



HAL
open science

Extractions et analyses des hydrocarbures aromatiques : approches méthodologiques et applications à des matrices fruitières

Alice Paris

► **To cite this version:**

Alice Paris. Extractions et analyses des hydrocarbures aromatiques : approches méthodologiques et applications à des matrices fruitières. Sciences agricoles. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC246 . tel-01948884

HAL Id: tel-01948884

<https://theses.hal.science/tel-01948884>

Submitted on 9 Dec 2018

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

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



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences agronomiques, biotechnologies agro-alimentaires

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Extractions et analyses des hydrocarbures aromatiques :
Approches méthodologiques
et
Applications à des matrices fruitières**

**Présentée et soutenue par
Alice PARIS**

**Thèse soutenue publiquement le 8 décembre 2017
devant le jury composé de**

Mme Claire ELFAKIR	Professeur des Universités, Université d'Orléans	Rapporteur
M. Guido RYCHEN	Professeur des Universités, Université de Lorraine - ENSAIA	Rapporteur
Mme Pauline POINOT	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Examineur
M. Jérôme LEDAUPHIN	Maître de Conférences, HDR, Université de Caen Normandie	Codirecteur de thèse
M. Jean-Luc GAILLARD	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Jean-Luc GAILLARD et co-dirigée par Jérôme LEDAUPHIN, Unité de Recherche « Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements »





Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences agronomiques, biotechnologies agro-alimentaires

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Extractions et analyses des hydrocarbures aromatiques :
Approches méthodologiques
et
Applications à des matrices fruitières**

**Présentée et soutenue par
Alice PARIS**

**Thèse soutenue publiquement le 8 décembre 2017
devant le jury composé de**

Mme Claire ELFAKIR	Professeur des Universités, Université d'Orléans	Rapporteur
M. Guido RYCHEN	Professeur des Universités, Université de Lorraine - ENSAIA	Rapporteur
Mme Pauline POINOT	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Examineur
M. Jérôme LEDAUPHIN	Maître de Conférences, HDR, Université de Caen Normandie	Codirecteur de thèse
M. Jean-Luc GAILLARD	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Jean-Luc GAILLARD et co-dirigée par Jérôme LEDAUPHIN, Unité de Recherche « Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements »



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la Région Normandie pour m'avoir financée au cours des trois premières années de thèse.

Je souhaite également sincèrement remercier Madame Claire ELFAKIR et Monsieur Guido RYCHEN d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et de faire partie du jury. Je suis très reconnaissante pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce travail.

Un grand merci à Monsieur Jean-Luc GAILLARD et à Monsieur Jérôme LEDAUPHIN de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse. Merci d'avoir partagé votre enthousiasme et vos compétences. Votre encadrement, vos conseils et vos encouragements m'ont permis de progresser personnellement et professionnellement.

Merci à Madame Pauline POINOT d'avoir été à l'initiative et de m'avoir encouragée à rédiger le projet de revue. Ce fut long (très long) mais ce travail est sur le point d'aboutir et j'en tirerai une immense satisfaction.

Je remercie également Monsieur Didier HENNEQUIN pour m'avoir aiguillé et aidé pour le traitement statistique des résultats.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres de l'équipe du Laboratoire Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements pour la bonne ambiance, plus chaleureuse que la température des locaux de l'université (mais c'est connu le froid ça conserve).

A Mélanie et Vanessa pour m'avoir aidé dans mes premiers pas au laboratoire et aussi à Marielle pour ta disponibilité et ta réactivité pour les demandes de dernières minutes.

Un grand merci à Benoît, bien sûr, pour avoir été à mes côtés dans la lutte contre le soulèvement des machines, une aventure bien remplie dont je te laisse écrire la suite avec Chaïmaa (mes amitiés au « lutin du labo » si vous le croisez).

Merci aux enseignants du département Génie Chimique de l'IUT de Caen et plus particulièrement à David et à Claire, qui m'ont permis d'aménager mon emploi du temps d'ATER en fonction des contraintes imposée par les manipulations et par la rédaction de thèse.

Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé le bureau, thésards et post-doc pour le calme de cet espace de travail

Merci au service informatique du Campus 2 de l'IUT de Caen qui m'a aidé à récupérer une grande partie de mon manuscrit après qu'une attaque de ransomware ai crypté tous mes fichiers (eh non, ça n'arrive pas que dans les films).

Je rajoute une petite pensée pour toutes les pommes sacrifiées au nom de la science, nombreux sont ceux qui auraient préféré vous voir disparaître dans « le triangle des Bermudes » (ou salle de pause) sous forme de tarte ou autres pâtisseries.

Je salue également tous ceux qui m'ont klaxonné quand je cueillais des pommes avec mes gants verts sur le bord des routes.

Mes remerciements vont aussi à Cédric qui m'a préparé de bons petits plats et fait en sorte que l'appartement reste dans un état décent au cours de ces dernières semaines de rédaction.

Enfin, Je ne pourrais jamais assez remercier mes parents pour leur soutien indéfectible votre présence ainsi que celle d'Anne-Line et de Calie m'est plus qu'indispensable.

Je tiens tout particulièrement à dédier ce travail à mes deux grands-mères qui sont, pour moi, de très beaux exemples de femme, intelligente et indépendante.

