre EPI, d'exclure ou non un ion pendant une durée déterminée, ou après avoir réalisé un nombre de spectre défini.

Le second niveau de critère IDA (Figure 96) offre la possibilité d'établir une liste d'inclusion ou d'exclusion d'un certain nombre d'ions.

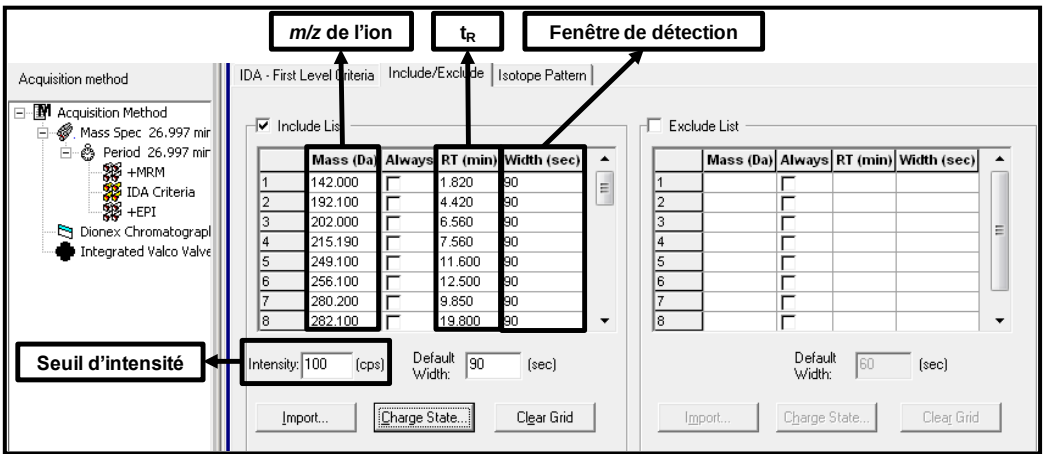


Figure 96. Illustration du second niveau de critères IDA

La liste d'inclusion permet de s'assurer qu'une expérience en mode EPI sera bien effectuée pour tous les ions composant cette liste, si la transition SRM correspondante dépasse le nouveau seuil d'intensité (Figure 96 : intensité = 100 coups) pendant la fenêtre de temps, définie par le temps de rétention de l'analyte et la largeur de la fenêtre de détection.

Dans le cadre de notre étude, l'objectif est d'être certain d'obtenir un ou plusieurs spectres EPI pour chaque pesticide présumé positif. Par conséquent, il a été décidé d'inclure l'ensemble des molécules, préalablement identifiées par une première analyse LC-ESI/sSRM, dans la liste d'inclusion avec leur temps de rétention, une fenêtre de détection de 90 s et un seuil de déclenchement relativement bas (100 coups).

Les critères IDA de premier niveau sont définis par un seuil de déclenchement très haut (10 000 coups) de manière à ce que le spectromètre de masse ne perde pas du temps à réaliser un spectre EPI sur un ion qui ne nous interesse pas. Il a été décidé de ne pas exclure les ions pour avoir un nombre de spectre important sur la durée du pic chromatographique et ainsi être certain d'en avoir un vers le sommet du pic.

II.3 Optimisation du temps d'accumulation des ions dans Q_0

L'utilisation d'un guide d'ions Q_0 pour l'accumulation des ions pendant l'étape de scan de la trappe d'ions améliore le duty cycle qui peut être exprimé selon l'équation (92).[256]

$$duty\ cycle = \frac{ion\ trap\ \ fill\ time}{total\ cycle\ time} \times 100\ \% \qquad (92)$$

Le principal avantage de la pré-accumulation, préablablement à l'analyse de masse, est que Q_0 peut stocker les ions provenant de la source pendant que la LIT procède à l'analyse de masse.[256] Cela permet d'accroître le temps effectif de travail sans pour autant rallonger le temps de cycle total.

Pour évaluer l'impact du temps de remplissage de la LIT sur les spectres de masse, un mélange de 25 pesticides, réprésentatif d'une large gamme de masse, à une concentration de 5 $\mu g.L^{-1}$ a été injecté en mode SRM-EPI avec cinq valeurs de fill time : 10, 25, 50, 75 et 100 ms. Comme le montre le Tableau 59, le temps de remplissage n'a pas une influence significative sur l'intensité des pics chromatographiques.

Pesticides	10 ms	25 ms	50 ms	75 ms	100 ms
Flazasulfuron	5.02E+04	5.02E+04	4.88E+04	4.78E+04	4.81E+04
Fluazifop-p-butyl	4.75E+05	4.99E+05	5.09E+05	5.17E+05	5.16E+05
Flucythrinate	4.45E+03	3.79E+03	4.06E+03	3.65E+03	3.68E+03
Flufenacet	2.51E+05	2.51E+05	2.46E+05	2.44E+05	2.44E+05
Flufenoxuron	4.04E+04	3.50E+04	3.40E+04	3.40E+04	3.60E+04
Fluquinconazole	1.24E+04	1.22E+04	1.21E+04	1.28E+04	1.18E+04
Flurochloridone	8.04E+03	8.16E+03	8.04E+03	8.36E+03	7.85E+03
Flusilazol	2.43E+04	2.51E+04	2.38E+04	2.40E+04	2.48E+04
Flutolanil	2.58E+05	2.58E+05	2.61E+05	2.66E+05	2.70E+05
Flutriafol	1.89E+04	1.91E+04	1.91E+04	1.84E+04	1.95E+04
Fonofos	1.51E+04	1.54E+04	1.53E+04	1.58E+04	1.53E+04
Formetanate	2.52E+05	2.66E+05	2.51E+05	2.54E+05	2.73E+05
Fosthiazate	5.42E+05	5.23E+05	5.53E+05	5.26E+05	5.51E+05
Furathiocarb	3.85E+05	3.74E+05	3.74E+05	3.70E+05	3.61E+05
Hepténophos	6.74E+04	6.24E+04	6.21E+04	6.16E+04	6.23E+04
Hexaconazole	4.96E+04	4.89E+04	4.76E+04	4.70E+04	4.77E+04
Hexazinone	7.83E+04	7.96E+04	8.15E+04	8.01E+04	7.87E+04
Hexythiazox	9.07E+04	7.25E+04	6.89E+04	7.22E+04	7.36E+04
Imazalil	1.09E+04	3.18E+04	4.72E+04	4.71E+04	4.56E+04
Imidaclopride	1.51E+04	1.66E+04	1.61E+04	1.55E+04	1.57E+04
Indoxacarbe	2.73E+04	2.70E+04	2.66E+04	2.61E+04	2.64E+04
Iprodione	1.19E+03	1.13E+03	1.10E+03	1.15E+03	1.20E+03
Iprovalicarbe	4.19E+05	4.18E+05	4.10E+05	4.11E+05	4.14E+05
Isofenphos	3.64E+05	3.77E+05	3.64E+05	3.43E+05	3.71E+05
Isoproturon	2.36E+05	2.29E+05	2.36E+05	2.43E+05	2.32E+05

Tableau 59. Evolution de l'intensité des pics chromatographiques en fonction du fill time (ms)

En revanche, l'impact sur l'allure des spectres de masse est certain mais fonction du composé étudié (flutolanil : Figure 97 et hexaconazole : Figure 98).

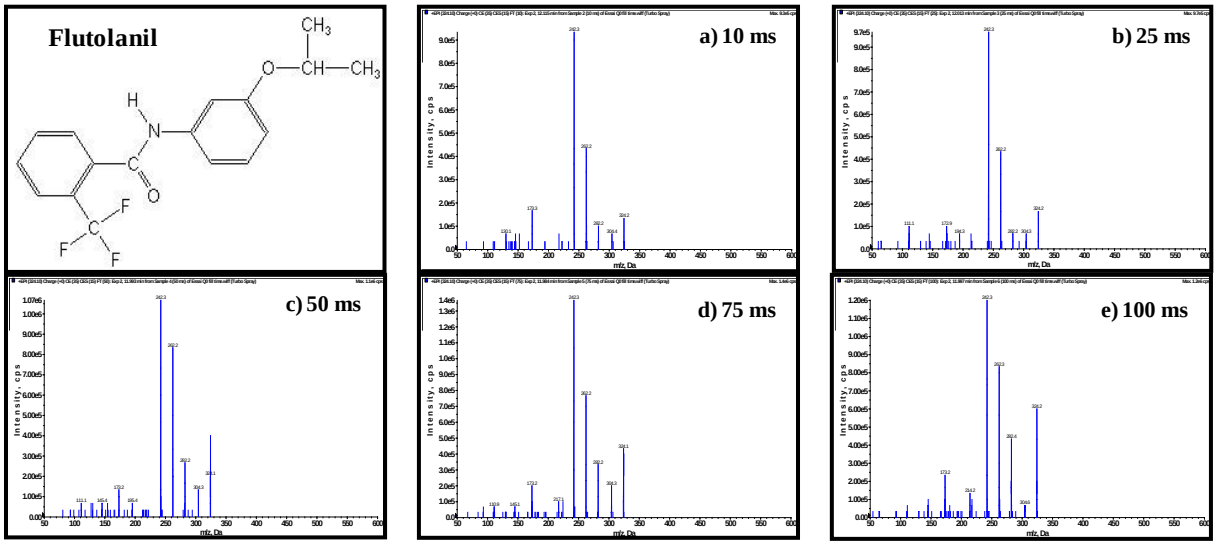


Figure 97. Spectres EPI du flutolanil en fonction du fill time a) 10 ms b) 25 ms c) 50ms d) 75ms e) 100 ms

Les spectres EPI du flutolanil présentent une allure similaire, tant au niveau des ions fragments caractéristiques que de leur ratio. La seule différence notable entre ces spectres est l'intensité des ions qui augmente avec la durée de remplissage de la LIT avec, cependant, une possible saturation observée à partir de 75 ms. Les intensités des ions obtenus avec un fill

time de 100 ms sont en effet du même ordre que celles observées pour le spectre obtenu avec un fill time de 75 ms.

L'influence du fill time est en revanche plus importante dans le cas de l'hexaconazole (Figure 98).

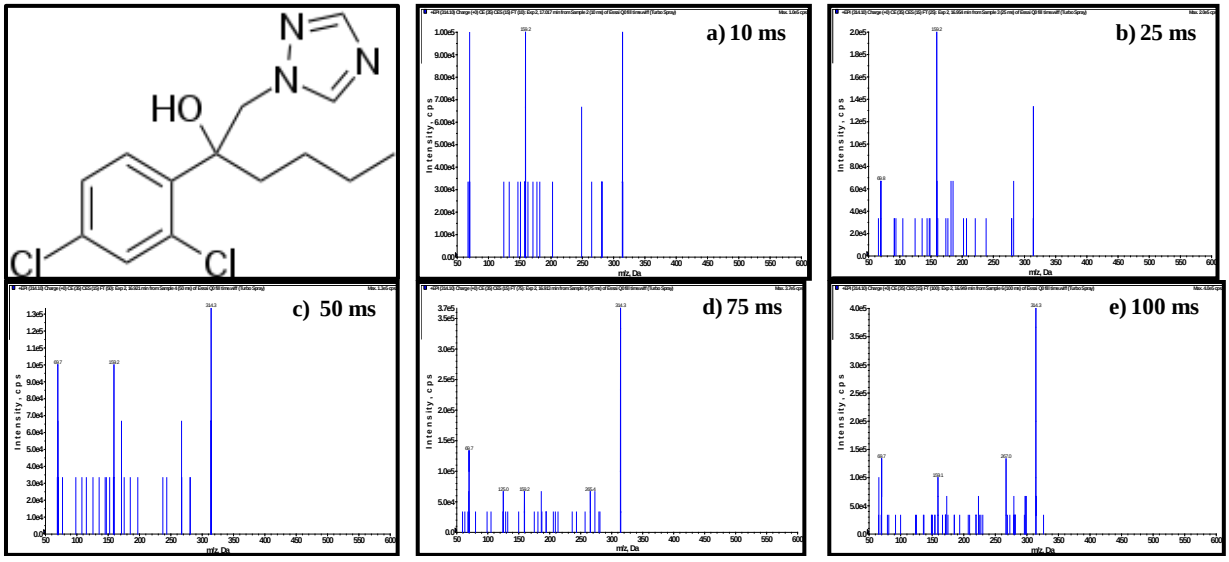


Figure 98. Spectres EPI de l'hexaconazole en fonction du fill time a) 10 ms b) 25 ms c) 50ms d) 75ms e) 100 ms

En effet, avec un fill time de 10 ms, seul l'ion fragment de rapport *m/z* 159 est visible sur le spectre alors que quatre ions (*m/z* 314, 257, 159, 70) sont observés sur le spectre de masse réalisé avec un fill time de 100 ms.

Une durée de remplissage de la trappe d'ions située entre 75 et 100 ms semble donc être la meilleure solution. Il faudra, néanmoins, faire attention à d'éventuels phénomènes d'espace de charge lorsque les spectres seront obtenus à des concentrations plus élevées.

II.4 Optimisation des énergies de collision

La combinaison CE/CES permet l'acquisition d'un spectre de masse cumulant les ions de fragmentation obtenus à trois énergies de collision différentes. Par exemple, le spectre EPI obtenu pour une CE fixée à 35 V et un CES à 15 V sera la somme des fragments obtenus pour les trois énergies de collision 20, 35 et 50 V (35 ± 15 V). L'objectif est de déterminer quelle est la combinaison qui conduit aux spectres de masse les plus fournis.

Un mélange de 25 pesticides, identique au précédent, a été injecté à une concentration de 10 µg.L^{-1} avec cinq combinaisons de CE/CES : 35 ± 15 V, 40 ± 15 V, 40 ± 20 V, 45 ± 15 V,

45 ± 20 V. Pour étudier l'impact de ces paramètres, le formetanate a été choisi comme exemple car c'est une molécule de faible poids moléculaire qui produit peu d'ions fragments.

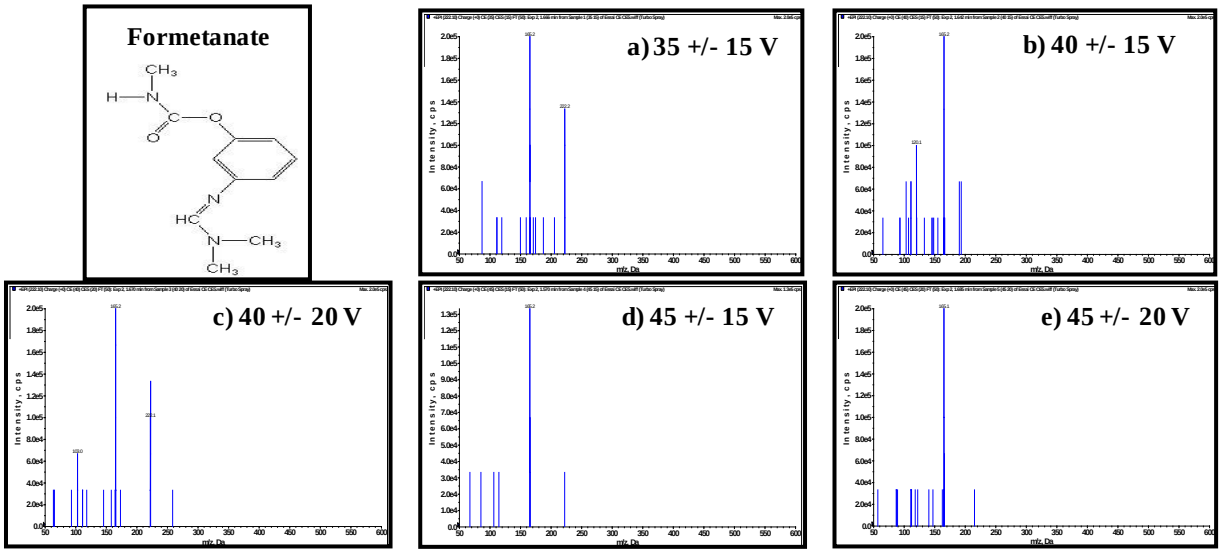


Figure 99. Spectre EPI du formetanate en fonction des valeurs de CE/CES a)35± 15V b) 40 ± 15V c) 40 ± 20 V d) 45 ± 15 V e) 45 ± 20 V

La Figure 99 montre que les spectres EPI obtenus avec les combinaisons 40 ± 15 V, 45 ± 15 V et 45 ± 20 V ne présentent pas l'ion précurseur de rapport *m/z* 222. En effet, les spectres de plus basses énergies pour ces combinaisons sont réalisés à 25, 30 et 25 V respectivement. L'ion *m/z* 222 se fragmente déjà de façon importante à ces énergies et l'addition des deux spectres de plus haute énergie conduit à une intensité relative quasiment nulle par rapport aux autres fragments, notamment le *m/z* 165. La combinaison 40 ± 20 V permet d'obtenir un ion caractéristique de plus (*m/z* = 103) que la combinaison 35 ± 15 V.

Pour de nombreuses substances actives, les spectres EPI disposent de plusieurs fragments caractéristiques quelle que soit la combinaison. Pour certains composés tel le formetanate, il semblerait que la combinaison 40 ± 20 V soit la plus adaptée.

II.5 Optimisation de la vitesse d'acquisition de la trappe 2D

La vitesse d'acquisition de la LIT va influer à la fois sur la sensilité et la résolution. Sur le 4000 QTrap, trois vitesses de scans sont proposés : 250, 1000 et 4000 Da/s. La Figure 100 présente les spectres EPI du flutolanil obtenus pour les vitesses d'acquisition 1000 et 4000 Da/s, la vitesse de 250 Da/s n'a pas été testée car elle imposerait des temps de cycle trop long.

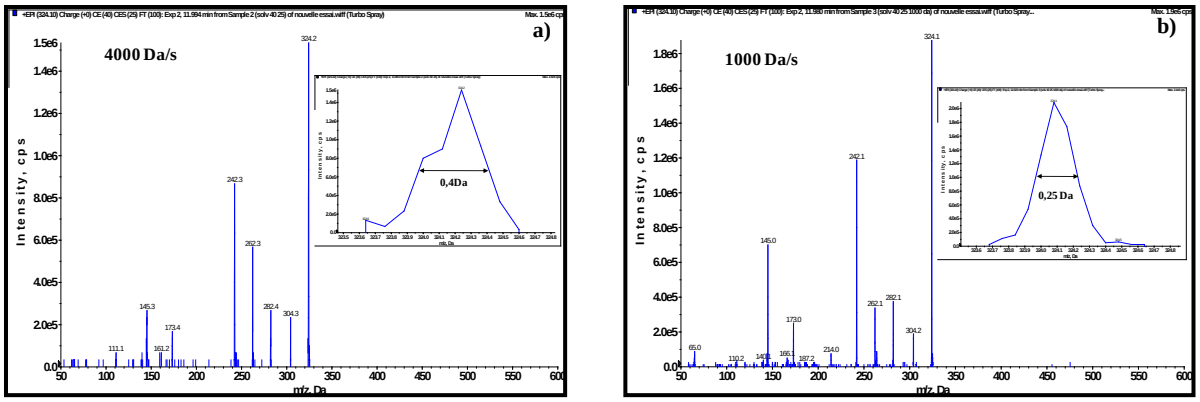


Figure 100. Spectres EPI du flutolanil obtenus avec des vitesses d'acquisition de a) 4000 Da/s et b) 1000 Da/s

La résolution est nettement meilleure lorsque la vitesse d'acquisition est plus lente (Figure 100). La largeur à mi-hauteur pour l'ion *m/z* 324 est effectivement égale à 0,25 Da et 0,4 Da pour les vitesses de scan respectives de 1000 et 4000 Da/s, correspondant à des résolutions de 1300 et 810. La sensibilité est également plus élevée avec une vitesse de 1000 Da/s, contrairement à ce qui était attendu, car une augmentation de la résolution est généralement synonyme de perte de sensibilité.

La vitesse d'acquisition sélectionnée pour la suite des expériences est donc 1000 Da/s puisque la résolution et la sensibilité sont significativement meilleures qu'à 4000 Da/s. Le seul inconvénient de cette vitesse est qu'elle engendre un temps de cycle plus long. Néanmoins, cela ne devrait pas être un problème avec l'approche envisagée qui consiste à analyser en mode SRM-EPI seulement les pesticides possiblement positifs, leur nombre sera donc assez restreint.

De même que pour la LIT, l'influence de la résolution de Q_1 a été évaluée.

II.6 Etude de l'impact de la résolution du filtre quadripolaire Q_1 sur la concordance des spectres EPI

La sélection de l'ion précurseur peut être effectuée avec trois niveaux de résolution « *unit* », « *high* » et « *low* » qui correspondent respectivement à des largeurs à mi-hauteur de 0,7 u, 0,5 u et 1 u. La résolution sur la sélection de l'ion parent peut avoir une importance pour éviter les interférents isobares provenant de la matrice. Afin d'évaluer son impact, deux mélanges de 15 pesticides à une concentration de 10 µg.L^{-1} ont été préparés : le premier dans le solvant MeOH 1 % et le second dans l'huile essentielle de citron. Les mélanges ont été injectés successivement en mode SRM-EPI avec les trois niveaux de résolution disponibles pour Q_1. Les spectres EPI obtenus dans le solvant servent de référence.