Table des matières

Liste des figures	i
Liste des tableaux.....	iv
Liste des abréviations.....	viii
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Introduction Bibliographique.....	3
1.1 Présentation des hydrocarbures aromatiques	3
1.1.1 Structure et propriétés	3
1.1.2 Origines	6
1.1.3 Identification de profils d'hydrocarbures aromatiques émis en fonction des sources d'émissions	7
1.1.4 Formation	8
1.2 Dispersion et mécanismes de dégradation des hydrocarbures aromatiques dans l'environnement...10	10
1.2.1 Dispersion des hydrocarbures aromatiques dans l'air	10
1.2.2 Dispersion des hydrocarbures aromatiques au niveau du sol	13
1.2.3 Dispersion des hydrocarbures aromatiques dans l'environnement aquatique	17
1.3 Conséquences écologiques	18
1.3.1 Contamination des végétaux	18
1.3.2 Contamination de la faune terrestre.....	20
1.3.3 Conséquences sur les micro-organismes du sol	22
1.3.4 Contamination des espèces aquatiques.....	22
1.3.5 Contamination des aliments	23
1.3.5.1 Contenu en hydrocarbures aromatiques dans les fruits et les légumes.....	24
1.3.5.1.1 Contenu en BTEX dans les fruits et légumes.....	24
1.3.5.1.2 Contenu en HAP dans les fruits et légumes	25
1.3.5.2 Impact de l'emballage et du stockage sur le contenu en hydrocarbures aromatiques dans les aliments.....	28
1.3.5.3 Impact des procédés de cuisson sur le contenu en hydrocarbures aromatiques dans les aliments.....	28
1.3.5.4 Exposition humaine aux hydrocarbures aromatiques <i>via</i> l'alimentation.....	31
1.4 Exposition et métabolisme des hydrocarbures aromatiques : potentielle toxicité par voie orale	31
1.4.1 Les BTEX.....	31
1.4.1.1 Métabolisme des BTEX	31
1.4.1.2 Toxicité des BTEX chez l'Homme	32
1.4.1.3 Toxicité des BTEX chez les animaux	34
1.4.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	34
1.4.2.1 Métabolisme des HAP.....	35
1.4.2.2 Toxicité des HAP chez l'Homme.....	36

1.4.2.3 Toxicité des HAP chez l'animal.....	36
1.5 Réglementation concernant la présence d'hydrocarbures aromatiques l'eau de consommation et les aliments.....	38
1.5.1 L'eau	38
1.5.1 Les aliments	38
1.6 Méthodes de détermination des hydrocarbures aromatiques	41
1.6.1 Méthodes d'extraction.....	42
1.6.1.1 Techniques d'extraction par solvant.....	43
1.6.1.1.1 Soxhlet	43
1.6.1.1.2 Extractions liquide/liquide et solide/liquide (LLE et SLE).....	48
1.6.1.1.2.1 Extraction assistée par les ultrasons (UAE)	49
1.6.1.1.2.2 Extraction assistée par les micro-ondes (MAE)	50
1.6.1.1.2.3 Extraction par liquide pressurisé (PLE)	51
1.6.1.2 Purification.....	55
1.6.1.2.1 Extractions en phase solide (SPE).....	55
1.6.1.2.2 Chromatographie d'exclusion	58
1.6.1.3 Procédures d'évaporation de solvant.....	59
1.6.1.3.1 Concentration sous flux gazeux	59
1.6.1.3.2 Concentration par évaporateur rotatif.....	59
1.6.1.4 Techniques d'extraction avec support d'extraction miniaturisé.....	60
1.6.1.4.1 Micro-extraction en phase solide (SPME)	61
1.6.1.4.2 Extraction dynamique en phase solide (SPDE).....	67
1.6.1.4.3 Extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE)	67
1.6.1.4.4 Micro-extraction par solide compacté (MEPS).....	69
1.6.2 Séparation et détection analytique des hydrocarbures aromatiques	75
1.6.2.1 Séparation par chromatographie liquide à hautes performances (HPLC)	75
1.6.2.2 Détection après séparation en chromatographie liquide.....	76
1.6.2.2.1 Détecteur de fluorescence (FLD)	76
1.6.2.2.2 Détecteur ultraviolet-visible (UV)	79
1.6.2.2.3 Détecteur à barrettes de diode (DAD).....	79
1.6.2.2.4 Spectromètre de masse (MS).....	79
1.6.2.3 Séparation par chromatographie en phase gazeuse	80
1.6.2.3.1 Modes d'injection en chromatographie en phase gazeuse.....	80
1.6.2.3.2 Colonnes et phases stationnaires en chromatographie en phase gazeuse	81
1.6.2.4 Détection après séparation par chromatographie en phase gazeuse	83
1.6.2.4.1 Détecteur à ionisation de flamme (FID).....	83
1.6.2.4.2 Spectrométrie de masse (MS)	84

1.6.2.4.2.1 Modes d'ionisation lors du couplage avec la chromatographie en phase gazeuse.....	84
1.6.2.4.2.1.1 Ionisation électronique (EI).....	84
1.6.2.4.2.1.2 Ionisation chimique (CI)	85
1.6.2.4.2.2 Analyseurs de masse mis en œuvre lors du couplage avec la chromatographie en phase gazeuse	85
1.6.2.4.2.2.1 Quadripôle.....	85
1.6.2.4.2.2.1 Triple quadripôle et trappe ionique	85
1.6.3 Bilan sur les méthodes d'extraction et d'analyse des hydrocarbures aromatiques pour les fruits et les légumes	86
Chapitre 2 : Contexte et objectifs de l'étude.....	87
2.1 La pomme : Présentation et intérêts agricole et économique.....	87
2.1.1 La pomme : Un produit agricole local.....	90
2.1.2 Composition de la matrice pomme.....	92
2.2 L'environnement des vergers normands	96
2.3 Objectifs de la thèse	99
Chapitre 3 : Matériels et méthodes.....	102
3.1 Echantillons	102
3.2 Solvants et standards	106
3.3 Extractions.....	108
3.3.1 Matériels d'extraction	108
3.3.2 Procédures d'extraction	109
3.3.2.1 Extraction des composés volatils et semi-volatils : BTEX et HAP légers	109
3.3.2.2 Extraction des hydrocarbures aromatiques les plus lourds.....	111
3.3.2.2.1 Extraction assistée par les ultrasons couplée à une extraction sur phase solide (UAE/SPE).....	111
3.3.2.2.2 Extraction assistée par les ultrasons couplée à une micro-extraction par solide compacté (UAE/MEPS).....	114
3.4 Procédures de décontamination du matériel d'extraction et de la verrerie.....	116
3.4.1 Nettoyage de la verrerie	116
3.4.2 Nettoyage des capillaires du montage Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifold	117
3.5 Analyses par GC-MS.....	118
3.5.1 Matériel d'analyse (GC-MS).....	118
3.5.2 Procédures analytiques de séparation et de détection en GC-MS	118
3.5.2.1 Analyse des BTEX et HAP légers.....	118

3.5.2.2	Procédure de désorption complémentaire pour le conditionnement des fibres avant extraction	122
3.5.2.3	Analyse des HAP lourds	122
3.5.2.4	Programme complémentaire pour l'élimination de résidus avant et après analyse par GC-MS	124
3.5.2.5	Vérification des séparations chromatographiques	124
3.6	Validation des méthodes	125
3.6.1	Linéarité et justesse : gammes d'étalonnage	126
3.6.2	Fidélité : tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire	126
3.6.3	Sensibilité : limites de détection et de quantification (LOD et LOQ)	126
3.6.4	Analyses statistiques des données	126
3.7	Tests d'utilisation des méthodologies d'extraction	127
3.7.1	Détermination du taux de récupération après micro-extraction par solide compacté	127
3.7.2	Vérification de l'addition de HAP à une pomme entière	128
3.7.3	Essais de conservation des échantillons et des extraits	129
3.7.3.1	Congélation de broyats de pomme additionnés de BTEX en vue d'une extraction ultérieure en HS-SPME	129
3.7.3.2	Réfrigération de l'extrait après extraction assistée par les ultrasons en vue d'une purification ultérieure par micro-extraction par solide compacté	129
Chapitre 4	Hydrocarbures Aromatiques Monocycliques	131
Partie 4.1	Approches méthodologiques pour la détermination des hydrocarbures aromatiques monocycliques dans des matrices fruitières	131
4.1.1	Choix des méthodologies d'extraction, de séparation et de détection pour les hydrocarbures aromatiques monocycliques	132
4.1.1.1	Choix de la méthodologie d'extraction pour les hydrocarbures aromatiques monocycliques	132
4.1.1.2	Choix du revêtement du support d'extraction en HS-SPME	132
4.1.1.3	Choix de la méthode séparative et de la phase stationnaire	133
4.1.1.4	Choix de la méthode de détection	133
4.1.1.5	Application des méthodologies à la séparation et à la détection des hydrocarbures aromatiques monocycliques	134
4.1.2	Optimisation de la procédure de désorption de la fibre après extraction en HS-SPME	135
4.1.2.1	Données de désorption thermique en HS-SPME dans la littérature	136
4.1.2.2	Paramètres sélectionnés pour la désorption de la fibre HS-SPME	137
4.1.2.3	Application de la HS-SPME à la détermination des BTEX présents à faibles concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$) dans la pomme	138
4.1.3	Optimisation de la procédure de d'extraction en HS-SPME	141
4.1.3.1	Vérification de l'utilisation du nonane comme étalon interne pour la procédure d'extraction en HS-SPME (méthode HS-SPME 1)	141
4.1.3.2	Choix du mode de conservation pour les échantillons de pomme broyée	143