La Figure 101 présente les spectres EPI du méthabenthiazuron obtenus dans le solvant avec une résolution « unit » pour Q_1 et dans l'huile essentielle de citron pour les résolutions « *low* », « *unit* » et « *high* ».

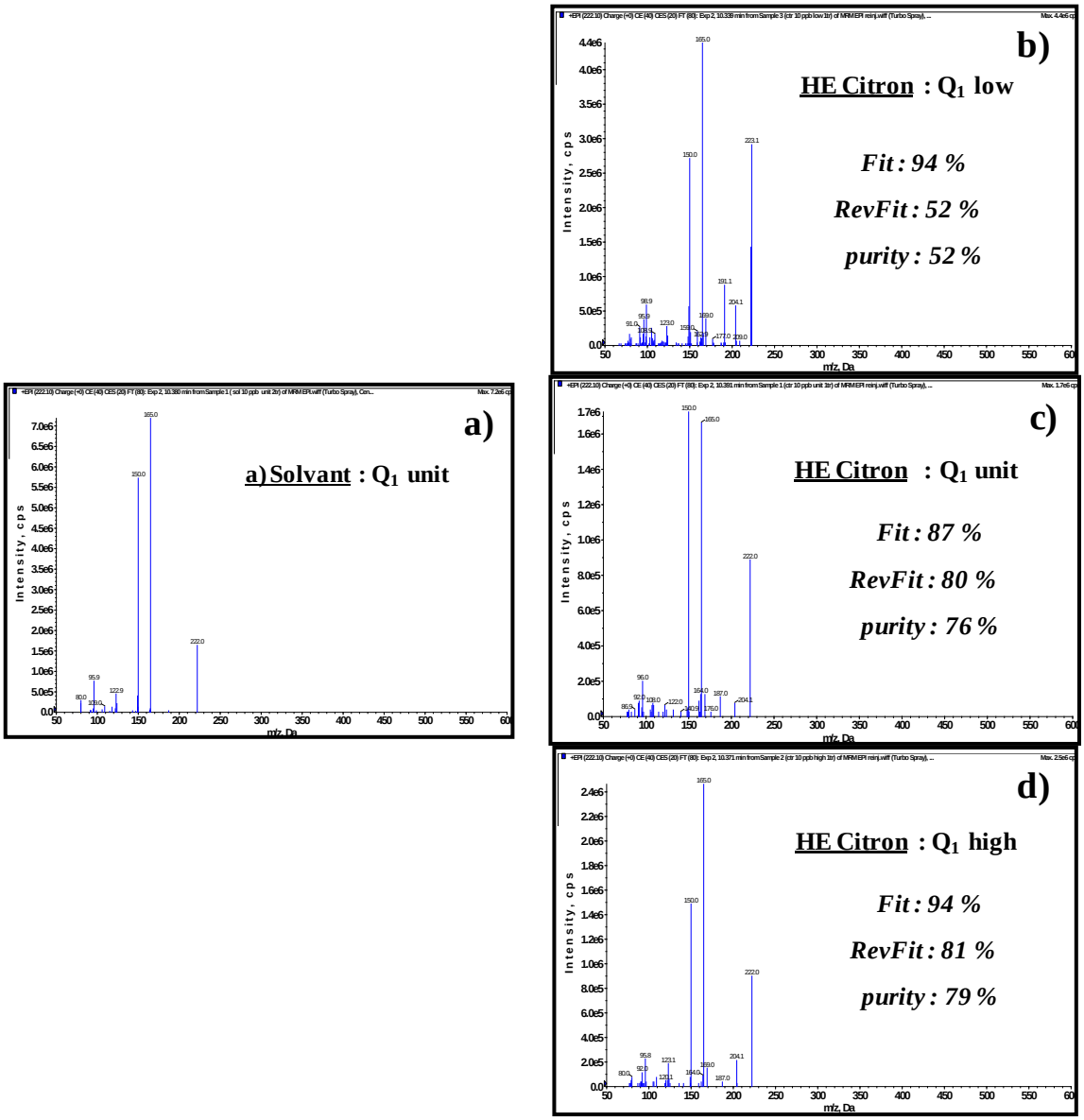


Figure 101. Spectres EPI du méthabenzthiazuron en fonction de la résolution de Q_1 à gauche a) dans le solvant et à droite dans l'huile essentielle de citron b) Q_1 low c) Q_1 unit d) Q_1 high

La concordance des spectres EPI obtenus dans l'huile essentielle de citron avec celui du solvant est exprimée à travers les ***Fit***, ***RevFit*** et ***Purity***.

Le *Fit* mesure la concordance entre le spectre de la librairie et le spectre inconnu. Il ne tient pas compte des pics présents dans le spectre inconnu et absents de celui de la librairie. Un *Fit* parfait donnera un score de 100 %. Les spectres EPI du méthabenzthiazuron dans l'huile essentielle de citron admettent tous un *Fit* très satifaisant (*Fit* ≥ 87 %). En effet, les

principaux ions caractéristiques du méthabenzthiazuron du spectre de référence (solvant) à savoir les ions *m/z* 96, 123, 150, 165 et 222 sont également présents dans les spectres obtenus dans l'huile essentielle de citron dans des ratios similaires. Le *Fit* légèrement plus faible observé pour le spectre réalisé avec Q_1 en résolution « *unit* » peut s'expliquer par une intensité importante de l'ion *m/z* 160. Globalement, la résolution de Q_1 ne semble pas avoir d'influence significative sur le *Fit*. En revanche, une amélioration du *RevFit* est constatée avec l'augmentation de la résolution.

Le *RevFIT* mesure la concordance du spectre inconnu avec le spectre de la librairie. Il ne tient pas compte des ions présents dans le spectre de la librairie et absents du spectre inconnu. Un *RevFit* parfait donnera un score de 100 %. Concernant le méthabenzthiazuron, le *RevFit* varie effectivement de 52 % en « *low* » à 80 % et 81 % en « *unit* » et « *high* » respectivement. Cette évolution s'explique par un bruit de fond plus important dans le cas de la résolution « *low* » constitué des ions provenant de la matrice et due à la large fenêtre d'ouverture du quadripôle. L'ion *m/z* 223 est, par exemple, uniquement observé dans ce spectre. La différence de *RevFit* entre les modes « *unit* » et « *high* » n'est pas réellement significative (1%). Cependant, l'allure du spectre en résolution « *high* » semble plus « propre » qu'en « *unit* ».

La *Purity* mesure le taux de non concordance dû aux pics additionnels présents sur l'un ou l'autre des spectres et est fonction du *Fit* et *RevFit.* Si le *Fit* et le *RevFit* sont égaux à 100 %, la *Purity* sera aussi égale à 100 %. Dans le cas contraire, la purity sera inférieure à 100 %. Il est donc logique de trouver une valeur de *Purity* nettement plus faible pour la résolution « *low* », la meilleure *Purity* étant observée pour la résolution « *high* ».

Le meilleur taux de concordance entre le spectre du méthabenzthiazuron dans l'huile essentielle de citron et le spectre de référence réalisé dans le solvant est donc obtenu pour une résolution « *high* » de Q_1. Les résultats obtenus pour les 14 autres pesticides confirment cette observation.

Pesticide	**Ion précurseur (*m/z*)**	**Q_1 *Low* (*Fit/RevFit/Purity*)**	**Q_1 *Unit* (*Fit/RevFit/Purity*)**	**Q_1 *High* (*Fit/RevFit/Purity*)**
Aldicarbe	208,0	95/80/78	84/87/76	92/92/88
Acibenzolar-S-methyl	211,1	77/23/22	75/24/22	81/33/28
Dichlorvos	220,8	80/34/30	67/73/55	76/85/76
Methabenzthiazuron	222,1	94/52/52	87/80/76	94/81/79
Acetamipride	223,1	69/65/61	77/78/74	72/78/70
Imidaclopride	256,2	55/19/18	53/40/36	46/38/34
Bromacil	261,1	91/88/85	90/93/89	93/95/91
Napropamide	272,3	69/33/32	71/38/36	70/43/41
Pendimethaline	282,1	72/24/24	63/43/41	71/44/42
Butraline	296,0	93/41/41	91/65/61	90/55/52
Methidathion	303,0	54/4/3	73/62/54	70/72/53
Diniconazole	326,0	44/17/17	46/30/26	61/52/48
Malathion	331,0	78/28/26	75/40/36	75/40/33
Isoxaben	333,1	80/40/40	74/65/63	74/67/65
Fipronil	453,9	76/70/68	70/64/62	39/43/33

Tableau 60. Concordance des spectres EPI obtenus dans l'huile essentielle de citron avec le spectre EPI de référence (solvant) pour 15 pesticides

De même que pour le méthabenzthiazuron, les données du Tableau 60 montrent des résultats comparables en termes de *Fit* pour les trois résolutions, mais une nette amélioration du *RevFit* et, par conséquent, de la *Purity* avec les résolutions « *unit* » et « *high* » comparées au « *low* ». Sur les 15 pesticides, 10 admettent un *RevFit* légèrement plus élevé avec la résolution « *high* », 3 avec la résolution « *unit* » et 2 le même *RevFit* quelque soit la résolution. La résolution « *high* » sera donc préférée à la résolution « *unit* ».

Les *Fit* obtenus avec une résolution « *high* » sont supérieurs à 70 % pour 12 des 15 pesticides, ce qui est un score satisfaisant. Les *RevFit* sont, quant à eux, plus variables de 33 % à 95 % et, généralement moins bons que les *Fit*. La résolution « *high* » ne permet donc pas totalement de s'affranchir de la matrice. Les scores obtenus pour la *Purity* ne sont, par conséquent, pas toujours très satisfaisants. En effet, 7 des 15 pesticides admettent une *Purity* inférieure à 50 %. Cependant, si les scores reflètent effectivement la concordance statistique entre deux spectres, l'interprétation de l'utilisateur reste primodiale. Par exemple, dans le cas du napropamide, qui admet une purity de 41 %, l'observation des spectres exposés dans la Figure 102 montrent la présence des cinq ions majoritaires du spectre de référence dans le spectre matrice avec des ratios similaires.

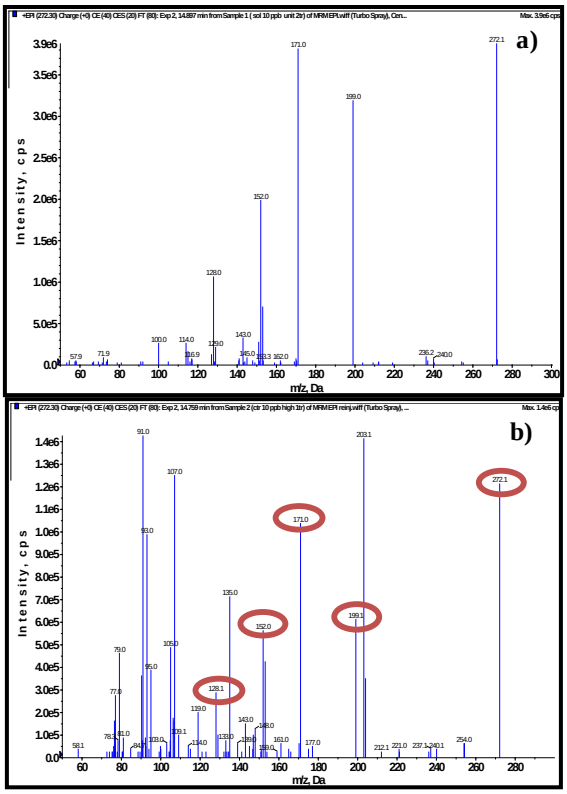


Figure 102. Spectres EPI du napropamide dans a) le solvant et b) l'huile essentielle de citron

Malgré les mauvais scores reportés dans le Tableau 60 pour le napropamide, il faut remarquer qu'une comparaison des spectres a) et b) de la Figure 102 pourrait conduire l'utilisateur à valider la présence de ce composé dans l'huile essentielle de citron. En effet, on observe sur le spectre b) les ions fragments d'intérêts aux *m/z* attendus et avec des intensités relatives en accord avec le spectre de référence.

III. Résumé des principaux paramètres de la méthode SRM-EPI

Les essais précédemment décrits ont permis de déterminer les paramètres de détection optimum dans le cadre de notre étude (Tableau 61).

Critères d'acquisition		Critères de sélection IDA
DP	40V	Sélection de l'ion le plus intense à partir d'une liste d'inclusion comprenant les pesticides positifs avec leur temps de rétention et un seuil d'intensité de déclenchement.
$Q_{0trapping}$/fill time	80 ms	
CE/CES	40 ± 20 V	
Vitesse d'acquisition de la LIT	1000 Da/s	
Résolution de Q1	high	

Tableau 61. Résumé des paramètres d'acquisition en mode SRM-EPI

Compte tenu des résultats obtenus lors de ce développement, la méthode d'acquisition SRM-EPI semble être en mesure de pouvoir confirmer la présence de pesticides dans les huiles essentielles.

C) Application à l'analyse d'échantillons d'huile essentielle

Les différentes expériences, détaillées tout au long de ce mémoire, ont permis de mettre en évidence plusieurs points critiques, tant au niveau de la préparation de l'échantillon que de l'analyse LC-ESI-MS/MS. Cette partie a pour objectif de faire un point sur la méthodologie analytique à mettre en œuvre dans le cadre d'analyse d'échantillons réels d'huile essentielle, avant de l'appliquer sur des échantillons d'huiles essentielles de marjolaine, de citron et d'orange.

I. Description de la méthodologie analytique

I.1 Méthodologie sur la préparation de l'échantillon

La méthode de préparation appliquée à l'huile essentielle va essentiellement dépendre de son point éclair ainsi que de sa solubilité dans le solvant d'injection. Ces données permettront de choisir la méthode de préparation, à savoir la dilution ou l'évaporation sous azote. Elles conduiront aussi à proposer la mise en place d'une purification dans l'azote liquide si celle-ci est requise. Le Schéma 17 présente une synthèse du protocole expérimental à mettre en œuvre.

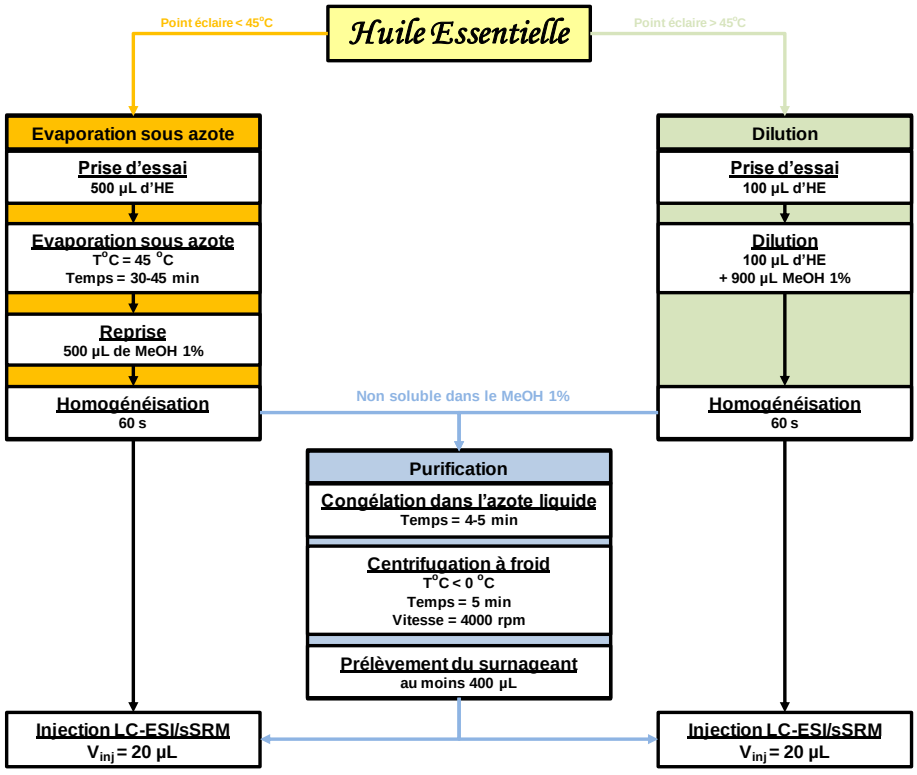


Schéma 17. Synopsis de la préparation d'un échantillon d'huile essentielle

I.2 Analyse LC-ESI-MS/MS de 250 substances actives

Ce paragraphe a pour but de définir le screening de substances actives avec leur limite de quantification, d'effectuer un rappel sur les analyses LC-ESI-MS/MS et enfin, de discuter de la méthodologie à appliquer pour quantifier les substances actives.

I.2.1. Limites de quantification de 250 substances actives

La comparaison des sensibilités des méthodes de dilution et d'évaporation sous azote sur les quatre huiles essentielles de citron, lavandin, cyprès et mélisse, a permis de sélectionner un screening de 250 substances actives analysées en LC-ESI-MS/MS et d'établir leur limite de quantification (Tableau 62).

Multi-résidus Huiles Essentielles 250 substances actives LC/MS/MS				
2,4D	Coumaphos	Fluazinam	Methiocarbe sulfone	Propyzamide
Abamectine	Cyanazine	Fludioxonil	Methiocarbe sulfoxide	Proquinazid
Acephate	Cyazofamide	Flufenacet	Methomyl	Prosulfocarbe
Acetamipride	Cyclanilid	Flufenoxuron	Methoxyfenozid	Prosulfuron
Acibenzolar-S-methyl	Cycloxydime	Fluquinconazole	Métobromuron	Pymetrozin
Aclonifen	Cymoxanil	Flurochloridone	Metolachlor	Pyraclostrobine
Alachlore	Cyproconazole	Fluroxypyr	Métoxuron	Pyridaben
Aldicarbe	Cyprodinil	Flusilazol	Metrafenone	Pyridafenthion
Aldicarbe sulfone	Cyromazine	Flutolanil	Metribuzine	Pyridate
Aldicarbe sulfoxyde	Deltamethrine	Flutriafol	Mevinphos	Pyrimethanil
Ametryn	Desmedipham	Fomesafen	Molinate	Pyriproxyfen
Amidosulfuron	Diazinon	Formetanate	Monocrotophos	Quinalphos
Amitraz	Dichlofluanid	Fosthiazate	Myclobutanil	Quinoclamine
Atrazine	Dichlorprop-p	Furathiocarb	Napropamide	Quinoxyfen
Azaconazole	Dichlorvos	haloxyfop-p	Norflurazon	Quizalofop
Azimphos-methyl	Diethofencarb	Hepténophos	Nuarimol	Quizalofop-p-ethyl
Azoxystrobine	Difenoconazole	Hexaconazole	Ométhoate	Resmethrin
Benalaxyl	Diflubenzuron	Hexaflumuron	Oryzaline	Rimsulfuron
Bendiocarb	Diflufenicanil	Hexazinone	Oxadiazon	Rotenone
Benfuracarbe	Dimetachlor	Hexythiazox	Oxamyl	Sethoxydim
Benomyl	Dimethenamid	Imazalil	Oxycarboxin	Simazine
Benoxacore	Dimethoate	Imidaclopride	Paclobutrazol	Spinosad
Bentazone	Dimethomorph	Indoxacarbe	Paraoxon methyl	Spiroxamine
Bifenazate	Diniconazole	Ioxynil	Parathion ethyl	Sulfosulfuron
Bifenthrine	Disulfoton	Iprodione	Penconazole	Sulfotep
Bitertanol	Dithianon	Iprovalicarbe	Pencycuron	tau-fluvalinate
Boscalid	Diuron	Isofenphos	Pendimethaline	Tebuconazole
Bromacil	Endosulfan sulfate	Isoproturon	Permethrin	Tebufenozide
Bromoxynil	Epoxyconazole	Isoxaben	Phenmedipham	Tebufenpyrade
Bromuconazole	Ethion (diethion)	Isoxaflutol	Phenthoate	Teflubenzuron
Bupirimate	Ethofumesate	kresoxim methyl	Phorate	Terbufos
Buprofezine	Ethoprophos	Lenacile	Phosalone	Terbuthylazine
Butraline	Etofenprox	Linuron	Phosmet	Terbutryn
Carbaryl	Etoxazol	Lufenuron	Phosphamidon	Tetraconazole
Carbendazime	Famoxadone	Malaoxon	Picolanifen	Thiabendazol
Carbetamide	Fénamidone	Malathion	Picoxystrobin	Thiachlopride
Carbofuran	Fenamiphos	MCPA	Piperonyl butoxide	Thiametoxam
Carbofuran-3 OH	Fenarimol	Mecoprop	Pirimicarbe	Thiodicarbe
Carbosulfan	Fenazaquin	Mefenoxam	Pirimicarbe desmethyl	Thiophanate méthyl
Carboxin	Fenbuconazole	Mepanipyrim	Pirimiphos-éthyl	Tolyfluanide
Carfentrazone éthyle	Fenhexamid	Mepronil	Pirimiphos-methyl	Triadimefon
Chlorfenvinphos	Fenoxycarbe	Mesosulfuron methyl	Prochloraz	Triadimenol
Chlorfluazuron	Fenpropimorphe	Mesotrione	Profenofos	Trichlorfon
Chloridazone	fenpyroxymate	Metamitrone	Prometryn	Triclopyr
Chlorotoluron	Fenthion	Metazachlore	Propachlore	Trifloxystrobine
Chlorpropham	Fenthion sulfone	Metconazole	Propaquizafop	Triflumuron
Chlorpyrifos	Fenthion sulfoxide	Methabenzthiazuron	Propargite	Triflusulfuron méthyl
Chlorsulfuron	fipronil	Methamidophos	Propazin	Triticonazol
Clofentezine	flazasulfuron	Methidathion	Propiconazole	Vamidothion
Clomazone	fluazifop-p-butyl	Methiocarbe	Propoxur	Zoxamide

1 < LOQ < 10 µg.L^{-1}	10 < LOQ < 50 µg.L^{-1}	LOQ = 50 µg.L^{-1}

Tableau 62. Screening de 250 substances actives analysées dans les huiles essentielles par LC-ESI-MS/MS

Etant donné la variabilité des huiles essentielles en termes de composition et les protocoles de préparation mis en place, la sensibilité de la méthode analytique pour les 250 pesticides reste, dans une certaine mesure, dépendante de la nature de l'huile essentielle. C'est pourquoi les limites de quantification données ne sont pas fixes et sont présentées sous forme d'échelles. Néanmoins, aucune molécule du Tableau 62 n'admet de limite de quantification supérieure à 50 $\mu g.L^{-1}$.

I.2.2. Analyse par LC-ESI/sSRM et LC-ESI/SRM-EPI

Une fois la préparation de l'échantillon terminé, l'extrait est injecté une première fois en LC-ESI/sSRM en mode ESI+ et ESI- dans des conditions rappelées en Annexe 10. L'analyse en mode ESI+ ne comprend qu'une seule transition pour chaque pesticide afin d'optimiser la détection. En revanche l'analyse en mode ESI-, ne comportant que 24 molécules, est opérée avec les deux transitions de chaque pesticide.

Dans le cas où des pesticides seraient détectés, une analyse de confirmation LC-ESI/SRM-EPI est effectuée avec une liste d'inclusion composée de l'ensemble des pesticides détectés lors de la première analyse. Les spectres EPI obtenus à partir des échantillons sont ensuite comparés avec des spectres de référence réalisés dans le solvant.

Il est également possible de procéder à une analyse supplémentaire en LC-ESI/sSRM comportant les deux transitions des pesticides détectés lors de la première analyse.

I.2.3. Quantification des substances actives

Compte tenu de la diversité des huiles essentielles en termes de composition chimique, même au sein d'huiles essentielles provenant d'un matériel végétal de nature similaire, il apparaît compliqué de disposer d'un témoin parfaitement représentatif de chaque huile essentielle. Par conséquent, la quantification à partir d'une gamme matrice semble compromise.

La solution qui paraît la plus à même de quantifier les pesticides dans les huiles essentielles s'avère être la méthode des ajouts dosés. Elle consiste à ajouter une concentration connue en pesticide de l'ordre de la concentration supposée dans l'échantillon. Evidemment, une quantification précise nécessite d'estimer préalablement la concentration présente dans l'échantillon. Pour se faire, la méthodologie envisagée consiste à effectuer systématiquement, pour chaque échantillon, un ajout dosé à une concentration de 5 $\mu g.L^{-1}$ ou 50 $\mu g.L^{-1}$ en fonction de la méthode de préparation utilisée. Ces concentrations correspondent respectivement aux limites de quantification hautes des extraits, après préparation de

l'échantillon avec la méthode de dilution ou d'évaporation sous azote. Ce procédé présente plusieurs avantages. En premier lieu, il permet de s'assurer de la détection de tous les composés aux limites de quantification annoncées. Ensuite, il permet de mettre en évidence la présence d'interférents à l'exemple de la substance active diéthofencarbe dans une huile essentielle d'eucalyptus *globulus* (Figure 103).

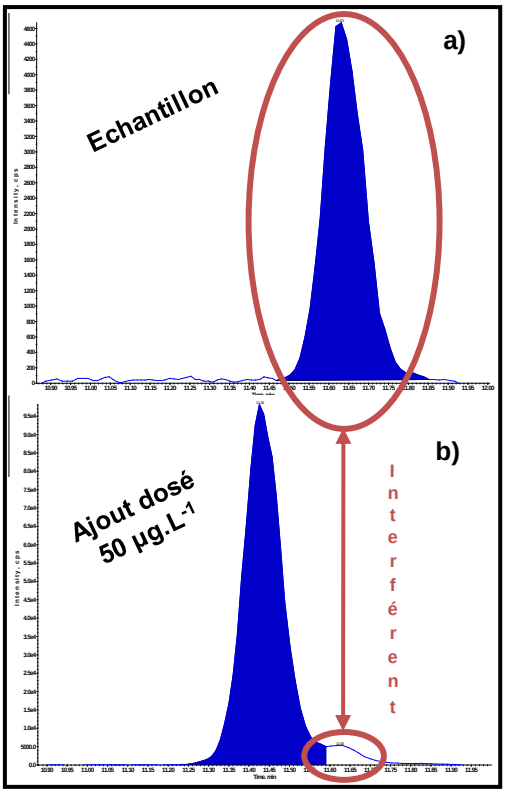


Figure 103. Signal relatif à la transition 268,0→226,1 du diéthofencarbe détecté dans a) l'huile essentielle d'eucalyptus globulus et b) l'ajout dosé à 50 µg.L^{-1}

En effet, le signal obtenu au t_R = 11,63 min dans l'huile essentielle d'eucalyptus (Figure 103 a)) laisserait supposer la présence de la molécule de diéthofencarbe dans l'échantillon. L'injection de l'ajout dosé à 50 µg.L^{-1} permet d'affirmer que ce pic est issu d'un interférent. En effet, le chromatogramme de la Figure 103 b) révèle que le diéthofencarbe a, en réalité, un t_R = 11,43 min et que le pic observé dans l'échantillon est toujours présent dans l'ajout dosé avec un t_R = 11,63. Ce signal provient donc bien d'un interférent de la matrice.

Enfin, le dernier avantage de ce procédé est qu'il permet de quantifier directement tous les pesticides présents dans l'échantillon à des teneurs comprises dans une gamme d'environ 10 à 100 µg.L^{-1} avec un ajout dosé de 50 µg.L^{-1}. Il permet également d'estimer la concentration des autres pesticides afin d'ajuster la concentration de l'ajout dosé ou d'envisager la dilution de l'échantillon en cas de signal trop intense.

II. Analyse d'échantillons réels d'huile essentielle

Les résultats présentés ci-dessous concernent l'analyse de cinq échantillons d'huiles essentielles produites par les techniques de distillation (marjolaine) et d'expression (citron et orange). Parmi ces cinq huiles essentielles, trois sont d'origine « bio » et deux « non bio ».

II.1 Analyse d'une huile essentielle de marjolaine d'origine « bio »

Une huile essentielle de marjolaine d'origine « bio » a été analysée selon le protocole décrit précédemment. Le point éclair de la marjolaine étant environ égal à 60 °C, il se situe dans une zone qui n'a pas été étudiée au cours du développement. C'est pourquoi il a été décidé d'appliquer les deux méthodes de préparation, à savoir la dilution et l'évaporation sous azote.

Pour contrôler la méthode d'évaporation sous azote, un taux de récupération à une concentration de 50 $\mu g.L^{-1}$ a été réalisé, les résultats sont présentés en Annexe 19. A l'exception du dithianon qui n'est pas du tout récupéré et des substances actives clofentézine (TR = 10,7 %), dichlorvos (TR = 23,5 %), fluazinam (TR = 44,5 %), mésotrione (TR = 62,8 %), molinate (TR = 68,5 %), oryzaline (TR = 43,1 %), pencyuron (TR = 62,2 %) et thiophanate-méthyle (TR = 56,2 %), l'ensemble des substances actives sont récupérées à des taux satisfaisants (70-120 %).

La première analyse LC-ESI/sSRM a mis en évidence la détection de 12 substances actives. Il s'agit de l'azoxystrobine, du chlorpyrifos, du diazinon, du disulfoton, de l'éthion, de l'hexazinone, du malathion, du méfénoxam, du pipéronil butoxide, du pirimicarbe, du profénofos et du sulfotep. Afin de confirmer la réponse positive de ces molécules et de déterminer leur concentration, des injections supplémentaires, impliquant pour certaines molécules des dilutions de l'échantillon, ont été nécessaires.

II.1.1. Concentration et confirmation des 12 substances actives détectées

Pour chacune des substances actives, les résultats sont présentés au travers d'un tableau type, organisé selon le Tableau 63 :

Chromatogramme de l'échantillon	**Chromatogramme de l'ajout dosé**	**Concentration en pesticide**
		[pesticide] = *x* $\mu g.L^{-1}$
Spectre EPI de l'échantillon	**Spectre EPI de référence (solvant)**	**Confirmation EPI**
		Fit/RevFit/Purity

Tableau 63. Tableau type de présentation des résultats pour les molécules dont la présence est suspectée dans l'échantillon

Le Tableau 64 présente les résultats de l'azoxystrobine.

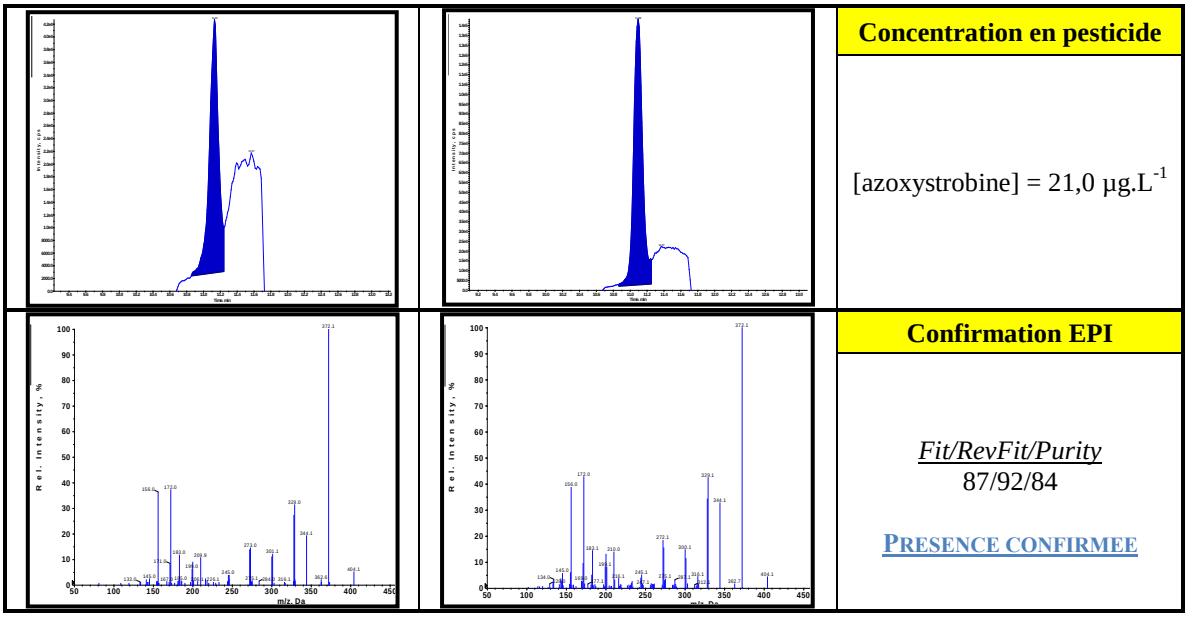


Tableau 64. Chromatogrammes et spectres EPI de l'azoxystrobine dans l'huile essentielle de marjolaine

La concentration en azoxystrobine a été déterminée à partir des aires des pics chromatographiques de l'échantillon et de l'ajout dosé. La teneur de 21,0 µg.L^{-1} est confirmée par le spectre EPI de l'azoxystrobine dans l'échantillon.

Le Tableau 65 présente les résultats concernant le chlorpyrifos.

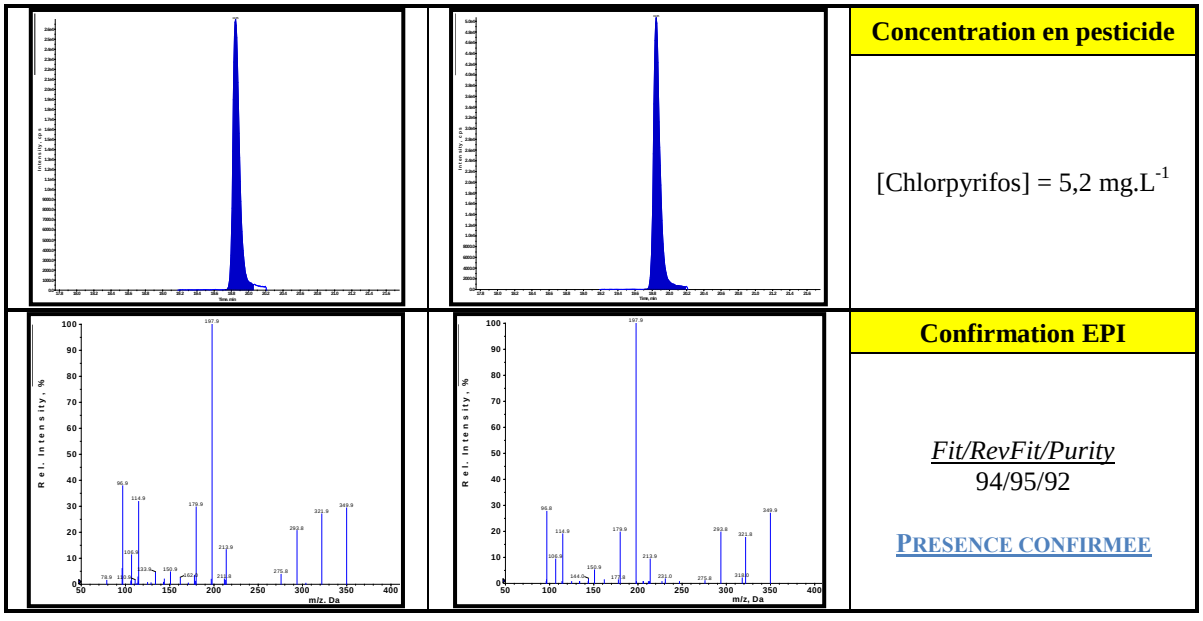


Tableau 65. Chromatogrammes et spectres EPI du chlorpyrifos dans l'huile essentielle de marjolaine

Du fait de la teneur très élevée en chlorpyrifos, sa concentration a été déterminée à partir d'une dilution au 1/100^{e} de l'extrait issu de l'évaporation sous azote et d'un ajout dosé à 50

µg.L^{-1} réalisé sur l'extrait dilué. La teneur de 5,2 mg.L^{-1} est confirmée par le spectre EPI du chlorpyrifos dans l'échantillon.

Le Tableau 66 présente les résultats concernant le diazinon.

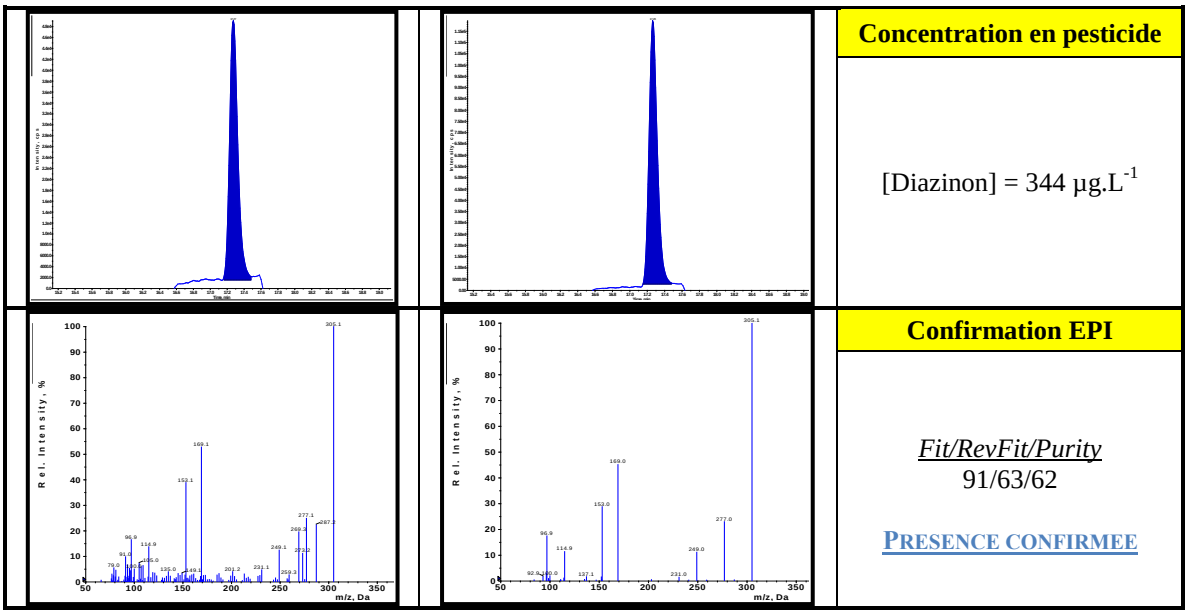


Tableau 66. Chromatogrammes et spectres EPI du diazinon dans l'huile essentielle de marjolaine

La concentration en diazinon a été déterminée à partir des aires des pics chromatographiques de l'échantillon et de l'ajout dosé. La teneur de 344 µg.L^{-1} est confirmée par le spectre EPI du diazinon dans l'échantillon.

Le Tableau 67 présente les résultats concernant le disulfoton.

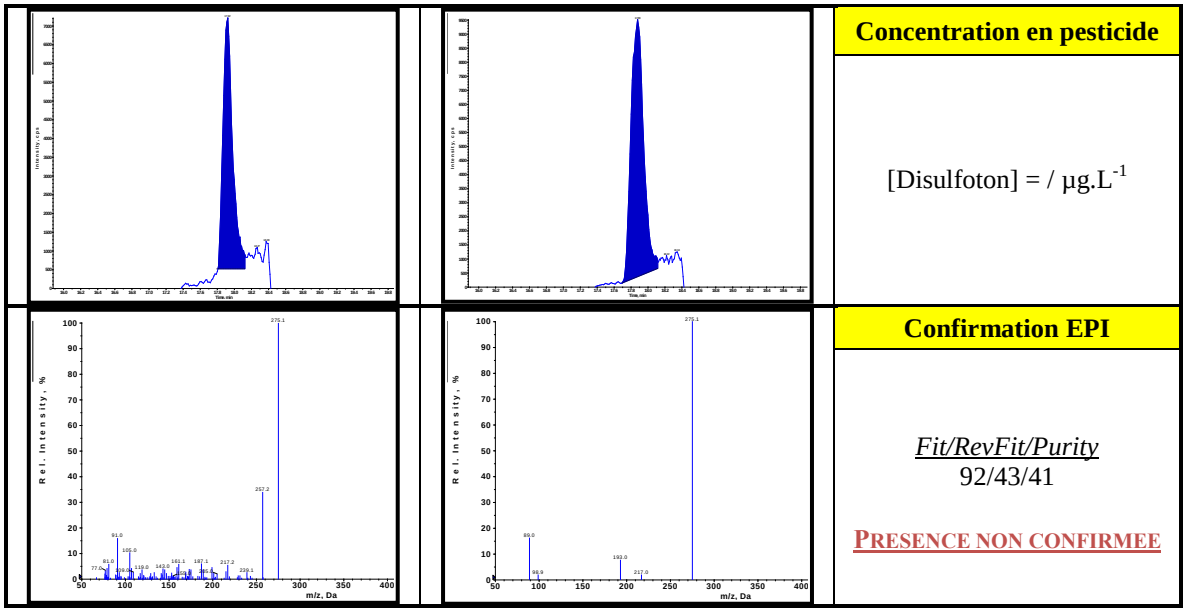


Tableau 67. Chromatogrammes et spectres EPI de disulfoton dans l'huile essentielle de marjolaine

La présence de la substance active disulfoton dans l'huile essentielle de marjolaine n'est pas confirmée. Le bon *Fit* est dû à la prédominance de l'ion précurseur *m/z* 373,0 dans les deux spectres. En revanche, les ions produits sont très différents et ne permettent pas de confirmer la présence de cette molécule dans l'échantillon. Il s'agit très probablement d'un interférent. L'œil de l'utilisateur est donc un critère non négligeable.

Le Tableau 68 présente les résultats concernant l'éthion.