4.1.4 Validation de la <u>méthode HS-SPME 1</u> avec la pomme et la poire	147
4.1.4.1 Essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour la <u>méthode HS-SPME 1</u> avec la pomme	147
4.1.4.2 Réalisation des gammes d'étalonnage pour la <u>méthode HS-SPME 1</u> avec la pomme	148
4.1.4.3 Détermination des limites de détection et de quantification pour la <u>méthode HS-SPME 1</u> avec la pomme	150
4.1.4.4 Réalisation des droites d'étalonnage avec la <u>méthode HS-SPME 1</u> appliquée à la poire	150
4.1.4.5 Détermination des limites de détection et quantification pour la <u>méthode HS-SPME 1</u> appliquée à la poire.....	152
4.1.5 Validation de la <u>méthode HS-SPME 2</u> pour différentes matrices fruitières	152
4.1.5.1 Validation de la <u>méthode HS-SPME 2</u> avec la pomme.....	152
4.1.5.1.1 Répétabilité et fidélité intermédiaire pour la <u>méthode HS-SPME 2</u> avec la pomme.	154
4.1.5.1.2 Réalisation des gammes d'étalonnage pour la <u>méthode HS-SPME 2</u> avec la pomme	155
4.1.5.1.3 Détermination des limites de détection et de quantification pour la <u>méthode HS- SPME 2</u> avec la pomme	156
4.1.5.2 Validation de la <u>méthode HS-SPME 2</u> avec d'autres matrices fruitières	156
4.1.5.2.1 Réalisation des gammes d'étalonnage avec la <u>méthode HS-SPME 2</u> pour diverses matrices fruitières.....	157
4.1.5.2.2 Détermination des limites de détection et quantification pour la <u>méthode HS-SPME 2</u> pour diverses matrices fruitières	158
4.1.6 Mise en place et évaluation d'un nouveau support d'extraction e HS-SPME pour l'analyse des BTEX dans la pomme.....	159
4.1.6.1 Essais de revêtements PDMS pour la fibre utilisée en micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête	159
4.1.6.2 Validation du revêtement PDMS 100 µm comme support d'extraction en HS-SPME.....	160
4.1.6.3 Réalisation des gammes d'étalonnage pour la <u>méthode HS-SPME 3</u> avec la pomme	161
4.1.6.4 Détermination des limites de détection et de quantification pour la <u>méthode HS-SPME 3</u> avec la pomme	163
4.1.7 Comparaison des performances des méthodes HS-SPME avec la pomme	163
Partie 4.2 Applications à des matrices fruitières.....	169
4.2.1 Contenu en BTEX dans des pommes récoltées en Normandie	169
4.2.2 Estimation de l'apport de BTEX à travers l'ingestion des pommes récoltées.....	171
4.2.3 Estimation du contenu en BTEX dans des fruits du commerce	173
4.2.4 Détermination du contenu en BTEX dans des fruits du commerce exposés aux gaz d'échappement d'une motorisation diesel	174
4.2.5 Détermination des BTEX les pommes avant et après exposition aux fumées de combustion de biomasse.....	176
4.2.6 Conclusion.....	178

Chapitre 5 : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	179
Partie 5.1 Approches méthodologiques pour la détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans des matrices fruitières.....	179
5.1.1 Adaptation d'une méthode d'extraction des HAP dans la pomme par UAE/SPE pour leur dosage à l'état de traces (0 à 10 µg/kg).....	179
5.1.1.1 Choix de la méthodologie d'extraction pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques	179
5.1.1.2 Préparation de l'échantillon et extraction assistée par les ultrasons.....	180
5.1.1.2.1 Solvants d'extraction.....	180
5.1.1.2.2 Matériel de préparation des échantillons.....	180
5.1.1.3 Elution en SPE	181
5.1.1.3.1 Montage de purification en SPE.....	181
5.1.1.3.2 Etape d'élution en SPE.....	181
5.1.1.4 Etapes de concentration.....	183
5.1.1.5 Choix d'un étalon interne adapté à la méthodologie UAE/SPE.....	186
5.1.1.6 Séparation et détection en GC-MS.....	188
5.1.1.6.1 Introduction.....	188
5.1.1.6.2 Condition de séparation en GC-MS	189
5.1.1.6.3 Conditions de détection en GC-MS	189
5.1.2 Validation d'une stratégie combinant la HS-SPME et l'UAE/SPE pour l'extraction et la détermination des HAP à l'état de traces dans diverses matrices fruitières	190
5.1.2.1 Introduction.....	190
5.1.2.2 Validation du dosage des HAP lourds dans différentes matrices fruitières par UAE/SPE	193
5.1.2.2.1 Linéarité des HAP lourds pour une gamme de concentrations de 0 à 10 µg/kg.....	193
5.1.2.2.2 Limites de détection et de quantification des HAP lourds	195
5.1.2.3 Validation du dosage des HAP légers par HS-SPME	196
5.1.2.3.1 Séparation des HAP légers en GC-MS après extraction par HS-SPME	196
5.1.2.3.2 Choix de la fibre d'extraction en HS-SPME pour la détermination des HAP légers	197
5.1.2.3.3 Essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour la détermination des HAP légers par HS-SPME.....	199
5.1.2.3.4 Vérification de la linéarité des courbes d'étalonnage pour la détermination de HAP légers à des teneurs inférieures à 10 µg/kg par HS-SPME (méthodes HS-SPME 2 et 3)	200
5.1.2.3.5 Détermination des limites de détection et de quantification des HAP légers par HS-SPME pour différentes matrices fruitières	204
5.1.2.4 Conclusion sur les méthodes HS-SPME et UAE/SPE	207
5.1.3 Validation d'une méthodologie de dosage rapide des HAP dans les pommes par UAE/MEPS	208
5.1.3.1 Optimisation de la procédure d'extraction des HAP par MEPS dans la pomme	208
5.1.3.1.1 Sélection du support d'extraction MEPS	208