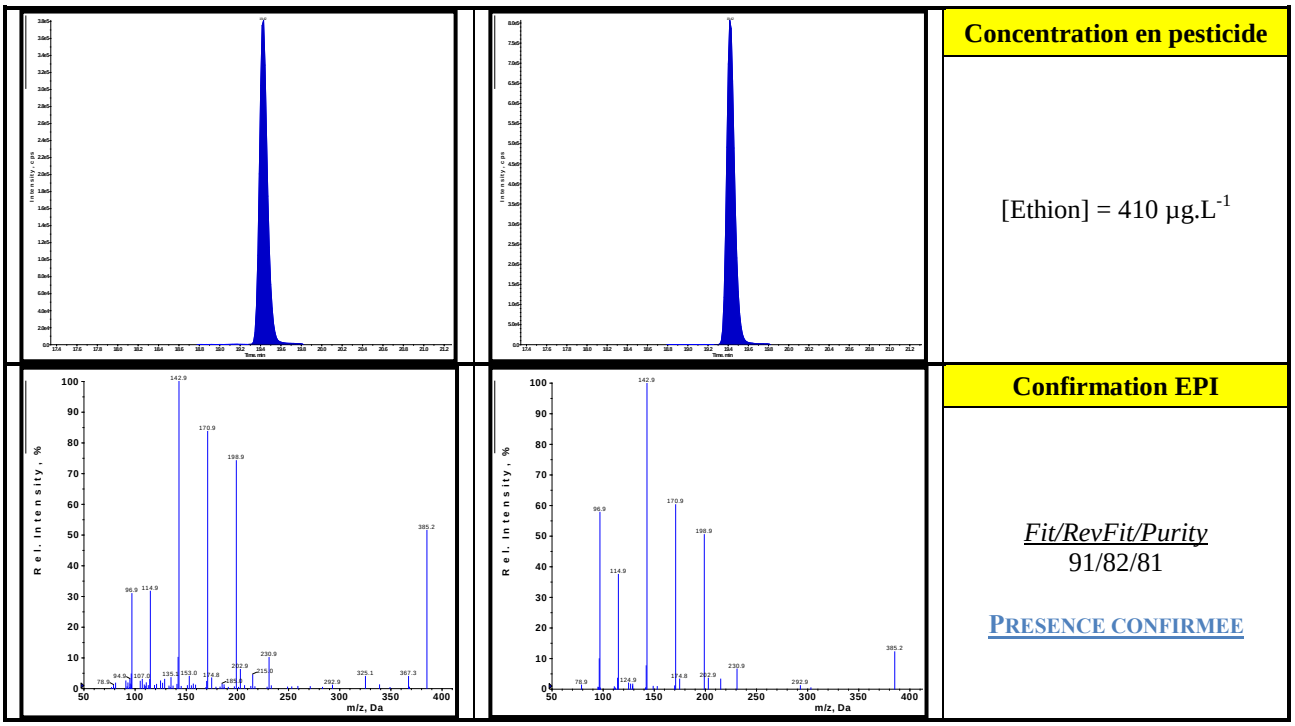


Tableau 68. Chromatogrammes et spectres EPI de l'éthion dans l'huile essentielle de marjolaine

Du fait de la teneur élevée en éthion, sa concentration a été déterminée à partir d'une dilution au 1/10^{e} de l'extrait issu de l'évaporation sous azote, et d'un ajout dosé à 50 µg.L^{-1} réalisé sur l'extrait dilué. La teneur de 410 µg.L^{-1} est confirmée par le spectre EPI de l'éthion dans l'échantillon.

Le Tableau 69 présente les résultats concernant l'hexazinone dont la présence, à l'image du disulfoton, n'a pas été confirmée par le spectre EPI réalisé dans l'huile essentielle de marjolaine.

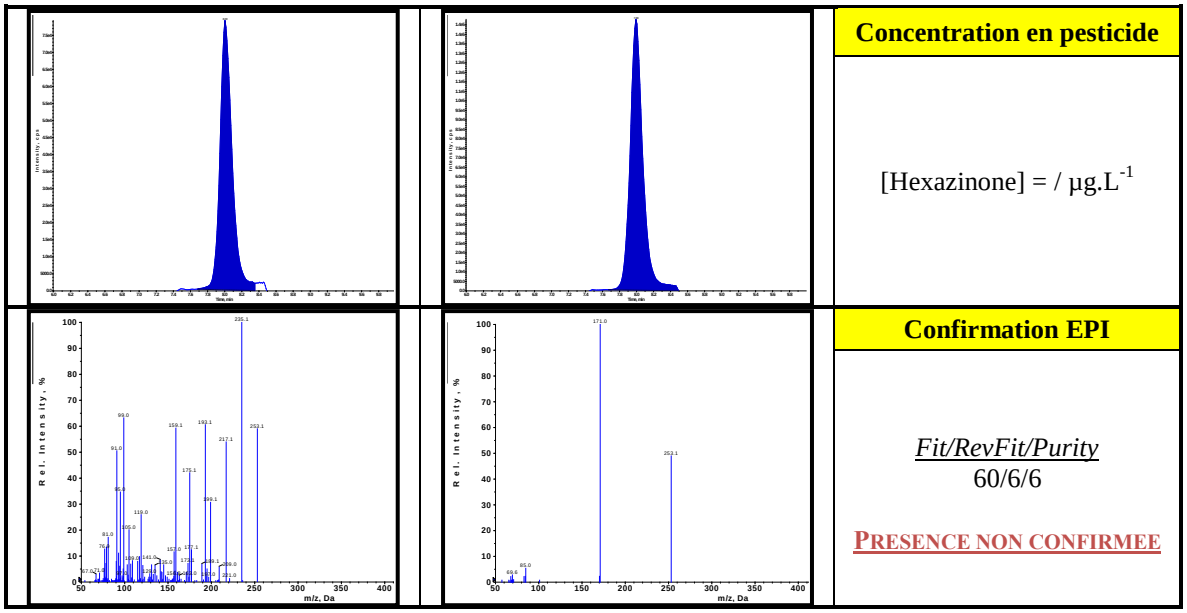


Tableau 69. Chromatogrammes et spectres EPI de l'hexazinone dans l'huile essentielle de marjolaine

Le spectre EPI de la matrice (Tableau 69 à droite) est complètement différent de celui de référence (Tableau 69 à gauche). La présence de l'hexazinone dans l'huile essentielle de marjolaine n'est donc pas confirmée.

Le Tableau 70 présente les résultats concernant le malathion.

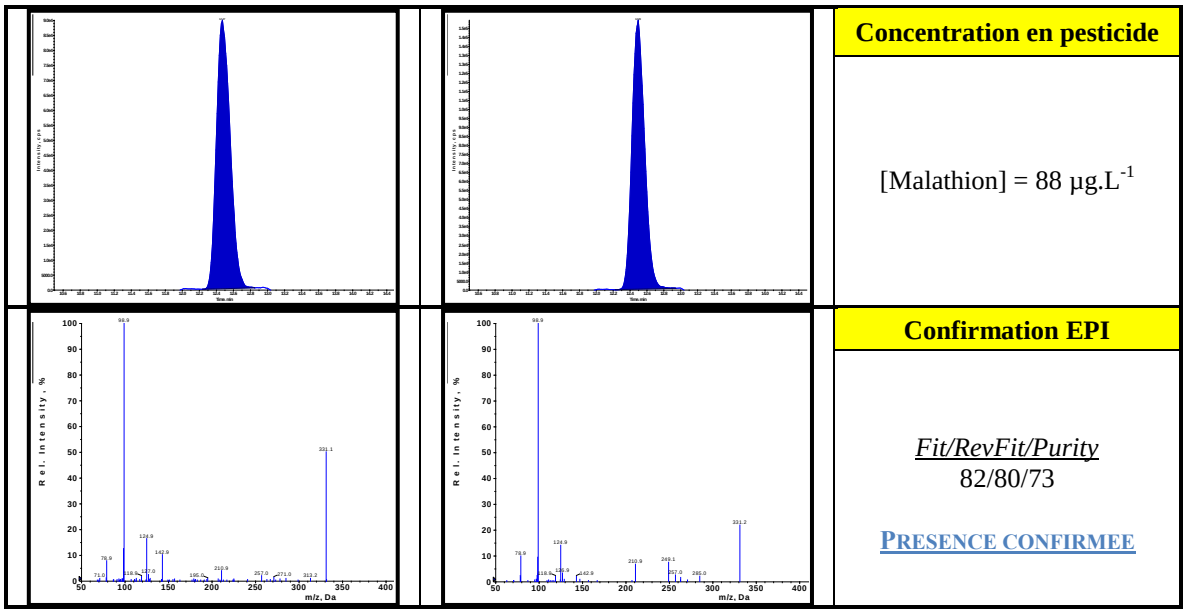


Tableau 70. Chromatogrammes et spectres EPI de malathion dans l'huile essentielle de marjolaine

La concentration en malathion a été déterminée à partir des aires des pics chromatographiques de l'échantillon et de l'ajout dosé. La teneur de 88 µg.L^{-1} est confirmée par le spectre EPI du diazinon dans l'échantillon.

Le Tableau 71 présente les résultats concernant le méfénoxam.

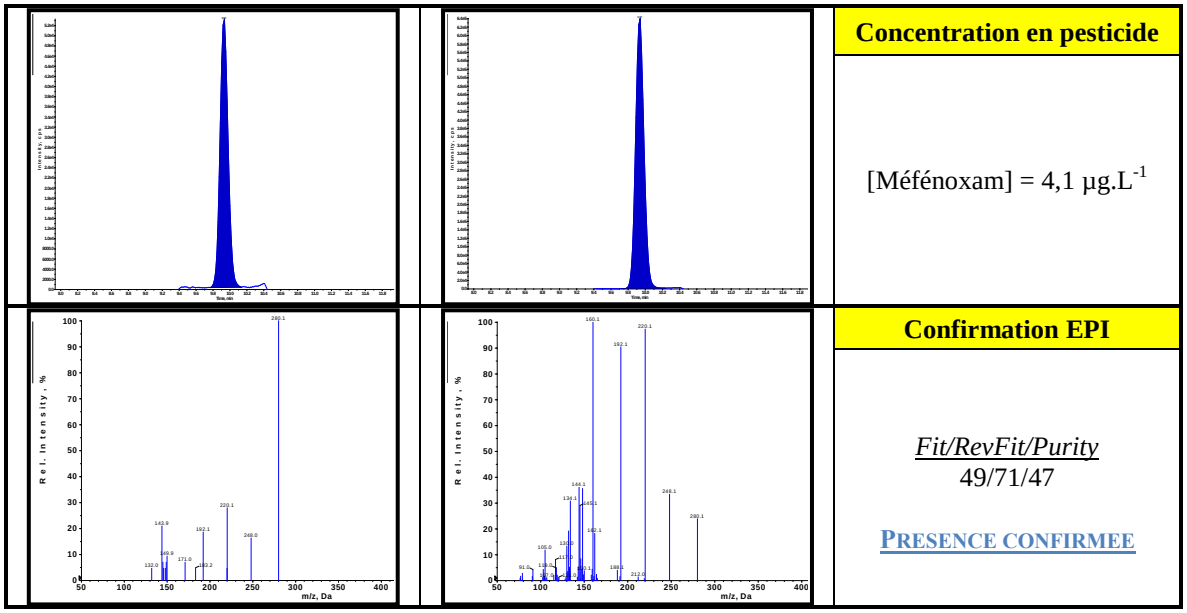


Tableau 71. Chromatogrammes et spectres EPI de méfénoxam dans l'huile essentielle de marjolaine

La concentration en méfénoxam a été déterminée à partir des aires des pics chromatographiques de l'échantillon et de l'ajout dosé. La faible valeur du *Fit* admis par le spectre EPI matrice comparé à celui de référence s'explique par la prédominance de l'ion précurseur *m/z* 280,1 dans le spectre matrice. Les principaux ions caractéristiques sont, cependant, présents dans des ratios similaires. Compte tenu de ces observations, la présence de la molécule de méfénoxam dans l'huile essentielle de marjolaine est confirmée.

Le Tableau 72 présente les résultats concernant le pipéronil butoxide.

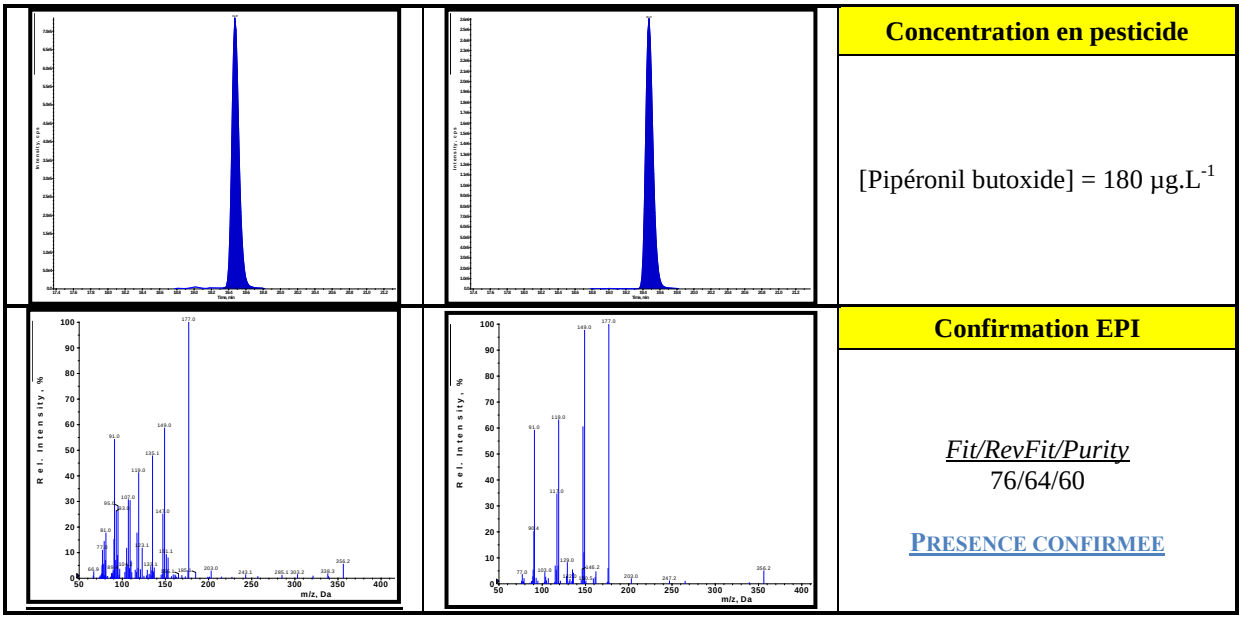


Tableau 72. Chromatogrammes et spectres EPI du pipéronil butoxide dans l'huile essentielle de marjolaine

La concentration en pipéronil butoxide a été déterminée à partir des aires des pics chromatographiques de l'échantillon et de l'ajout dosé. La teneur de 180 µg.L^{-1} est confirmée par le spectre EPI du pipéronil butoxide dans l'échantillon.

Le Tableau 73 présente les résultats concernant le pirimicarbe.

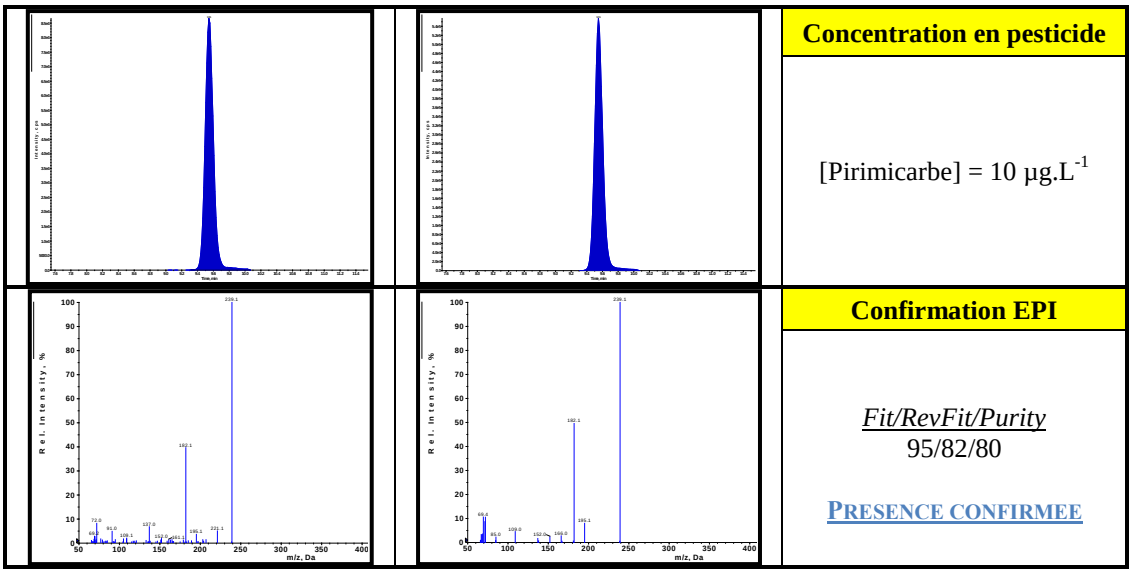


Tableau 73. Chromatogrammes et spectres EPI de pirimicarbe dans l'huile essentielle de marjolaine

La concentration en pirimicarbe a été déterminée à partir des aires des pics chromatographiques de l'échantillon et de l'ajout dosé. La teneur de 10 µg.L^{-1} est confirmée par le spectre EPI du pirimicarbe dans l'échantillon.

Le Tableau 74 présente les résultats concernant le profénofos.

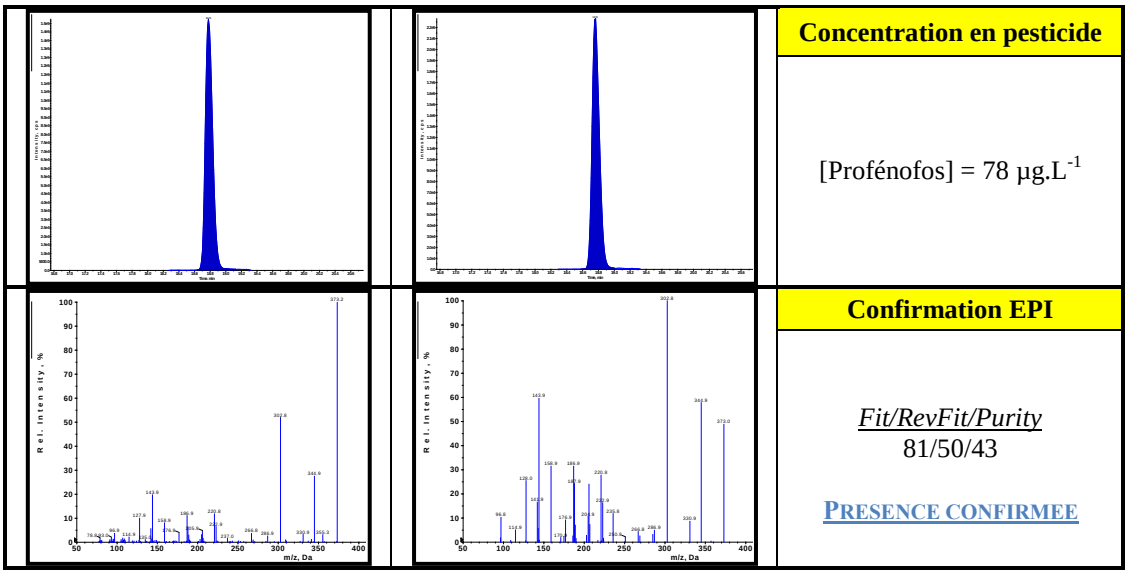


Tableau 74. Chromatogrammes et spectres EPI de profénofos dans l'huile essentielle de marjolaine

La concentration en profénofos a été déterminée à partir des aires des pics chromatographiques de l'échantillon et de l'ajout dosé. La teneur de 78 µg.L^{-1} est confirmée par le spectre EPI du profénofos dans l'échantillon.

Le Tableau 75 présente les résultats concernant le sulfotep.

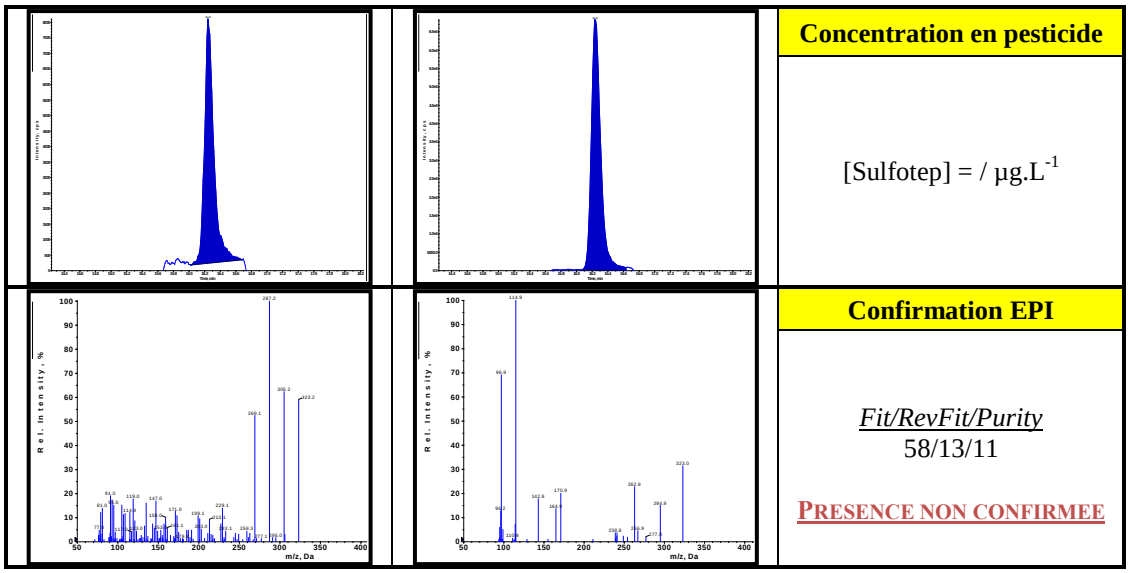


Tableau 75. Chromatogrammes et spectres EPI du sulfotep dans l'huile essentielle de marjolaine

La présence de la substance active sulfotep dans l'huile essentielle de marjolaine n'est pas confirmée. Le spectre EPI obtenu dans la matrice est clairement différent de celui de référence.

II.1.2. Conclusion

Le Tableau 76 présente une synthèse des teneurs en pesticides détectés dans l'huile essentielle de marjolaine ainsi que les résultats de la confirmation de ces molécules par SRM-EPI.

Substance active	Concentration (µg.L^{-1})	Confirmation EPI (*Fit/RevFit/Purity*)
Azoxystrobine	21	Confirmé (87/92/84)
Chlorpyrifos	5200	Confirmé (94/92/92)
Diazinon	344	Confirmé (91/63/62)
Disulfoton	/	Non confirmé (92/43/11)
Ethion	410	Confirmé (91/82/81)
Hexazinone	/	Non confirmé (60/6/6)
Malathion	88	Confirmé (82/80/73)
Méfénoxam	4,1	Confirmé (49/71/47)
Pipéronil butoxide	180	Confirmé (76/64/60)
Pirimicarbe	10	Confirmé (95/82/80)
Profenofos	78	Confirmé (81/50/43)
Sulfotep	/	Non confirmé (58/13/11)

Tableau 76. Bilan des teneurs en pesticides détectées dans l'huile essentielle de marjolaine

Sur les 12 substances actives détectées lors de la première analyse LC-ESI/sSRM, 9 d'entre elles ont pu être confirmées par la méthode LC-ESI/SRM-EPI. Les concentrations détectées varient de 4,1 µg.L^{-1} pour le méfénoxam à 5 200 µg.L^{-1} pour le chlorpyrifos. Les pourcentages de concordance admis par les spectres EPI réalisés dans l'échantillon sont satisfaisants. A l'exception du méfénoxam qui admet un *Fit* de 47 % pour des raisons expliquées précédemment, les *Fit* et *RevFit* sont strictement supérieurs à 75 % et 50 %, conduisant à des *Purity* généralement supérieures à 50 %.

Concernant les molécules de disulfoton, hexazinone et sulfotep, les spectres EPI obtenus dans l'huile essentielle de marjolaine ne correspondent pas avec ceux de références. Ils conduisent alors, à infirmer la présence de ces molécules dans l'échantillon. Les spectres EPI des substances actives hexazinone et sulfotep obtenus pour les ajouts dosés montrent bien un mélange entre les ions fragments issus de(s) l'interférent(s) et ceux issus de la molécule recherchée (Tableau 77).

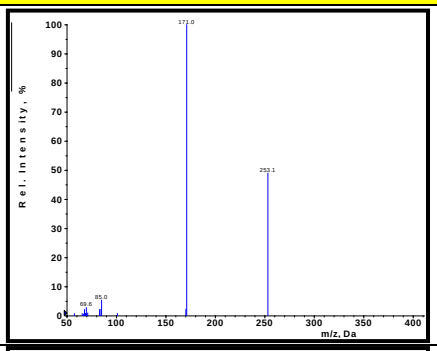
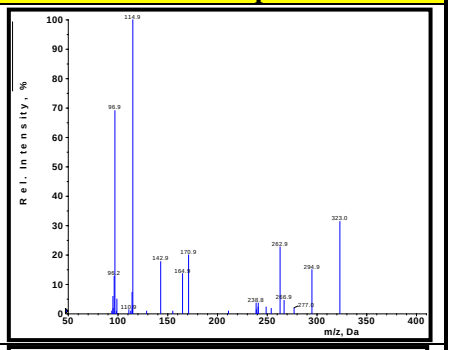
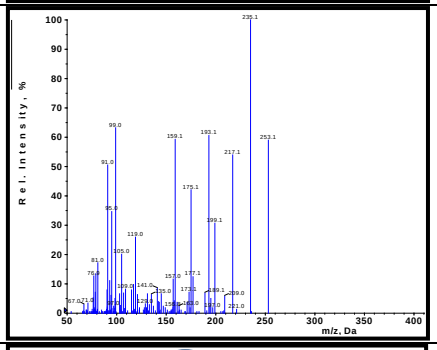
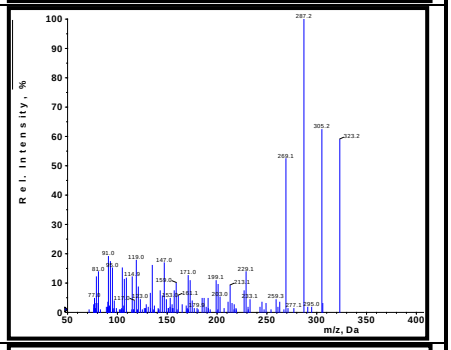
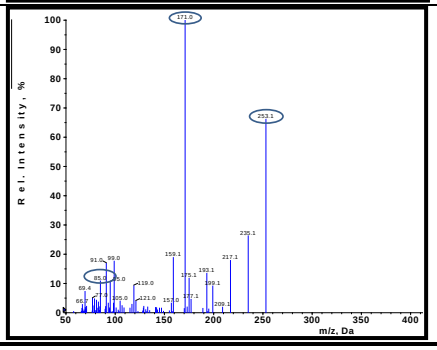
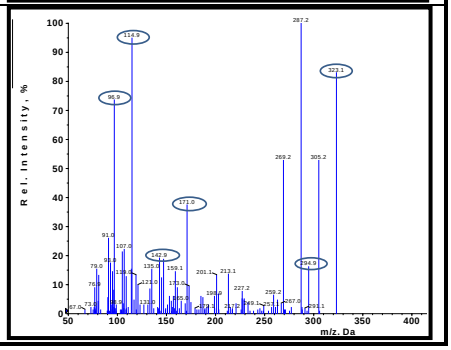
	Hexazinone	**Sulfotep**
Référence		
Echantillon		
Ajout dosé		

Tableau 77. Spectres EPI des substances actives hexazinone et sulfotep obtenus dans le solvant (référence), l'échantillon d'huile essentielle de marjolaine et l'ajout dosé

Les ions entourés en bleu sur les spectres EPI du Tableau 77 correspondent aux ions fragments issus de la substance active, les autres ions provenant de la matrice. Les spectres EPI de l'ajout dosé mettent bien en évidence que, malgré la présence d'interférents, les ions fragments issus de la substance active se distinguent de ceux de la matrice. Donc, même si les spectres contiennent du bruit de fond, il est néanmoins possible de confirmer la présence de ces molécules. En revanche, le seuil de concentration à partir duquel il est possible de confirmer le résultat positif est certainement plus élevé qu'en l'absence de bruit de fond.

II.2 Analyse de deux huiles essentielles de citron

Deux huiles essentielles de citron, la première d'origine « bio » et provenant d'Italie et la seconde « non bio » originaire d'Espagne, ont été analysées selon le protocole décrit précédemment. Le point éclair de l'huile essentielle de citron se situant autour des 46 °C, c'est la méthode d'évaporation sous azote qui a été employée. Les injections des extraits d'huiles essentielles de citron ont été suivies des injections d'ajouts dosés à 50 $\mu g.L^{-1}$, préparés à partir de ces mêmes extraits.

II.2.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle de citron « bio »

Lors de l'analyse LC-ESI/sSRM de l'huile essentielle de citron, une vingtaine de transitions ont répondu positivement. Les concentrations correspondantes en pesticides ont été estimées à partir de l'ajout dosé et sont présentées dans le Tableau 78.

Substance active	Concentration estimée ($\mu g.L^{-1}$)	Substance active	Concentration estimée ($\mu g.L^{-1}$)
Azaconazole	110	Hexythiazox	0,7
Buprofézine	0,7	Linuron	3
Carbaryl	0,3	Malathion	3
Chlorpyrifos	11	Méfénoxam	4,0
Cyproconazole	130	Méthamidophos	1,8
Diméthomorphe	0,8	Méthidathion	3
Diuron	0,5	Oxamyl	0,9
Ethoprofos	1,9	Propyzamide	5,6
Fénamiphos	1,2	Roténone	3,3
Fénarimol	2	Tétraconazole	0,5

Tableau 78. Concentrations en pesticides estimées à partir de l'ajout dosé lors de l'analyse LC-ESI/sSRM

Sur les vingts pesticides du Tableau 78, seuls deux d'entre eux ont été confirmés lors de l'analyse LC-ESI/SRM-EPI, il s'agit du diuron et du méfénoxam. En plus des spectres EPI du diuron et du méfénoxam, le Tableau 79 présente également, à titre d'exemples, les spectres

EPI de l'azaconazole et de la buprofézine qui ont permis d'infirmer la présence de ces composés dans l'huile essentielle de citron.

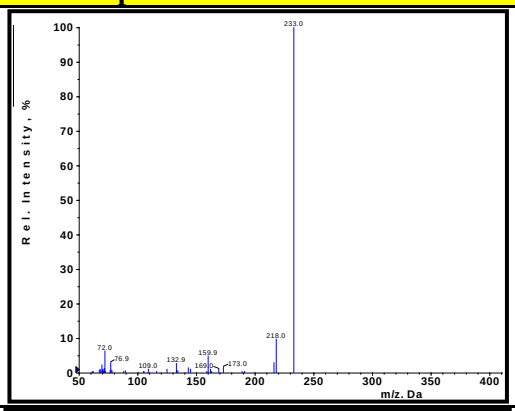
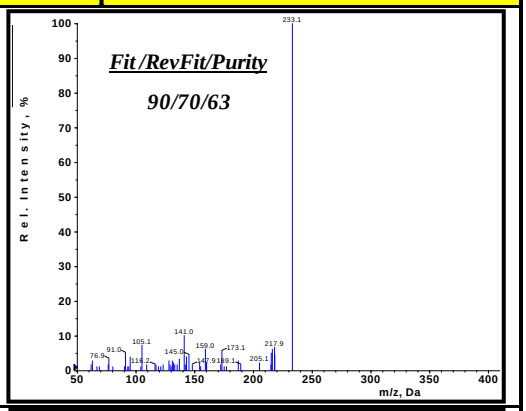
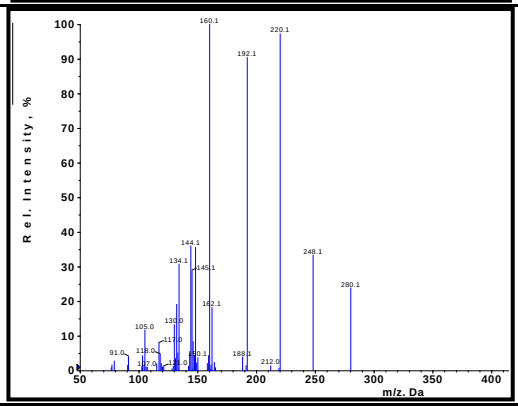
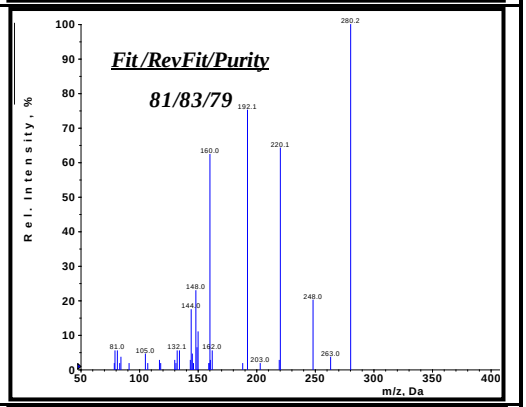
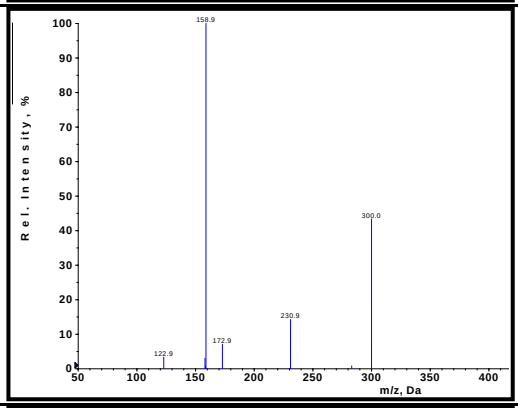
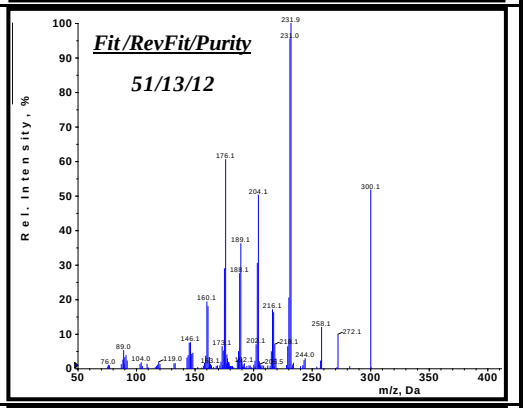
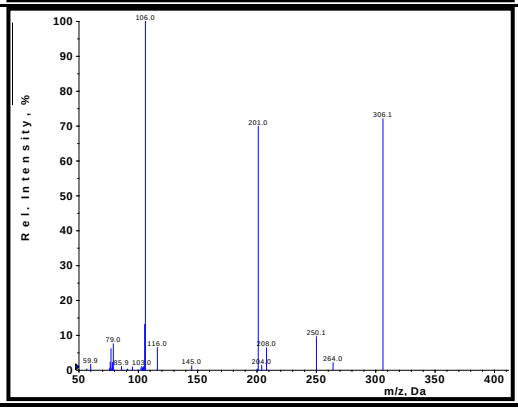
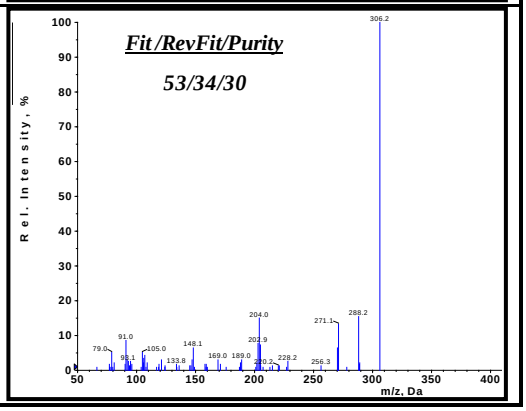
	Spectre EPI de référence	**Spectre EPI de l'échantillon**
Diuron		
Méfénoxam		
Azaconazole		
Buprofézine		

Tableau 79. Comparaison des spectres EPI issus de l'échantillon avec ceux de référence pour quatre substances actives

Compte tenu des spectres de masse présentés dans le Tableau 79, un léger doute peut être émis concernant la confirmation du diuron. En effet, les pourcentages de concordance, bien que très satisfaisants, sont essentiellement dus à la prépondérance de l'ion précurseur *m/z* 233,1. Cependant, en plus de l'ion précurseur, trois ions communs sont présents dans des proportions relativement similaires : *m/z* 218, 173, 76,9.

L'analyse de cet échantillon met une fois de plus en évidence que malgré la très grande spécificité du mode SRM, il n'est pas rare de détecter des interférents. Ces derniers pourraient être reportés en tant que positif à des concentrations relativement importantes pour certaines substances actives (exemple : [Azaconazole] ≈ 110 $\mu g.L^{-1}$).

II.2.2. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle de citron « non bio »

Lors de l'analyse LC-ESI/sSRM de l'huile essentielle de citron « non bio », trente-deux transitions ont répondu positivement. Les trente-deux substances actives correspondantes ont été réparties en deux tableaux suivant les résultats de l'analyse de confirmation LC-ESI/SRM-EPI. Le Tableau 80 et le Tableau 82 présentent respectivement les pesticides dont la présence a été infirmée et confirmée. Dans chacun des tableaux sont présentées les concentrations estimées à partir de l'ajout dosé (et éventuellement des dilutions supplémentaires), ainsi que les pourcentages de concordance entre les spectres EPI de l'échantillon et ceux de référence, de même que la conclusion sur la positivité de la substance active.

Pesticide	Concentration estimée	*Fit/RevFit/Purity*	Confirmation
Azaconazole	137	50/14/13	Non
Bénalaxyl	1,57	15/18/11	Non
Carbaryl	1,2	39/34/27	Non
Diazinon	7,34	53/49/47	Non
Diflufénican	2,1	48/56/43	Non
Fénamiphos	2	38/14/9	Non
Fénarimol	0,7	15/16/7	Non
Méthamidophos	4,2	18/7/2	Non
Oxamyl	4,3	43/25/14	Non
propargite	34	58/25/24	Non
Sulfotep	7	60/4/3	Non
Trifloxystrobine	0,2	22/44/18	Non

Tableau 80. Concentrations ($\mu g.L^{-1}$) en pesticides estimées à partir de l'ajout dosé ou de dilutions lors de l'analyse LC-ESI/sSRM et infirmées par l'analyse LC-ESI/SRM-EPI

L'analyse LC-ESI/SRM-EPI a permis d'infirmer la présence des douze substances actives citées dans le Tableau 80. Pour certaines d'entre elles comme le diazinon ou le diflufenican, les scores de corrélation obtenus entre les spectres de l'échantillon et ceux de référence pourraient laisser supposer une contamination de l'huile essentielle par ces substances actives.

Cependant, l'interprétation de ces spectres par l'utilisateur ne laisse aucun doute (Tableau 81). Aucune concordance n'est en effet soulignée avec les spectres de référence.

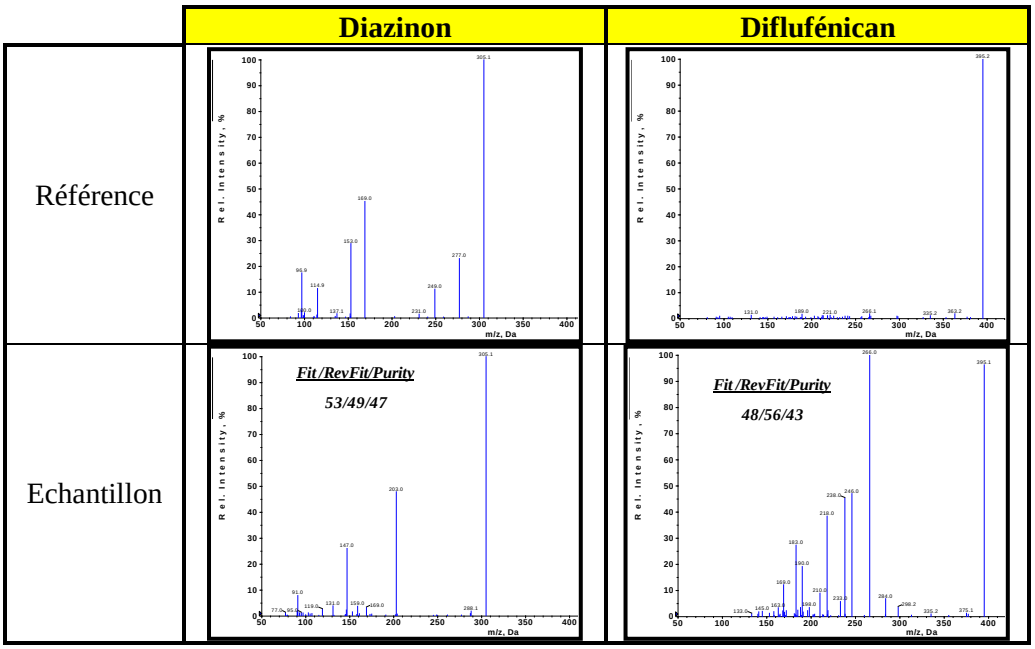


Tableau 81. Spectres EPI de référence et de l'échantillon des substances actives diazinon et dilfufenican

De plus, parmi ces douze substances actives infirmées, il faut noter une fois de plus que, dans le cas de la présence suspectée de l'azaconazole, le signal détecté correspondrait à une concentration du même ordre que dans l'huile essentielle de citron biologique. Les spectres EPI de l'azaconazole obtenus respectivement dans le solvant (référence), l'huile essentielle biologique et non biologique sont présentés dans la Figure 104.