5.1.3.1.2	Reproductibilité des résultats avec différents supports de type PEP pour l'extraction en MEPS	210
5.1.3.1.3	Détermination du volume d'extrait à prélever pour l'extraction en MEPS	211
5.1.3.1.4	Détermination des conditions d'élution optimales pour l'extraction en MEPS	213
5.1.3.1.5	Taux de récupération des HAP par UAE/MEPS et vérification méthodologique	215
5.1.3.1.6	Test de conservation de l'extrait UAE pour extraction différée en MEPS.....	217
5.1.3.2	Validation du dosage des HAP par UAE/MEPS et comparaison avec la stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE.....	219
5.1.3.2.1	Essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire	219
5.1.3.2.2	Réalisation de l'étalonnage pour le dosage de HAP dans la pomme par UAE/MEPS	220
5.1.3.2.3	Détermination des limites de détection et de quantification pour le dosage des HAP dans la pomme par UAE/MEPS.....	223
5.1.3.2.4	Comparaison de la méthodologie UAE/MEPS avec la stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE.....	224
Partie 5.2	Applications à des matrices fruitières	226
5.2.1	Détermination des HAP dans des pommes récoltées en Normandie	226
5.2.2	Estimation de l'ingestion de HAP à travers la consommation des pommes récoltées en Normandie	230
5.2.3	Estimation du contenu en HAP dans les fruits et produits à base de fruits du commerce	233
5.2.3.1	Détermination des HAP dans les fruits du commerce	233
5.2.3.2	Détermination des HAP dans des produits à base de pomme du commerce	235
5.2.4	Détermination des HAP dans des fruits exposés aux émissions de gaz de moteur diesel	237
5.2.5	Détermination des HAP dans des pommes exposées à des fumées issues de la combustion de biomasse.....	238
5.2.6	Conclusion sur la présence de HAP dans les pommes	242
Conclusions et perspectives	243	
Valorisation	247	
Références.....	248	

Liste de figures

Figure 1 : Structure des BTEX (a) et des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques prioritaires de la liste de l'US-EPA (b)

Figure 2 : Pyrosynthèse du benzène à partir de l'éthane (Ravindra, 2008)

Figure 3 : Formation du benzène par polymérisation de l'acétylène

Figure 4 : Formation du pyrène par combinaison de l'acétylène avec le radical phénanthrène

Figure 5 : Formation du naphthalène par pyrolyse à partir du phénol (Sharma, 2003)

Figure 6 : Composés de dégradation obtenus après réaction de l'acénaphthylène avec un radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), l'ozone (O_3) ou le radical nitrate ($\bullet\text{NO}_3$) (Zhou, 2013)

Figure 7 : Devenir des hydrocarbures aromatiques dans l'atmosphère

Figure 8 : Devenir des hydrocarbures aromatiques au niveau du sol

Figure 9 : Cis-dihydrodiols et composés aromatiques dihydroxylés formés après oxydation du naphthalène et du phénanthrène

Figure 10 : Evolution du contenu en HAP ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en fonction du mode de cuisson

Figure 11 : Evolution du contenu en HAP ($\mu\text{g}/\text{kg}$) des épinards et des pommes de terre après cuisson par ébullition

Figure 12 : Formation du benzène à partir du benzoate de sodium (mécanisme proposé par Gardner et Laurence, 1993)

Figure 13 : Métabolisme du benzène

Figure 14 : Métabolisme du naphthalène

Figure 15 : Schéma d'un appareillage de soxhlet

Figure 16 : Principe d'une extraction en phase solide (SPE) avec rétention des analytes

Figure 17 : Principe de la chromatographie d'exclusion

Figure 18 : Principe de l'évaporateur rotatif

Figure 19 : Comparaison des supports d'extraction miniaturisés

Figure 20 : Principe de la micro-extraction en phase solide (SPME)

Figure 21 : Principe de l'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE)

Figure 22 : Chromatogrammes obtenus par Purcaro *et al.* (2009) en HPLC-FLD pour des échantillons de viandes fumées contenant des HAP (conditions d'excitation et d'émission présentées dans le tableau)

Figure 23 : Chromatogramme obtenus par chromatographie en phase gazeuse présentant la séparation du benzo(*b*)fluoranthène (BbF), du benzo(*j*)fluoranthène (BjF) et du benzo(*k*)fluoranthène (BkF) avec trois phases stationnaires différentes : (a) Colonne Optima® δ -6 (longueur 30 m, 0,25 mm i.d., épaisseur de film 0,25 μm), (b) colonne DB-5MS (60 m, 0,25 mm i.d., 0,25 μm), (c) colonne DB-17MS (60 m, 0,25 mm i.d., 0,25 μm) (Gómez-Ruiz, 2009b)

Figure 24 : Diagrammes représentant les principales sources de contamination aux HAP (benzo(*a*)anthracène, chrysène, benzo(*b*)fluoranthène, benzo(*k*)fluoranthène, benzo(*a*)pyrène, indéno(1,2,3-*cd*)pyrène, dibenzo(*ah*)anthracène, benzo(*ghi*)perylène) chez l'Homme (Menzie, 1992)

Figure 25 : Evolution de la surface dédiée aux vergers de pommiers et de la quantité de pommes produites en France entre 1994 et 2014 (source Food and Agriculture Organization of the United Nations)

Figure 26 : Quantité de pommes de table (en milliers de tonnes) récoltée par les principales régions productrices française en 2014 (Source Agreste, France AgriMer)