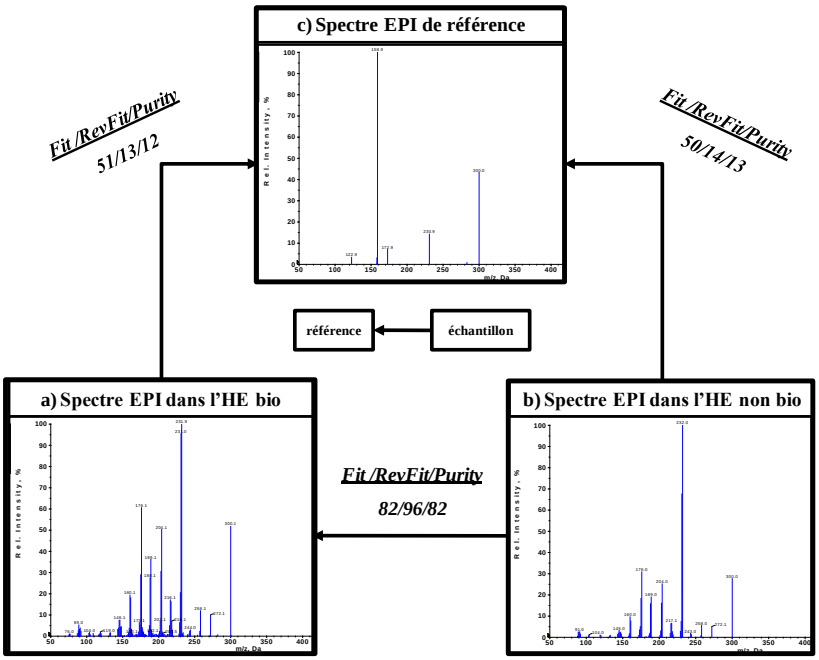


Figure 104. Spectres EPI de l'interférent détecté dans a) HE bio b) HE non bio et comparés c) au spectre de référence de l'azaconazole

Compte tenu des scores de corrélation obtenus entre les différents spectres de la Figure 104 et, notamment de celui obtenu entre les spectres EPI des deux huiles essentielles de citron, il semblerait que ce soit le même interférent qui engendre une réponse lors de l'analyse LC-ESI/sSRM des deux échantillons d'huile essentielles de citron.

Si la détection d'une douzaine de pesticides n'a pas été confirmée par l'analyse LC-ESI/SRM-EPI, la présence de dix-huit substances actives a pu être confirmée par cette méthode (Tableau 82). Les molécules d'endosulfan sulfate et d'hexaflumuron n'ont pas fait l'objet d'analyse SRM-EPI car ces substances actives sont analysées en ESI- avec deux transitions SRM, leur deuxième transition a confirmé leur présence dans l'échantillon.

Pesticide	Concentration estimée	*Fit/RevFit/Purity*	Confirmation
Azoxystrobine	25,4	94/96/93	Oui
Buprofezine	1300,0	96/93/93	Oui
Carbendazime	Non déterminée	96/93/91	Oui
Chlorpyrifos	8200,0	90/91/87	Oui
Etoxazole	60,0	83/83/74	Oui
Fénazaquin	56,6	97/67/67	Oui
Fenpyroxymate	98,0	93/69/67	Oui
Hexythiazox	490	89/56/54	Oui
Linuron	3	81/67/63	Oui
Méfénoxam	13,4	89/90/86	Oui
Méthidathion	144	80/70/60	Oui
Myclobutanil	792	91/87/86	Oui
Pirimiphos methyl	127	96/93/92	Oui
Prochloraz	11000	80/66/65	Oui
Pyriméthanil	60,4	96/95/93	Oui
Pyriproxyfen	2300	80/67/66	Oui
Terbutylazine	256	98/97/96	Oui
Thiabendazole	28	96/85/84	Oui
Endosulfan sulfate	7	Non analysé	Oui (2 transitions)
Hexaflumuron	3,7	Non analysé	Oui (2 transitions)

Tableau 82. Concentrations (µg.L^{-1}) en pesticides estimées à partir de l'ajout dosé ou de dilutions lors de l'analyse LC-ESI/sSRM et confirmées par l'analyse LC-ESI/SRM-EPI

Les substances actives du Tableau 82 admettent respectivement des *Purity* strictement supérieures à 50 % et des *Fit* supérieurs à 80 %, scores se révélant très satisfaisants. Les teneurs calculées varient de 3 µg.L^{-1} pour le linuron à 11 000 µg.L^{-1} pour le prochloraz. La carbendazime a été détectée et confirmée, mais non quantifié, car cette molécule n'était pas présente dans le mélange de surcharge.

Il faut noter dans cet échantillon la présence de quatre substances actives à des teneurs relativement élévées, supérieures au mg.L^{-1}. Il s'agit de la buprofézine (1,3 mg.L^{-1}), du

chlorpyrifos (8,2 mg.L^{-1}), du prochloraz (11 mg.L^{-1}) et du pyriproxyfen (2,3 mg.L^{-1}) dont les spectres EPI sont exposés dans le Tableau 83.

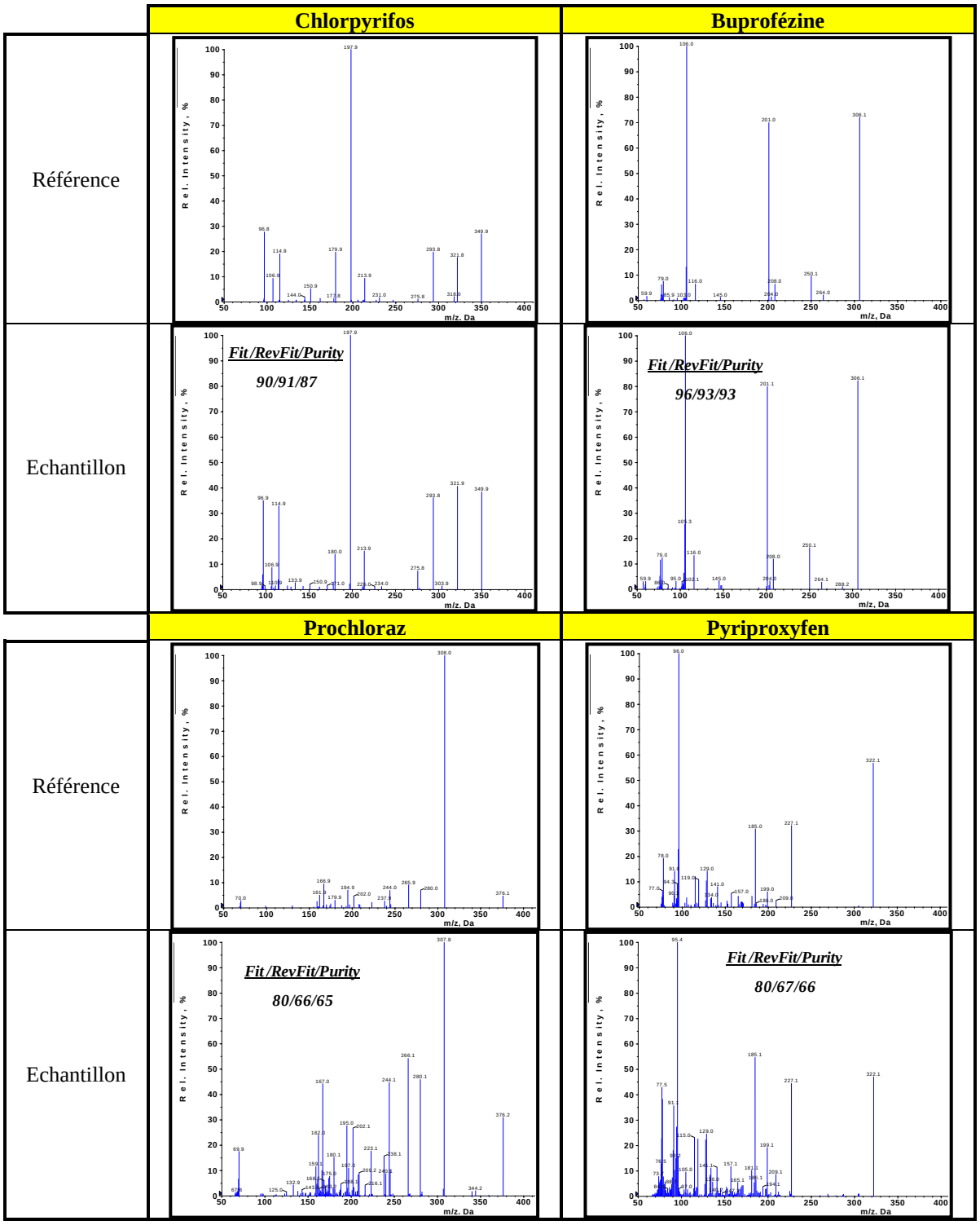


Tableau 83. Spectres EPI de référence et issus de l'échantillon pour les quatre substances actives détectées à des teneurs supérieures au mg.L^{-1}

Les spectres EPI du Tableau 83 mettent en évidence une très bonne corrélation entre les spectres issus de l'échantillon d'huile essentielle et les spectres de référence et, ce malgré des concentrations en pesticides élevées.

II.3 Analyse de deux huiles essentielles d'orange douce

Deux huiles essentielles d'orange douce, la première d'origine « bio » et provenant du Costa Rica et la seconde « non bio » originaire d'Espagne, ont été analysées selon le protocole décrit précédemment. Le point éclair de l'huile essentielle d'orange se situant autour des 43°C,[266] c'est la méthode d'évaporation sous azote qui a été employée. Les injections des extraits d'huiles essentielles d'orange ont été suivies des injections d'ajouts dosés à 50 µg.L^{-1}, préparés à partir de ces mêmes extraits.

II.3.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle d'orange bio

Lors de l'analyse LC-ESI/sSRM de l'huile essentielle d'orange, seule la transition du fenthion a répondu positivement et a conduit à supposer une concentration de 41 µg.L^{-1}. La présence du fenthion a été confirmée en LC-ESI/SRM-EPI comme le montrent les spectres EPI du Tableau 84.

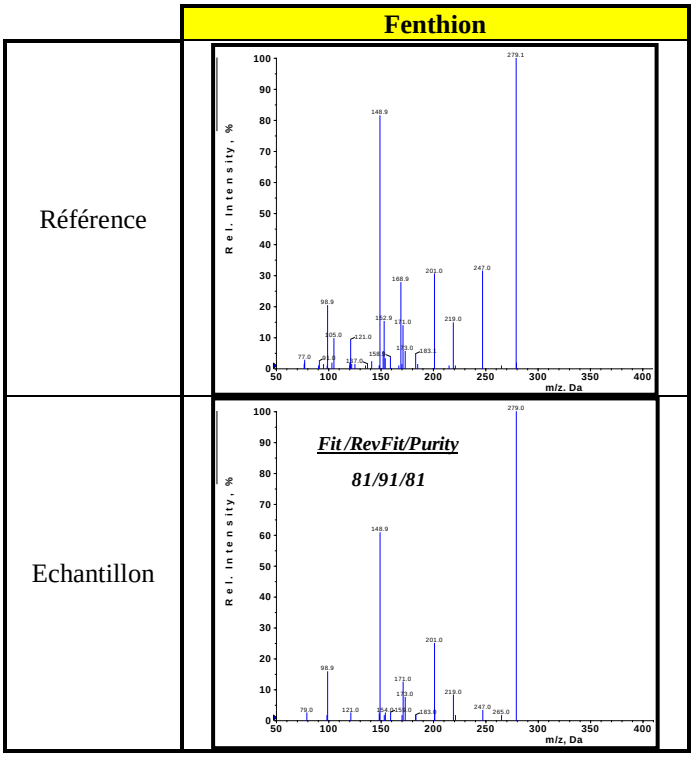


Tableau 84. Spectres EPI de référence et issu de l'huile essentielle d'orange pour la substance active fenthion

Les scores de corrélations entre le spectre EPI de référence et celui de l'échantillon sont très satisfaisants. Aux regards des deux spectres, il est aisé de voir que l'ensemble des ions fragments caractéristiques du fenthion sont présents dans le spectre de l'échantillon, dans des ratios similaires au spectre de référence.

II.3.2. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle d'orange non biologique

Lors de l'analyse LC-ESI/sSRM de l'huile essentielle d'orange, trente-neuf transitions ont répondu positivement. L'ensemble de ces substances actives, à l'exception du chlorfluazuron, diflubenzuron et endosulfan sulfate analysées en ESI- avec deux transitions, ont fait l'objet d'une confirmation en LC-ESI/SRM-EPI dont les résultats sont présentés dans le Tableau 85.

Pesticide	Concentration estimée	Fit/RevFit/Purity	Confirmation
Bifenthrine	14,9	21/11/11	Non
Carbosulfan	0,8	35/33/25	Non
Deltaméthrine	20,0	64/62/45	Non
Diméthoate	2,5	51/29/15	Non
Diuron	5,4	60/23/20	Non
Ethion	2,2	27/22/20	Non
Etoxazole	2,4	59/29/26	Non
Famoxadone	9,3	20/15/11	Non
Hexazinone	20,1	38/41/16	Non
Pipéronil butoxide	0,7	34/14/11	Non
Prochloraz	1,2	6/4/3	Non
Profénofos	1,3	18/19/5	Non
Pyridaben	3,2	24/18/17	Non
Tébuconazole	19,5	87/68/61	Non
Tétraconazole	2,3	37/50/18	Non
Amétryn	1,3	86/80/72	Oui
Atrazine	2,0	88/56/53	Oui
Azoxystrobine	22,2	97/82/80	Oui
Buprofézine	8,2	80/57/55	Oui
Carbaryl	6,7	67/50/45	Oui
Carbendazime	Non déterminée	93/84/81	Oui
Carbofuran	14,8	83/95/81	Oui
Chlorpyrifos	320,0	74/70/55	Oui
Clomazone	4,3	61/81/50	Oui
Diazinon	10,3	87/73/70	Oui
Difénoconazole	15,1	86/72/71	Oui
Etofenprox	76,3	83/79/78	Oui
Fenthion sulfoxide	1,9	76/83/67	Oui
Flufenoxuron	16,8	88/68/66	Oui
Malathion	49,1	80/86/77	Oui
Méthidathion	1950,1	80/76/70	Oui
Propargite	883,3	94/92/90	Oui
Pyraclostrobine	186,4	96/92/92	Oui
Pyridafenthion	6,8	85/73/70	Oui
Pyriproxyfen	9,8	81/48/46	Oui
Trifloxystrobine	28,7	90/87/83	Oui
Chlorfluazuron	0,5	Non analysé	Oui (2 transitions)
Diflubenzuron	8,8	Non analysé	Oui (2 transitions)
Endosulfan sulfate	22,9	Non analysé	Oui (2 transitions)

Tableau 85. Bilan des substances actives détectées dans l'huile essentielle d'orange avec leur concentration estimée et les résultats de l'analyse de confirmation LC-ESI/SRM-EPI

L'analyse de confirmation par LC-ESI/SRM-EPI a permis d'infirmer la présence de 15 substances actives. Bien que les scores concernant la deltaméthrine et le tébuconazole soient relativement corrects, l'interprétation des spectres EPI conclut à la présence d'interférents et non des substances actives (Tableau 86).

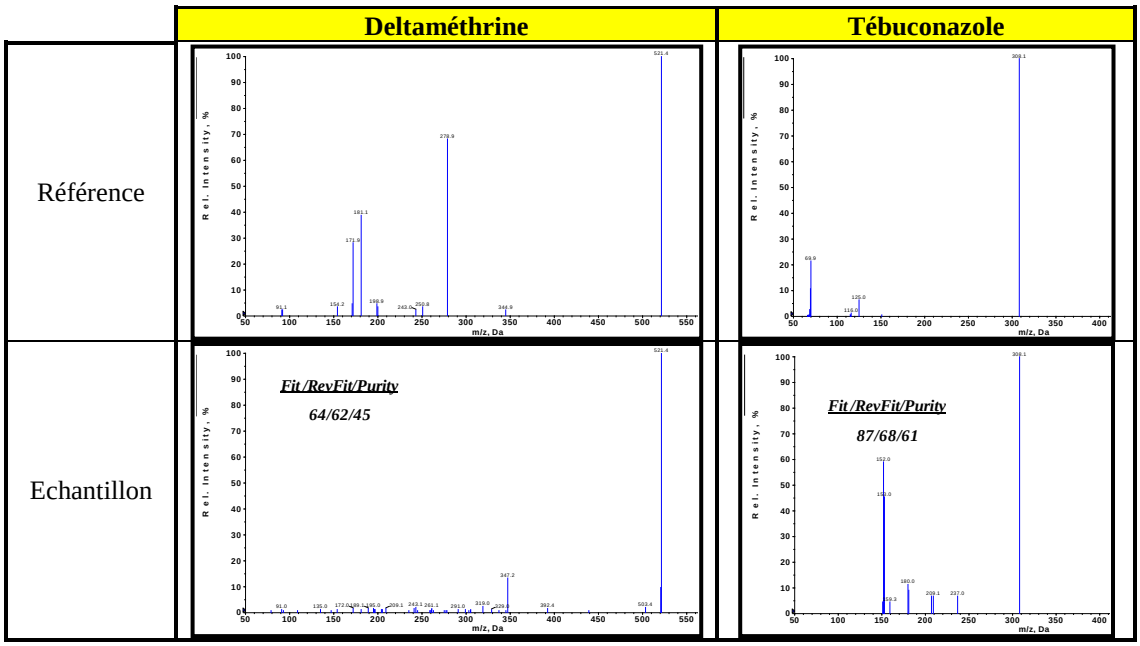


Tableau 86. Spectres EPI de référence et issu de l'échantillon d'huile essentielle d'orange des substances actives deltaméthrine et tébuconazole

Malgré l'infirmation d'une quinzaine de pesticides, il s'avère que l'échantillon d'huile essentielle d'orange non biologique est contaminé par vingt-quatre substances actives dont vingt-et-une ont été confirmées par SRM-EPI et trois par une deuxième transitions lors de l'analyse LC-ESI/sSRM en mode ESI-. Les concentrations en pesticides varient de 0,5 µg.L^{-1} (chlorfluazuron) à 1950,1 µg.L^{-1} (méthidathion). Une fois de plus, des teneurs relativement élevées de plusieurs centaines de µg.L^{-1} sont détectées : chlorpyrifos (320,0 µg.L^{-1}), méthidation (1 950,1 µg.L^{-1}), propargite (883 µg.L^{-1}), pyraclostrobine (186 µg.L^{-1}).

III. Conclusion

L'analyse de cinq échantillons d'huiles essentielles a permis d'éprouver la capacité de la méthode d'analyse multi-résidus LC-ESI-MS/MS à détecter, quantifier mais également à confirmer la présence ou non de 250 résidus de pesticides dans les huiles essentielles. Le Tableau 87 présente la synthèse des teneurs en substances actives détectées et confirmées lors de l'analyse des cinq échantillons d'huiles essentielles.

Pesticide	Marjolaine	Citron bio	Citron non bio	Orange bio	Orange non bio
Ametryn					1,3
Atrazine					2,0
Azoxystrobine	21,0		25,4		22,2
Buprofézine			1 300		8,2
Carbaryl					6,7
Carbendazime			Non déterminée		Non déterminée
Carbofuran					14,8
Chlorfluazuron					0,5
Chlorpyrifos	5 200		8 200		320,0
Clomazone					4,3
Diazinon	344				10,3
Difénoconazole					15,1
Diflubenzuron					8,8
Diuron		0,5			
Endosulfan sulfate			7		22,9
Ethion	410				
Etofenprox					76,3
Etoxazole			60,0		
Fenazaquin			56,6		
Fenpyroxymate			98,0		
Fenthion				41,0	
Fenthion sulfoxide					1,9
Flufenoxuron					16,8
Hexaflumuron			3,7		
Hexythiazox			490,2		
Linuron			3,1		
Malathion	88				49,1
Méfénoxame	4,1	4,0	13,4		
Méthidathion			144,0		1 950,1
Myclobutanyl			790,0		
Pipéronil butoxide	180				
Pirimicarbe	10				
Pirimiphos methyl			127		
Prochloraz			11 000		
Profenofos	78				
Propargite					883,3
Pyraclostrobine					186,4
Pyridafenthion					6,8
Pyriméthanil			60,4		
Pyriproxyfen			2 300		9,8
Therbutylazine			256		
Thiabendazole			28		
Trifloxystrobine					28,7
Nombre de substances actives sur un total de 44	9	2	20	1	24

Tableau 87. Synthèse des teneurs en substances actives en µg.L^{-1} détectées dans les cinq échantillons d'huiles essentielles

L'analyse des cinq huiles essentielles a mis en évidence la présence 44 substances actives différentes : 9 substances actives ont été détectées dans l'huile essentielle de marjolaine « bio », 2 et 20 dans les huiles essentielles de citron « bio » et « non bio », 1 et 24 dans les

huiles essentielles d'orange « bio » et « non bio ». Même si le nombre d'échantillons réels analysés et présentés dans cette partie est relativement restreint, plusieurs conclusions peuvent cependant être proposées.

La première est que l'origine « bio » des huiles essentielles n'assure pas l'absence de résidus de pesticides même si, dans le cas des hespéridés, le nombre et la concentration des substances actives sont bien moins élevés dans les huiles essentielles « bio ».

Deuxièment, les concentrations en pesticides détectés peuvent être considérables en atteignant plusieurs $mg.L^{-1}$ d'huile essentielle. Ainsi, l'huile essentielle de marjolaine admet 5,20 $mg.L^{-1}$ de chlorpyrifos, l'huile essentielle d'orange non bio admet 1,95 $mg.L^{-1}$ de méthidathion et l'huile essentielle de citron non bio admet 1,3 $mg.L^{-1}$ de buprofézine, 2,3 $mg.L^{-1}$ de pyriproxyfen, 8,2 $mg.L^{-1}$ de chlorpyrifos et 11 $mg.L^{-1}$ de prochloraz. Par ailleurs, il faut noter que la substance active chlorpyrifos est détectée dans trois des cinq échantillons à des concentrations repectives de 5,2 $mg.L^{-1}$ (marjolaine), 8,2 $mg.L^{-1}$ (citron) et 0,32 $mg.L^{-1}$ (orange).