Figure 27 : Schéma général d'une pomme (source Formation en Biologie Végétale)

Figure 28 : Structure de la cuticule (Murtic, 2012)

Figure 29 : Structure chimique de l'acide ursolique

Figure 30 : Structure chimique de l' α -farnésène

Figure 31 : Répartition des émissions de COV NM (en kg) par commune en 2010 (Données SISTER, 2010)

Figure 32 : Localisation des sites de prélèvements (points rouges) des pommes en Normandie

Figure 33 : Photographies de quelques sites de prélèvement dans des pommiers normands

Figure 34 : Montage utilisé pour l'exposition intentionnelle des fruits (30 min) aux gaz d'échappement diesel

Figure 35 : Produits industriels à base de pomme

Figure 36 : Schéma de la procédure d'extraction par micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME)

Figure 37 : Bain à ultrasons thermostaté à 30 °C utilisé pour l'extraction assistée par les ultrasons (UAE)

Figure 38 : Schéma de la procédure de purification par extraction sur phase solide (SPE)

Figure 39 : Schéma représentant un micro-tube en verre de 1,5 mL dans lequel est introduit un micro-insert en verre de 200 μ L

Figure 40 : Schéma de la procédure de purification de l'extrait obtenu après extraction assistée par les ultrasons (UAE) par micro-extraction par solide compacté (MEPS) constitué d'un polymère PEP

Figure 41 : Photographie de la partie supérieure du montage Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco) présentant les valves de contrôle du flux ainsi que les capillaires en polytétrafluoroéthylène (PTFE)

Figure 42 : Chromatographe en phase gazeuse (GC) et spectromètre de masse quadripolaire (qMS) utilisés pour l'analyse des extraits contenant des HAP et des BTEX

Figure 43 : Programme de température initialement utilisé pour l'analyse des extraits obtenus avec la méthode HS-SPME 1 en GC-MS

Figure 44 : Programme de température du four de la GC pour l'analyse des extraits obtenus avec les méthodes HS-SPME 1, 2 et 3

Figure 45 : Programme de température initial de la GC pour l'analyse des extraits obtenus avec la méthode UAE/SPE 1

Figure 46 : Programme de température de la GC pour l'analyse des extraits obtenus avec les méthodes UAE/SPE 2 et UAE/MEPS

Figure 47 : Calcul du facteur d'asymétrie

Figure 48 : Illustration de la procédure d'addition de HAP à une pomme entière

Figure 49 : Chromatogramme obtenu (entre 11 et 27 min) en GC-qMS après injection directe d'une solution de BTEX

Figure 50 : Chromatogramme obtenu lors de la désorption de la fibre dans l'insert de la GC-MS (blanc)

Figure 51 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS après analyse d'une nouvelle fibre HS-SPME (CAR/PDMS 75 μ m) exposée à une pomme additionnée de BTEX à 4 μ g/kg

Figure 52 : Optimisation des paramètres de désorption de la fibre d'extraction

Figure 53 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS avec la méthode HS-SPME 1 pour une pomme additionnée de BTEX à 10 µg/kg et de nonane à 500 µg/kg

Figure 54 : Comparaison des aires relatives obtenues en HS-SPME pour une pomme additionnée de BTEX à 4 µg/kg dans différentes conditions de conservation

Figure 55 : Comparaison des aires brutes obtenues en HS-SPME pour une pomme additionnée de BTEX à 4 µg/kg dans différentes conditions de conservation

Figure 56 : Droites d'étalonnage pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 1

Figure 57 : Droites d'étalonnage pour les BTEX dans la poire avec la méthode HS-SPME 1

Figure 58 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS après l'analyse des BTEX à 10 µg/kg dans la pomme avec la méthode HS-SPME 2

Figure 59 : Droites d'étalonnage pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 2

Figure 60 : Droites d'étalonnage pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 3

Figure 61 : Diagramme en radar comparatif des performances des méthodes HS-SPME pour la détermination des BTEX dans les échantillons de pomme

Figure 62 : Récupération et variabilité du contenu en HAP après élution de fraction de 12 et 21 mL en SPE

Figure 63 : Récupération et variabilité du contenu en HAP en aires relatives après concentration d'une solution par évaporateur rotatif ou sous flux d'azote afin d'obtenir une concentration finale de 80 µg/L

Figure 64 : Récupération et variabilité du contenu en HAP en aires brutes après concentration d'une solution par évaporateur rotatif ou sous flux d'azote afin d'obtenir une concentration finale de 80 µg/L

Figure 65 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS pour une pomme additionnée en HAP à 10 µg/kg extraits de la pomme avec la méthode UAE/SPE 2

Figure 66 : Droites d'étalonnage pour le benzo(*ghi*)perylène, benzo(*b*)fluoranthène, chrysène, pyrène réalisées avec la méthode UAE/SPE 2 pour des ajouts compris entre 0 et 10 µg/kg à une pomme

Figure 67 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS avec la méthode HS-SPME 2 pour un échantillon de pomme additionné en HAP et BTEX à 10 µg/kg

Figure 68 : Droites d'étalonnage réalisées avec la pomme pour des ajouts compris entre 0 et 10 µg/kg pour les 4 HAP les plus légers (méthode HS-SPME 2)

Figure 69 : Droites d'étalonnage réalisées avec la pomme pour les HAP légers entre 0 et 10 µg/kg extraits avec la méthode HS-SPME 3

Figure 70 : Evolution de l'aire relative des pics de quelques HAP en fonction du volume d'extrait prélevé en MEPS

Figure 71 : Droites d'étalonnage pour le pyrène, le benzo(*b*)fluoranthène, le chrysène et le benzo(*ghi*)perylène réalisée dans la pomme additionnée en HAP entre 0 et 10 µg/kg avec la méthode UAE/MEPS

Liste des tableaux

Tableau 1 : Données physico-chimiques sur les BTEX et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (16 HAP de la liste de polluants prioritaire établie par l'US-EPA)

Tableau 2 : Exemples de ratios utilisés pour déterminer la provenance des HAP (Tobiszewski, 2012)

Tableau 3 : Effets toxiques des BTEX chez l'Homme

Tableau 4 : Données de toxicité aiguë pour l'absorption des hydrocarbures aromatiques monocycliques par voie orale

Tableau 5 : Données de toxicité aiguë pour l'absorption des hydrocarbures aromatiques polycycliques par voie orale

Tableau 6 : Teneurs maximales (ML) pour le benzo(a)pyrène (Règlement CE n°208/2005)

Tableau 7 : Facteurs d'équivalence toxique (TEF) pour les HAP prioritaires défini par l'US-EPA (Nisbet, 1992)

Tableau 8 : Applications de la méthode soxhlet pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques dans des matrices environnementales et alimentaires

Tableau 9 : Constantes diélectriques pour quelques solvants usuels

Tableau 10 : Applications des méthodes d'extraction par solvant pour la récupération des hydrocarbures aromatiques dans des matrices environnementales et alimentaires

Tableau 11 : Applications de la micro-extraction en phase solide (SPME) pour la récupération des hydrocarbures aromatiques dans des échantillons environnementaux et alimentaires

Tableau 12 : Applications de la micro-extraction par solide compacté (MEPS) pour la récupération des hydrocarbures aromatiques dans des échantillons d'eau

Tableau 13 : Applications de la micro-extraction par solide compacté (MEPS) pour la récupération d'analytes dans des matrices solides

Tableau 14 : Quantité de pommes de bouche récoltées par variétés en France en 2015

Tableau 15 : Variétés de pommiers à cidre recommandées dans le Calvados, la Manche et l'Orne par l'arrêté du 16 juin 1958 du Ministère de l'Agriculture

Tableau 16 : Principaux constituants de la pomme (données pour 100 g de fruit)

Tableau 17 : Distribution des composés organiques volatils non méthaniques émis en Normandie selon les secteurs d'activité (Données SISTER, 2010)

Tableau 18 : Emission de benzène et de benzo(a)pyrène à Caen et à Cherbourg en 2008 et pourcentage de répartition en fonction des activités productrices (données 2008, ATMO Normandie)

Tableau 19 : Rapports m/z des ions isolés en mode SIM pour la détection des BTEX et HAP

Tableau 20 : Programme initial des rapports m/z balayés lors de l'analyse des extraits obtenus avec la méthode HS-SPME 1

Tableau 21 : Programme des rapports m/z balayés lors de l'analyse des extraits obtenus avec les méthodes HS-SPME 1, 2 et 3

Tableau 22 : Programme des rapports m/z balayés lors de l'analyse des extraits obtenus avec les méthodes UAE/SPE 2 et UAE/MEPS

Tableau 23 : Etalons interne utilisés pour chaque méthode d'extraction

Tableau 24 : Evaluation de l'étape de conditionnement (30 min, 250 °C) sur la présence des BTEX sur la fibre SPME de type CAR/PDMS

Tableau 25 : Effet de la modification des conditions de désorption sur l'efficacité chromatographique (nombre de plateaux) et sur le facteur d'asymétrie des pics de BTEX

Tableau 26 : Aires brutes du nonane (500 µg/kg) en présence ou absence de dichlorométhane

Tableau 27 : Coefficients de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire des BTEX avec la méthode HS-SPME 1

Tableau 28 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 1

Tableau 29 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans la poire avec la méthode HS-SPME 1

Tableau 30 : Coefficients de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire des BTEX avec la méthode HS-SPME 2

Tableau 31 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 2

Tableau 32 : Comparaison des données de linéarité obtenues dans les différentes matrices fruitières avec la méthode HS-SPME 2

Tableau 33 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans les différentes matrices fruitières avec la méthode HS-SPME 2

Tableau 34 : Comparaison des aires brutes obtenues après extraction des BTEX d'une pomme polluée à 10 µg/kg avec la méthode HS-SPME 2 utilisant des revêtements de fibres différents

Tableau 35 : Coefficients de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire des BTEX avec la méthode HS-SPME 3

Tableau 36 : Données de linéarité obtenues pour les BTEX de 0 à 10 µg/kg dans la pomme avec la méthode HS-SPME 3

Tableau 37 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 3

Tableau 38 : Comparaison des performances des différentes méthodes développées pour l'analyse des BTEX dans la pomme par HS-SPME

Tableau 39 : Estimation du contenu en BTEX dans des pommes récoltées en Normandie

Tableau 40 : Quantité de BTEX (en nanogrammes) susceptible d'être ingérée lors de la consommation d'une pomme de 150 g récoltée en Normandie