Le dernier point concerne le nombre important de substances actives détectées simultanément dans une huile essentielle et, notamment, dans celles des hespéridés « non bio » pour lesquelles ont été retrouvés 20 (citron) et 24 (orange) pesticides. Ce constat témoigne du nombre conséquent de traitements que subissent ces végétaux.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail a démontré les solutions analytiques apportées, à la fois par l'utilisation d'un système de type triple quadripôle équipé d'une cellule LINAC et par la mise en place du mode Scheduled SRM (sSRM), dans le contexte d'une analyse multi-résidus de 242 pesticides dans un échantillon constitué d'un solvant d'injection LC classique. L'étude bibliographique a conclu sur le lien entre huiles essentielles et produits phytosanitaires. Elle a aussi montré que peu de résultats étaient disponibles dans la littérature sur la recherche de pesticides dans les huiles essentielles. Ceci est dû au fait que ces matrices sont considérées comme difficiles à traiter dans le contexte d'analyse multi-résidus, à cause des processus d'extraction dont elles sont issues, et de leur caractère apolaire. D'ailleurs, pour appliquer la méthode d'analyse multi-résidus au cas concret de la détection de pesticides dans les huiles essentielles, plusieurs difficultés sont apparues. Il a d'abord été nécessaire d'adapter les conditions d'injections LC, puis l'influence de la nature de la matrice s'est révelée. En effet, si dans le cas de l'huile essentielle de lavandin, une simple dilution au 1/10^{e} dans du méthanol acidifié était suffisante, il a été nécessaire de développer une méthodologie plus complexe dans le cas de l'huile essentielle de citron. Dans ce cas, une précipitation des cires par immersion dans de l'azote liquide a été mise en place avant prélèvement du surnageant et introduction dans le dispositif analytique. Toutes ces précautions ont permis de disposer d'une méthode d'analyse applicable à la détection de pesticides dans différents types d'huiles essentielles suchargées.

Afin d'améliorer la sensibilité de la méthode, il a été montré qu'une étape d'évaporation sous azote peut être considérée comme une procédure ad-hoc d'enrichissement de pesticides pour la quantification de 250 substances actives, potentiellement présentes dans des huiles essentielles caractérisées par des points éclairs relativement bas, comme celles exprimées à partir des hespéridés. Enfin, dans le but de disposer d'une méthode à la fois plus sensible et plus fiable, un nouveau mode d'acquisition mélangeant la détection sensible du mode SRM et la confirmation rapide du mode EPI, a été testé. Elle implique deux injections, la première couvre une large gamme de pesticides pour leur détection sensible en sSRM et la seconde s'attache à proposer une identification des transitions révélées dans le premier cas en mode SRM-EPI.

Cette méthodologie a été directement appliquée à l'analyse de cinq échantillons réels d'huiles essentielles. Ces analyses ont révelé la présence d'une quarantaine de substances actives à des concentrations variant de quelques microgrammes à plusieurs milligrammes par litre d'huile essentielle. Le nombre de pesticides détectés au sein d'un même échantillon peut se réveler conséquent, puisque 20 et 24 pesticides ont pu être quantifiés, respectivement dans les huiles essentielles de citron et d'orange d'origine « non bio ». De plus, même si le nombre

de pesticides et les concentrations sont bien moins importants, il faut noter que l'origine « bio » d'une huile essentielle n'assure pas pour autant l'absence de pesticides. Ces résultats mettent en évidence l'importance de disposer d'une méthode d'analyse multi-résidus de pesticides afin de contrôler leurs teneurs dans les huiles essentielles. En effet, il faut rappeler qu'en plus des nombreuses applications des huiles essentielles, entre autres dans les domaines industriels et l'aromathérapie, ces extraits sont accessibles auprès du grand public pour un usage personel.

Ce travail a donc abouti à la mise au point d'une méthode d'analyse multi-résidus permettant la détection et la quantification de 250 pesticides dans les huiles essentielles par par LC-MS/MS à une teneur moyenne d'une dizaine de microgramme par litre. Toutefois, malgré la très grande polyvalence de cette technique, certains pesticides ne peuvent pas être analysés par LC-MS/MS. C'est pourquoi une méthode d'analyse GC-MS/MS comportant une vingtaine de composés a été développée parallèlement.

La méthode analytique développée au cours de ce projet autorise désormais le contrôle d'une multitude de pesticides dans les huiles essentielles. 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 huiles essentielles. Une telle étude pourrait éventuellement aboutir à l'établissement de limites réglementaires sur les concentrations en pesticides autorisées dans les huiles essentielles. Enfin, même si la méthode analytique développée autorise la détection d'un grand nombre de pesticides, elle reste néanmoins soumise au principe de « on ne trouve que ce que l'on recherche ». Il est donc probable qu'une amélioration significative de la méthode soit apportée dans un futur proche grâce à l'avènement de nouveaux spectromètres de masse de type QqTOF. Pour l'instant limités par leur sensibilité et leur gamme dynamique, ces appareils sont en voie de proposer la détection de la quasi-totalité des composés d'un échantillon à des sensibilités équivalentes au QqLIT utilisé dans ce projet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Baser, K. H. C.; Buchbauer, G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*; Taylor and Francis, **2009**.
(2) Conseil de l'Europe *Directive du conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques (91/414/CEE)*; JO L 230 du 19 Août 1991. p. 209.
(3) Torres, C. M.; Pico, Y.; Mañes, J. *Journal of Chromatography A* **1996**, *754*, 301–331.
(4) Santos, F. J.; Galceran, M. T. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2002**, *21*, 672–685.
(5) Picó, Y.; Blasco, C.; Font, G. *Mass spectrometry reviews* **2004**, *23*, 45–85.
(6) Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 1697-1714.
(7) Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L.; Pastor-Montoro, E.; Romero-González, R. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *390*, 947-959.
(8) Petrovic, M.; Farré, M.; de Alda, M. L.; Perez, S.; Postigo, C.; Köck, M.; Radjenovic, J.; Gros, M.; Barcelo, D. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 4004-4017.
(9) Hogendoorn, E.; van Zoonen, P. *Journal of Chromatography A* **2000**, *892*, 435–453.
(10) Barceló, D.; Petrovic, M. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26*, 2–11.
(11) Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M. *Journal of chromatography A* **1996**, *727*, 153–184.
(12) Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L.; López López, T.; Cortés Aguado, S.; Martínez Salvador, I. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1048*, 199–206.
(13) Titato, G. M.; Bicudo, R. C.; Lanças, F. M. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42*, 1348-1357.
(14) Fernandez, M.; Rodriguez, R.; Pico, Y.; Manes, J. *Journal of Chromatography A* **2001**, *912*, 301-310.
(15) Jansson, C.; Pihlström, T.; Österdahl, B.-G.; Markides, K. E. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1023*, 93-104.
(16) Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Barceló, D. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5441-5449.
(17) Wick, A.; Fink, G.; Ternes, T. A. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 2088-2103.
(18) Asperger, A.; Efer, J.; Koal, T.; Engewald, W. *Journal of chromatography A* **2001**, *937*, 65–72.
(19) Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 1663-1683.
(20) Alder, L.; Greulich, K.; Kempe, G.; Vieth, B. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25*, 838-865.
(21) Hernández, F.; Sancho, J. V.; Pozo, O. J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *382*, 934-946.
(22) Chusaksri, S.; Sutthivaiyakit, S.; Sutthivaiyakit, P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *384*, 1236-1245.
(23) Hernandez, F.; Sancho, J. V.; Pozo, O.; Lara, A.; Pitarch, E. *Journal of Chromatography A* **2001**, *939*, 1–11.
(24) Chen, T.; Chen, G. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 1848-1854.
(25) González-Rodriguez, R. M.; Rial-Otero, R.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1196*, 100–109.
(26) Björklund, E.; Sporring, S.; Wiberg, K.; Haglund, P.; Holst, C. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 318–325.
(27) Garrido Frenich, A.; Martínez Salvador, I.; Martínez Vidal, J. L.; López-López, T. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *383*, 1106-1118.
(28) Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1098*, 37–43.
(29) Kirchner, M.; Húšková, R.; Matisová, E.; Mocák, J. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1186*, 271–280.
(30) NF EN 15662 *Méthode polyvalente de détermination des résidus de pesticides par CG-SM et SL/SM/SM avec extraction/partition avec de l'acétonitrile et nettoyage par SPE dispersés: méthode QuEChERS*; AFNOR, Paris (France), **2009**.
(31) Romero-González, R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. *Talanta* **2008**, *76*, 211-225.
(32) Hernando, M. D.; Ferrer, C.; Ulaszewska, M.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A. R. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 1815-1831.
(33) Kmellár, B.; Fodor, P.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Martínez-Uroz, M. A.; Valverde, A.; Fernandez-Alba, A. R. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1215*, 37-50.
(34) Garland, S. M.; Menary, R. C.; Davies, N. W.; Oliver, G. S. *Practical approaches to the analyses for pesticide residues in essential oils*; RIRDC Project No UT-36A; RIRDC, **2004**; p. 73.
(35) Greulich, K.; Alder, L. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 183–197.
(36) European Pharmacopoeia *Essential oils - Aetherolea*; **2008**.
(37) Bruneton, J. *Pharmacognosie: Phytochimie, plantes médicinales*; 3e éd.; Tech.& Doc./Lavoisier, **1999**.
(38) GARNERO, J. *Huiles Essentielles*; Ed. Techniques Ingénieur.
(39) Srivastava, A. K.; Srivastava, S. K.; Syamsundar, K. V. *Flavour and Fragrance Journal* **2005**, *20*, 51-53.
(40) Gancel, A.-L.; Ollé, D.; Ollitrault, P.; Luro, F.; Brillouet, J.-M. *Flavour and Fragrance Journal* **2002**, *17*, 416-424.
(41) Kurowska, A.; Gałązka, I. *Flavour and Fragrance Journal* **2006**, *21*, 143-147.
(42) Scheffer, J. J. C. *Acta Horticulturae* **1993**, *344*, 2-8.
(43) Cassel, E.; Vargas, R. M. F.; Martinez, N.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E. *Industrial Crops & Products* **2009**, *29*, 171-176.
(44) Cerpa, M. G.; Mato, R. B.; Jose Cocero, M. *AIChE Journal* **2008**, *54*.
(45) Kowalski, R.; Wawrzykowski, J. *Flavour and Fragrance Journal* **2009**, *24*, 69-74.
(46) Chemat, F.; Lucchesi, M. E.; Smadja, J.; Favretto, L.; Colnaghi, G.; Visinoni, F. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *555*, 157–160.
(47) Sahraoui, N.; Vian, M. A.; Bornard, I.; Boutekedjiret, C.; Chemat, F. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1210*, 229–233.
(48) Lucchesi, M. E.; Chemat, F.; Smadja, J. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1043*, 323–327.
(49) Wang, Z.; Ding, L.; Li, T.; Zhou, X.; Wang, L.; Zhang, H.; Liu, L.; Li, Y.; Liu, Z.; Wang, H.; others *Journal of Chromatography A* **2006**, *1102*, 11–17.

(50) Pourmortazavi, S. M.; Hajimirsadeghi, S. S. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1163*, 2-24.
(51) Gamiz-Gracia, L.; Luque de Castro, M. D. *Talanta* **2000**, *51*, 1179–1185.
(52) Reverchon, E. *The Journal of Supercritical Fluids* **1997**, *10*, 1–37.
(53) Hawthorne, S. B.; Rickkola, M.-L.; Screnius, K.; Holm, Y.; Hiltunen, R.; Hartonen, K. *Journal of Chromatography A* **1993**, *634*, 297-308.
(54) Khajeh, M. *Food Chemistry* **2004**, *86*, 587-591.
(55) Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, 446-475.
(56) Leffingwell, J. C. *Rose (Rosa damascena)*. Disponible sur < http://www.leffingwell.com/rose.htm>. (Consulté le 24 Janvier 2011)
(57) Fráter, G.; Bajgrowicz, J. A.; Kraft, P. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7633–7703.
(58) Cosentino, S.; Tuberoso, C. I. G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. *Letters in Applied Microbiology* **1999**, *29*, 130–135.
(59) Lawrence, B. M. *Perfumer and Flavourist* **2009**, *34*, 38-44.
(60) Aburjai, T.; Natsheh, F. M. *Phytotherapy Research* **2003**, *17*, 987-1000.
(61) AFSSAPS *Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles* **2008**.
(62) Edris, A. E. *Phytotherapy Research* **2007**, *21*, 308-323.
(63) Buchbauer, G.; Jirovetz, L. *Flavour and Fragrance Journal* **1994**, *9*, 217-222.
(64) Tisserand, R.; Balacs, T. *Essential oil safety: a guide for health care professionals*; Churchill Livingstone, **1995**.
(65) Burt, S. *International Journal of Food Microbiology* **2004**, *94*, 223-253.
(66) Tiwari, B. K.; Valdramidis, V. P.; O'Donnell, C. P.; Muthukumarappan, K.; Bourke, P.; Cullen, P. J. *Journal of agricultural and food chemistry* **2009**, *57*, 5987–6000.
(67) WHO *The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life*. Geneva, 2002; p. 248.
(68) Ministère de l'agriculture et de la pêche *éccophyto2018* **2008**.
(69) Dayan, F. E.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**.
(70) Garcia, R.; Alves, E. S. S.; Santos, M. P.; Aquije, G. M. F.; Fernandes, A. A. R.; Santos, R. B.; Ventura, J. A.; Fernandes, P. *Brazilian Journal of Microbiology* **2008**, *39*, 163–168.
(71) Isman, M. B. *Crop protection* **2000**, *19*, 603–608.
(72) Isman, M. B.; Miresmailli, S.; Machial, C. *Phytochemistry Reviews* **2010**.
(73) AFNOR NF T75-400 *Huiles essentielles - Analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne remplie - Méthode générale.*; AFNOR, Paris (France), **1985**.
(74) AFNOR NF T75-401 *Huiles essentielles - Analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire - Méthode générale.*; AFNOR, Paris (France), **1985**.
(75) Kovats, E. *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 1915-1932.
(76) Oprean, R.; Tamas, M.; Sandulescu, R.; Roman, L. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **1998**, *18*, 651–657.
(77) Van Den Dool, H.; Dec. Kratz, P. *Journal of Chromatography A* **1963**, *11*, 463-471.
(78) Zhao, C.; Liang, Y.; Fang, H.; Li, X. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1096*, 76-85.
(79) AFNOR NF ISO 855 *Huile essentielle de citron [Citrus limon (L.) Burm. f.]*; AFNOR, Paris (France), 2004.
(80) Badjah Ahmed, A. Y. H.; Meklati, B. Y.; Fraisse, D. *Flavour and Fragrance Journal* **1988**, *3*, 13-18.
(81) Doolittle, R. E.; Tumlinson, J. H.; Proveaux, A. *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 1625–1630.
(82) Cazaussus, A.; Pes, R.; Sellier, N.; Tabet, J. C. *Chromatographia* **1988**, *25*, 865–869.
(83) Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P. Q.; Cicero, L.; Dugo, P.; Dugo, G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 5602-5606.
(84) Rubiolo, P.; Liberto, E.; Sgorbini, B.; Russo, R.; Veuthey, J.-L.; Bicchi, C. *Journal of Separation Science* **2008**, *31*, 1074-1084.
(85) Bicchi, C.; D'Amato, A.; Rubiolo, P. *Journal of Chromatography A* **1999**, *843*, 99–121.
(86) Sybliska, D.; Kościelski, T. *Journal of Chromatography A* **1983**, *261*, 357-362.
(87) Bicchi, C.; Liberto, E.; Cagliero, C.; Cordero, C.; Sgorbini, B.; Rubiolo, P. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1212*, 114–123.
(88) Bicchi, C.; Blumberg, L.; Cagliero, C.; Cordero, C.; Rubiolo, P.; Liberto, E. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 1530–1536.
(89) Schomburg, G. *Journal of Chromatography A* **1995**, *703*, 309-325.
(90) Mondello, L.; Catalfamo, M.; Cotroneo, A.; Dugo, G.; Dugo, G.; McNair, H. *Journal of High Resolution Chromatography* **1999**, *22*, 350-356.
(91) Mondello, L.; Catalfamo, M.; Dugo, P.; Dugo, G. *Journal of Microcolumn Separation* **1998**, *10*, 203-212.
(92) Mondello, L.; Catalfamo, M.; Proteggente, A. R.; Bonaccorsi, I.; Dugo, G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 54-61.
(93) Shellie, R.; Marriott, P. *Flavour and Fragrance Journal* **2003**, *18*, 179-191.
(94) Shellie, R.; Mondello, L.; Marriott, P.; Dugo, G. *Journal of Chromatography A* **2002**, *970*, 225–234.
(95) Benincasa, M.; Buiarelli, F.; Cartoni, G. P.; Coccioli, F. *Chromatographia* **1990**, *30*, 271–276.
(96) Buiarelli, F.; Cartoni, G. P.; Coccioli, F.; Leone, T. *Journal of Chromatography A* **1996**, *730*, 9–16.
(97) Buiarelli, F.; Cartoni, G. P.; Coccioli, F.; Ravazzi, E. *Chromatographia* **1991**, *31*, 489–492.
(98) Dugo, P.; Mondello, L.; Cogliandro, E.; Verzera, A.; Dugo, G. *Jounal of Agricultural and Food Chemistry***1996**, *44*, 544–549.
(99) Smelcerovic, A.; Lamshoeft, M.; Radulovic, N.; Ilic, D.; Palic, R. *Chromatographia* **2009**, *71*, 113-116.
(100) Dugo, P.; Cacciola, F.; Kumm, T.; Dugo, G.; Mondello, L. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1184*, 353–368.
(101) Dugo, P.; Favoino, O.; Luppino, R.; Dugo, G.; Mondello, L. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 2525-2530.

(102) Dugo, P.; Herrero, M.; Giuffrida, D.; Kumm, T.; Dugo, G.; Mondello, L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 3478-3485.
(103) Mondello, L.; Dugo, P.; Dugo, G.; Lewis, A. C.; Bartle, K. D. *Journal of Chromatography A* **1999**, *842*, 373–390.
(104) Mondello, L.; Dugo, P.; Bartle, K. D.; Dugo, G.; Cotroneo, A. *Flavour and Fragrance Journal* **1995**, *10*, 33-42.
(105) Dugo, G.; Verzera, A.; Cotroneo, A.; Stagno d'Alcontres, I.; Mondello, L.; Bartle, K. D. *Flavour and Fragrance Journal* **1994**, *9*, 99-104.
(106) Mondello, L.; Dugo, P.; Bertle, K. D.; Frere, B.; Dugo, G. *Chromatographia* **1994**, *39*, 529-538.
(107) Greule, M.; Hänsel, C.; Bauermann, U.; Mosandl, A. *Eur Food Res Technol* **2007**, *227*, 767-776.
(108) Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P. Q.; Furukawa, M.; Komori, K.; Miseki, K.; Dugo, P.; Dugo, G. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1105*, 11–16.
(109) Schipilliti, L.; Tranchida, P. Q.; Sciarrone, D.; Russo, M.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. *Journal of Separation Science* **2010**, *33*, 617-625.
(110) Sciarrone, D.; Schipilliti, L.; Ragonese, C.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 1101–1105.
(111) Pintore, G.; Usai, M.; Bradesi, P.; Juliano, C.; Boatto, G.; Tomi, F.; Chessa, M.; Cerri, R.; Casanova, J. *Flavour and Fragrance Journal* **2002**, *17*, 15-19.
(112) Eyres, G.; Dufour, J.-P.; Hallifax, G.; Sotheeswaran, S.; Marriott, P. J. *Journal of Separation Science* **2005**, *28*, 1061-1074.
(113) Moller, J. K. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. *Food Chemistry* **2007**, *100*, 1283–1288.
(114) Nhu-Trang, T.-T.; Casabianca, H.; Grenier-Loustalot, M.-F. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *386*, 2141-2152.
(115) Eyres, G.; Marriott, P.; Dufour, J. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1150*, 70-77.
(116) Chisholm, M. G.; Wilson, M. A.; Gaskey, G. M. *Flavour and Fragrance Journal* **2003**, *18*, 106-115.
(117) Ravi, R.; Prakash, M.; Bhat, K. K. *European Food Research and Technology* **2006**, *225*, 367-374.
(118) Goodner, K. L.; Mahattanatawee, K.; Plotto, A.; Sotomayor, J. A.; Jordan, M. J. *Industrial Crops and Products* **2006**, *24*, 264–268.
(119) Günther, H. *La spectroscopie de RMN: principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en chimie*; Masson, **1996**.
(120) Gonny, M.; Bradesi, P.; Casanova, J. *Flavour and Fragrance Journal* **2004**, *19*, 424-433.
(121) Martins, A. P.; Salgueiro, L.; Vila, R.; Tomi, F.; Ca\ nigueral, S.; Casanova, J.; Cunha, A.; Adzet, T. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2019–2023.
(122) Have, H. M. L. D. W.; Common, T. E. I. B.; Prevails, S.; Bare, T. L. *Cropwatch Newsletter* **2007**.
(123) Couteux, A.; Salaün, C. *Index phytosanitaire acta 2009*; 45e éd.; MAME, **2009**.
(124) Tomlin C.D.S. *The Pesticide Manual - A world compendium*; Fourteenth Edition.; British Crop Protection Council (BCPC), **2006**.
(125) Calvet, R. *Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales*; France Agricole Editions, **2005**.
(126) Observatoire des Résidus de Pesticides (ORP) *Le marché mondial*. Disponible sur < http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=379>. (Consulté 14 Janvier 2011**)**.
(127) Collectif *Pesticides et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement*; ACTA, Association de coordination technique agricole, **2002**.
(128) Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP) *Les produits phytopharmaceutiques et l'environnement*; UIPP: Boulogne, **2009**; p. 11.
(129) Directorate General for Health and Consumers EUROPA - Plant Health - Plant Protection - Plant Protection Products - New regulation on Plant Protection Products-Review Programme of existing pesticides. Disponible sur <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/rev_prog_exist_pest_en.htm>. (Consulté le 24 Janvier 2011)
(130) Fédération Régionale de Défense contre les Ennemis des Cultures (F.R.E.D.E.C.) Nord-Pas-de-Calais *Guide technique sur les bonnes pratiques phytosanitaire* **2004**.
(131) Bussereau, D.; Bertrand, X.; Ollin, N. *Arrêté du 12 septembre 2006 relatif à la mise sur le marché et à l'utilisation des produits visés à l'article L. 253-1 du code rural*; **2006**; p. 11.
(132) Regnault-Roger, C. *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement*; Tec & Doc, **2005**.
(133) Kucklick, J. R.; Krahn, M. M.; Becker, P. R.; Porter, B. J.; Schantz, M. M.; York, G. S.; O?Hara, T. M.; Wise, S. A. *J. Environ. Monit.* **2006**, *8*, 848.
(134) JO n° 107 du 8 mai 1994. *Arrêté du 20/04/94 relatif à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances*; 1994.
(135) European Food Safety Authority (EFSA) *SCIENTIFIC REPORT OF EFSA 2008 Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) No 396/20051 European Food Safety Authority*; EFSA: Parme, Italy, **2010**; p. 442.
(136) Parliament in the Nineteenth Year of the Republic of India *THE INSECTICIDES ACT, 1968*.
(137) Agência Nacional de Vigilância Sanitária *Monografias Autorizadas*. Disponible sur <http://www.anvisa.gov.br>. (Consulté le 19 Janvier 2011)
(138) Connett Ellen *Fluoride Action Network Pesticide Project*. Disponible sur < http://www.fluoridealert.org/f-pesticides.htm>. (Consulté le 19 Janvier 2011)
(139) Couteux, A.; Lejeune, V. *Index phytosanitaire acta 2008*; 44e éd.; MAME, **2008**.
(140) Ministère de l'agriculture et de la pêche e-phy *Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France*. Disponible sur < http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>. (Consulté le 19 Janvier 2011)

(141) Neumeister, L. *The EU's unsafe pesticide limits*; GREENPEACE/GLOBAL 2000, **2008**; p. 112.
(142) Conseil de l'Europe et Direction Européenne de la Qualité du Médicament *Pharmacopée Européenne 2.8.13*; 5e éd.; **2005**.
(143) FAO/OMS *Résidus de Pesticides dans les denrées alimentaires (LMRs/LMREs)*. Disponible sur < http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-f.jsp>. (Consulté le 19 Janvier 2011)
(144) Kuster, M.; de Alda, M. L.; Barceló, D. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25*, 900-916.
(145) Jeannot, R.; Sabik, H.; Sauvard, E.; Genin, E. *Journal of Chromatography A* **2000**, *879*, 51–71.
(146) Steen, R. J. C. A.; Hogenboom, A. C.; Leonards, P. E. G.; Peerboom, R. A. L.; Cofino, W. P.; Brinkman, U. A. T. *Journal of Chromatography A* **1999**, *857*, 157–166.
(147) Borba da Cunha, A. C.; Lopez de Alda, M. J.; Barcelo, D.; Pizzolato, T. M.; dos Santos, J. H. Z. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, 940-954.
(148) Botitsi, H.; Economou, A.; Tsipi, D. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 1685-1695.
(149) Soler, C.; Manes, J.; Pico, Y. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1048*, 41-49.
(150) Soler, C.; Mañes, J.; Picó, Y. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1067*, 115–125.
(151) Hager, J. W.; Yves Le Blanc, J. C. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1020*, 3-9.
(152) Bueno, M. J. M.; Agüera, A.; Hernando, M. D.; Gómez, M. J.; Fernández-Alba, A. R. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 5995-6002.
(153) Hiemstra, M.; de Kok, A. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1154*, 3-25.
(154) Garciareyes, J.; Ferrer, C.; Gomezramos, M.; Fernandezalba, A.; Garciareyes, J.; Molinadiaz, A. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26*, 239-251.
(155) Saitta, M.; Di Bella, G.; Salvo, F.; Curto, S. L.; Dugo, G. *Jounal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 797–801.
(156) Barrek, S.; Paisse, O.; Grenier-Loustalot, M. F. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2003**, *376*, 157–161.
(157) Di Bella, G.; Saitta, M.; La Pera, L.; Alfa, M.; Dugo, G. *Chemosphere* **2004**, *56*, 777–782.
(158) Starr, H.; Kiigemagi, U.; Terriere, L. C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1963**, *11*, 482-486.
(159) Inman, R. D.; Kiigemagi, U.; Deinzer, M. L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1983**, *31*, 918-919.
(160) Garland, S. M.; Menary, R. C.; Davies, N. W. *Jounal of Agricultural and Food Chemistry***1999**, *47*, 294–298.
(161) Dole, M. *The Journal of Chemical Physics* **1968**, *49*, 2240.
(162) Alexandrov, M. L.; Gall, L. N.; Krasnov, N. V.; Nikolaev, V. I.; Pavlenko, V. A.; Shkurov, V. A. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2008**, *22*, 267-270.
(163) Yamashita, M.; Fenn, J. B. *The Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 4451–4459.
(164) Covey, T. R.; Thomson, B. A.; Schneider, B. B. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 870-897.
(165) Rosenberg, E. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, 841–889.
(166) Cole, R. B. *Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, and applications*; Wiley, **1997**.
(167) Manisali, I.; Chen, D. D. Y.; Schneider, B. B. *Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 243-256.
(168) Bruins, A. P.; Covey, T. R.; Henion, J. D. *Analytical Chemistry* **1987**, *59*, 2642–2646.
(169) Rohner, T. C.; Lion, N.; Girault, H. H. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 3056.
(170) Dulcks, T.; Juraschek, R. *Journal of Aerosol Science* **1999**, *30*, 927-943.
(171) Van Berkel, G. J.; Kertesz, V. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 5510-5520.
(172) Kebarle, P.; Verkerk, U. H. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 898-917.
(173) Tang, L.; Kebarle, P. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 3654–3668.
(174) Iribarne, J. V. *The Journal of Chemical Physics* **1976**, *64*, 2287.
(175) Cech, N. B.; Enke, C. G. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20*, 362-387.
(176) Campargue, R. *The Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 4466–4474.
(177) Henriksen, T.; Juhler, R. K.; Svensmark, B.; Cech, N. B. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 446–455.
(178) Mehlis, B.; Kertscher, U. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *352*, 71–83.
(179) Rosset, R.; Caude, M.; Jardy, A. *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*; Masson, **1995**.
(180) Christian, G. D. *Analytical Chemistry, 5th Edition*; 5e éd.; John Wiley & Sons, **1993**.
(181) Ettre, L. S. *Pure Applied Chemistry* **1993**, *65*, 819-872.
(182) Kazakevich, Y. V. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1126*, 232–243.
(183) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principes d'analyse instrumentale*; De Boeck Université, **2003**.
(184) Horváth, C.; Melander, W.; Molnár, I. *Journal of Chromatography A* **1976**, *125*, 129-156.
(185) Kayillo, S.; Dennis, G.; Shalliker, R. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1126*, 283-297.
(186) Sander, L. C.; Wise, S. A. *Analytical Chemistry* **1984**, *56*, 504–510.
(187) Sentell, K. B.; Dorsey, J. G. *Analytical chemistry* **1989**, *61*, 930–934.
(188) Martire, D. E.; Boehm, R. E. *The Journal of Physical Chemistry* **1983**, *87*, 1045–1062.
(189) Dill, K. A. *Journal of Physical Chemistry* **1987**, *91*, 1980–1988.
(190) Grushka, E.; Grinberg, N. *Advances in Chromatography: Volume 48*; 1er éd.; CRC Press, 2009.
(191) Rafferty, J. L.; Zhang, L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. R. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 6551-6558.
(192) Rafferty, J. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 2320-2331.
(193) Rafferty, J. L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. R. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1204*, 20–27.
(194) Rafferty, J. L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. R. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1204*, 11–19.
(195) Zhang, L.; Rafferty, J. L.; Siepmann, J. I.; Chen, B.; Schure, M. R. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1126*, 219–231.
(196) Rafferty, J. L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. R. *Analytical chemistry* **2008**, *80*, 6214–6221.

(197) van Deemter, J. J.; Zuiderweg, F. J.; Klinkenberg, A. *Chemical Engineering Science* **1956**, *5*, 271-289.
(198) McCalley, D. V. *Journal of Chromatography A* **2000**, *902*, 311–321.
(199) Kostiainen, R.; Kauppila, T. J. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 685-699.
(200) Jandera, P. *Journal of Chromatography A* **1999**, *845*, 133–144.
(201) Kostiainen, R.; Bruins, A. P. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 1393–1399.
(202) McCalley, D. V. *Journal of Chromatography A* **1996**, *738*, 169–179.
(203) Temesi, D.; Law, B. *LC-GC Europe* **1999**, *12*, 175-180.
(204) Straub, R. F.; Voyksner, R. D. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, *4*, 578-587.
(205) Castells, R. C.; Castells, C. B.; Castillo, M. A. *Journal of Chromatography A* **1997**, *775*, 73–79.
(206) Keunchkarian, S.; Reta, M.; Romero, L.; Castells, C. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1119*, 20-28.
(207) Kozlowski, E. S.; Dalterio, R. A. *Journal of Separation Science* **2007**, *30*.
(208) Layne, J.; Farcas, T.; Rustamov, I.; Ahmed, F. *Journal of Chromatography A* **2001**, *913*, 233-242.
(209) Shalliker, R. A.; Catchpoole, H. J.; Dennis, G. R.; Guiochon, G. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1142*, 48-55.
(210) Castells, C. B.; Ràfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1002*, 41-53.
(211) Castells, C. B.; Gagliardi, L. G.; Ràfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1042*, 23-36.
(212) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Spectrométrie de masse: cours et exercices corrigés*; Dunod, **2005**.
(213) Murray, K. K.; Boyd, R. K.; Eberlin, M. N.; Langley, G. J.; Li, L.; Naito, Y. *Standard Definitions of Terms Relating To Mass Spectrometry (IUPAC Recommendations 2006)* **2006**.
(214) Balogh, M. *LC-GC Europe* **2004**, *17*, 152-159.
(215) Sancho, J. V.; Pozo, Ó. J.; Ibáñez, M.; Hernández, F. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *386*, 987-997.
(216) Pozo, Ó. J.; Sancho, J. V.; Ibá\ nez, M.; Hernández, F.; Niessen, W. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 1030–1042.
(217) March, R. E. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 961-989.
(218) March, R. E.; Hughes, R. J.; Todd, J. F. J. *Quadrupole storage mass spectrometry*; Wiley, **1989**.
(219) Campbell, R. *Théorie générale de l'équation de Mathieu et de quelques autres équations différentielles de la mécanique*; Masson, **1955**.
(220) Douglas, D. J.; Frank, A. J.; Mao, D. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24*, 1-29.
(221) Hager, J. W.; others *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 512–526.
(222) Paul, W.; Steinwedel, H. Apparatus for separating charges particles of different specific charges. German patent 944,900 (1956); U.S. patent 2,939,952 (1960)
(223) Schwartz, J. C.; Senko, M. W.; Syka, J. E. P. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13*, 659–669.
(224) Londry, F. A.; Hager, J. W. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *14*, 1130–1147.
(225) Hopfgartner, G.; Varesio, E.; Tschäppät, V.; Grivet, C.; Bourgogne, E.; Leuthold, L. A. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 845-855.
(226) Dehmelt, H. G. Academic Press, **1968**; Volume 3, p. 53-72.
(227) Sleno, L.; Volmer, D. A. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 1091-1112.
(228) Shukla, A. K.; Futrell, J. H. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1069–1090.
(229) Rosenstock, H. M.; Wallenstein, M. B.; Wahrhaftig, A. L.; Eyring, H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1952**, *38*, 667.
(230) Marcus, R. A. *The Journal of Chemical Physics* **1952**, *20*, 359-364.
(231) Marcus, R. A.; Rice, O. K. *Journal of Physical and Colloid Chemistry* **1951**, *55*, 894.
(232) Baer, T.; Hase, W. L. *Unimolecular reaction dynamics: theory and experiments*; Oxford University Press, **1996**.
(233) Wright, M. R. *Fundamental chemical kinetics: an explanatory introduction to the concepts*; Horwood, **1999**.
(234) Morris, M.; others *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1994**, *5*, 1042–1063.
(235) Douglas, D. J.; French, J. B. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1992**, *3*, 398–408.
(236) de Hoffmann, E. *Journal of mass spectrometry* **1996**, *31*, 129–137.
(237) Hogenboom, A. C.; Niessen, W. M. A.; Brinkman, U. A. *Journal of Chromatography A* **1998**, *794*, 201–210.
(238) Mueller, C. A.; Weinmann, W.; Dresen, S.; Schreiber, A.; Gergov, M. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 1332-1338.
(239) Hercegová, A.; Dömötörová, M.; Matisová, E. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1153*, 54–73.
(240) Niessen, W. M. A.; Manini, P.; Andreoli, R. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25*.
(241) Agüera, A.; López, S.; Fernández-Alba, A. R.; Contreras, M.; Crespo, J.; Piedra, L. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1045*, 125–135.
(242) Kruve, A.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1187*, 58–66.
(243) Antignac, J. P.; de Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F.; Le Bizec, B. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *29*, 129-136.
(244) Hajlová, J.; Zrostlikova, J. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, 181–197.
(245) King, R.; Bonfiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11*, 942-950.
(246) Kebarle, P.; Tang, L. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 972A-986A.
(247) Benijts, T.; Dams, R.; Lambert, W.; De Leenheer, A. *Journal of chromatography A* **2004**, *1029*, 153-159.
(248) Kloepfer, A.; Quintana, J. B.; Reemtsma, T. *Journal of chromatography A* **2005**, *1067*, 153-160.
(249) Choi, B. K.; Hercules, D. M.; Gusev, A. I. *Journal of Chromatography A* **2001**, *907*, 337-342.
(250) Stahnke, H.; Reemtsma, T.; Alder, L. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 2185-2192.
(251) European Commission *COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC)*; p. 29.

(252) Scientific Group *Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed Document No. SANCO/10684/2009* **2009**.
(253) Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Widmer, M.; Giles, K.; Uría, D. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2009**, *23*, 985-998.
(254) Loboda, A.; Krutchinsky, A.; Loboda, O.; McNabb, J.; Spicer, V.; Ens, W.; Standing, K. *European Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *6*, 531.
(255) Mansoori, B. A.; Dyer, E. W.; Lock, C. M.; Bateman, K.; Boyd, R. K.; Thomson, B. A. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 775-788.
(256) Hager, J. W.; Yves Le Blanc, J. C. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 1056-1064.
(257) Layne, J. *Journal of Chromatography A* **2002**, *957*, 149-164.
(258) Fillâtre, Y.; Rondeau, D.; Jadas-Hécart, A.; Communal, P. Y. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **2010**, *24*, 2453-2461.
(259) Filla - , A.; Communal, P.-Y. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 109-117.
(260) AFNOR NF XP T 90-210 (1999) *Qualité de l'eau – Protocole d'évaluation d'une méthode alternatived'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence*; AFNOR, Paris (France), 1999; p. 61.
(261) Shapiro, S. S.; Wilk, M. B. *Biometrika* **1965**, *52*, 591–611.
(262) Rorabacher, D. B. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 139-146.
(263) Danzer, K. *Analytical chemistry: theoretical and metrological fundamentals*; Springer, **2007**.
(264) AFNOR NF T 75-254 *Huile essentielle de cyprès (Cupressus sempervirens Linnaeus)*; AFNOR, Paris (France), **1992**.
(265) AFNOR NF T 75-305 *Huile essentielle de lavandin super [Lavandula angustifolia P.Miller x Lavandula latifolia (Linnaeus fils) Medikus]*; AFNOR, Paris (France), **1992**.
(266) AFNOR NF T 75-203 *Huile essentielle d'Orange douce [Citrus sinensis (L.) Osbeck] obtenue par des procédés mécaniques*; AFNOR, Paris (France), **2006**.

ABSTRACT

Nowadays, about 3000 essential oils are produced and used worldwide in various application fields related to pharmaceutical, agronomic, food and perfume industries. These oils are extracted from citrus or medicinal and aromatic plants. Due to the use of pesticides in plant cultivation, the presence of such residues cannot be ruled out. The variety of pesticides used and the widespread use of essential oils necessitate the development of a multi-residue analytical method to ensure consumers' health. The state of the art of analytical methods related to this issue has revealed a clear lack of performance both in terms of detection limit as well as in the number of analyzed pesticides.

This manuscript proposes the development of a multi-residue analytical method of pesticides in essential oils by coupling liquid chromatography and mass spectrometry, technology which is, considering the bibliography, the best dedicated to answer this problematic. After demonstrating the performance of the new acquisition mode Scheduled SRM, available on the mass spectrometer 4000 QTrap, for the detection and quantification of 250 pesticides in a determined solvant, the importance of considering the nature of matrix in sample's preparation as well as during the sample's analysis has further been proved by the study of two representative essential oils (lavandin and lemon). Finally, the multi-residue LC-MS/MS analysis method has been applied to the research of pesticides in real essential oils. This method has demonstrated its ability to detect, quantify and identify pesticides in these matrices through the use of a coupled acquisition mode SRM-EPI making use of the hybrid mass spectrometer's specificities and especially its linear ion trap. Moreover this work has shown the importance of having such a method, considering the number of detected pesticides and their relatively high concentrations. These ones can indeed reach a level higher than one milligram per liter in the analyzed essential oils.

Keywords: pesticide, essential oil, multi-residue analysis, mass spectrometry, LC-MS/MS, Scheduled SRM, linear ion trap, electrospray, 4000 QTrap.

RESUME

De nos jours, environ 3000 huiles essentielles sont produites et utilisées dans le monde avec des champs d'application aussi variés que la cosmétique, la parfumerie l'agro-alimentaire, la pharmacie et l'aromathérapie. Ces huiles sont extraites des hespéridés ou des plantes aromatiques et médicinales. Étant donné que la culture de ces matières premières implique généralement l'application de pesticides, la présence de tels résidus dans les huiles essentielles ne peut pas être écartée. Compte tenu du nombre important de pesticides employés et des nombreux champs d'application des huiles essentielles, il apparaît nécessaire, afin d'assurer la santé du consommateur, de disposer d'une méthode d'analyse multi-résidus capable de doser les pesticides dans les huiles essentielles. L'état de l'art des méthodes d'analyse lié à cette problématique a révélé un manque évident de performance des méthodes actuelles aussi bien en termes de limite de détection que du nombre de pesticides analysés.

Ce mémoire propose donc la mise au point d'une méthode d'analyse multi-résidus de pesticides dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse, technologie la plus à même de répondre à la problématique au vue de la bibliographie. Après avoir mis en évidence les performances du nouveau mode d'acquisition Scheduled SRM, disponible sur le spectromètre de masse 4000 QTrap, pour la détection et la quantification de 250 pesticides dans un solvant déterminé, l'importance de considérer la nature de la matrice, aussi bien dans les méthodes de préparation que lors de l'analyse de l'échantillon, a ensuite été démontrée en étudiant deux huiles essentielles représentatives (lavandin et citron). Enfin, la méthode d'analyse multi-résidus LC-MS/MS a été appliquée à la recherche de pesticides dans des échantillons réels d'huiles essentielles. Elle a démontré sa capacité à détecter, quantifier et identifier les pesticides dans ces matrices au travers de l'utilisation d'un mode d'acquisition couplé SRM-EPI faisant appel aux spécificités du spectromètre de masse hybride et notamment de sa trappe d'ion linéaire. Ce travail a de plus révélé l'importance de disposer d'une telle méthode au regard du nombre de pesticides détectés dans les échantillons et de leurs concentrations relativement élevées. Celles-ci peuvent en effet atteindre des teneurs supérieures au milligramme par litre dans les huiles essentielles analysées.

Mots clés : pesticide, huile essentielle, analyse multi-résidus, spectrométrie de masse, LC-MS/MS, Scheduled SRM, trappe d'ions linéaire, electrospray, 4000 QTrap.