Tableau 41 : Estimation du contenu en BTEX dans divers fruits du commerce

Tableau 42 : Contenu en BTEX (µg/kg masse fraîche) dans les fruits après 30 minutes d'exposition aux échappements diesel (n=3)

Tableau 43 : Estimation du contenu en BTEX dans les pommes du commerce après 1 h d'exposition aux fumées de combustion de biomasse

Tableau 44 : Prélèvement du dichlorométhane (DCM) avec différentes micro-seringues

Tableau 45 : Coefficients de variation (CV %) pour les essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire réalisés à 4 µg/kg avec la pomme pour les méthodes UAE/SPE

Tableau 46 : Données de linéarité pour les HAP légers entre 0 et 10 µg/kg avec la méthode UAE/SPE 2

Tableau 47 : Temps de rétention et ions utilisés pour la détection des HAP ciblés par les différentes méthodologies

Tableau 48 : Données de linéarité obtenues pour les HAP lourds avec la méthode UAE/SPE 2 pour différentes matrices fruitières

Tableau 49 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) obtenus pour les HAP lourds avec la méthode UAE/SPE 2 pour différentes matrices fruitières (µg/kg de masse fraîche)

Tableau 50 : comparaison des aires brutes obtenues après HS-SPME, pour un échantillon de pomme additionné en HAP légers à 10 µg/kg, avec des fibres ayant différents revêtements CAR/PDMS 75 µm, PDMS 30 µm et PDMS 100 µm

Tableau 51 : Coefficients de variation (CV %) des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire obtenus pour les méthodes HS-SPME avec les HAP légers introduits à 4 µg/kg dans des pommes du commerce

Tableau 52 : Données de linéarité pour les HAP légers extraits à partir de différentes matrices fruitières avec la méthode HS-SPME 2

Tableau 53 : Données de linéarité obtenues pour des ajouts en HAP entre 0 et 10 µg/kg dans la pomme avec les méthodes HS-SPME 2 et HS-SPME 3

Tableau 54 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour les HAP légers avec la méthode HS-SPME 2 dans différentes matrices fruitières en µg/kg de masse fraîche

Tableau 55 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) déterminées pour les HAP légers dans la pomme

Tableau 56 : Stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE : meilleures performances pour la détermination des HAP dans la pomme

Tableau 57 : Comparaison des supports MEPS C18 et PEP pour la récupération des HAP dans la pomme

Tableau 58 : Comparaison des résultats obtenus en MEPS avec 3 supports PEP

Tableau 59 : Comparaison des aires brutes obtenues en MEPS après élution avec l'heptane et le dichlorométhane

Tableau 60 : Comparaison des aires brutes obtenues avec différents volumes d'élution en MEPS et d'injection en GC/MS

Tableau 61 : Estimation du pourcentage de HAP récupéré avec la méthode UAE/MEPS

Tableau 62 : Estimation du niveau en HAP dans une pomme contaminée (2,67 µg/kg)

Tableau 63 : Résultats (en aires relatives) des essais de conservation des extraits UAE pour extraction différée en MEPS

Tableau 64 : Coefficients de variation (CV %) des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour la détermination des HAP dans la pomme par UAE/MEPS

Tableau 65 : Données de linéarité en UAE/MEPS pour des ajouts en HAP entre 0 et 10 µg/kg dans la pomme et comparaison avec les performances de la méthode combinant la HS-SPME et l’UAE/SPE

Tableau 66 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour les HAP dans la pomme en UAE/MEPS

Tableau 67 : Détermination du contenu en HAP dans des pommes récoltées en Normandie (µg/kg masse fraîche)

Tableau 68 : Estimation de la quantité en HAP ingérée (en ng) lors de la consommation d’une pomme de 150 g

Tableau 69 : Estimation du contenu en HAP dans des fruits provenant du commerce

Tableau 70 : Contenu en HAP (µg/kg masse fraîche) dans les différents fruits après 30 minutes d’exposition aux émissions diesel (n=3)

Tableau 71 : Contenu en HAP dans la pomme entière, la peau et la chair exposées ou non aux fumées de combustion des végétaux

Tableau 72 : Contenu en HAP dans la peau et la chair de pommes dans différentes conditions d’exposition aux fumées de combustion de biomasse

Liste des abbréviations

ACN : Acétonitrile

ACP : Acénaphthène

ACY : Acénaphtylène

Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

ANT : Anthracène

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique

APPI : Photoionisation à pression atmosphérique

ASE : Extraction accélérée par solvant

BaA : Benzo(*a*)anthracène

BaP : Benzo(*a*)pyrène

BbFA : Benzo(*b*)fluoranthène

BghiIP : Benzo(*ghi*)perylène

BjFA : Benzo(*j*)fluoranthène

BkFA : Benzo(*k*)fluoranthène

BTEX : Benzène, toluène, éthylbenzène, xylène

Car : Carbowax

CAR : Carboxen

CHR : Chrysène

CI : Ionisation chimique

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

COV : Composés organiques volatils

CPcdP : Cyclopenta(*cd*)pyrène

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DAD : Détecteur à barrettes de diodes

DBahA : Dibenzo(*ah*)anthracène

DCM : Dichlorométhane

DI-SPME : Micro-extraction en phase solide par immersion directe

DVB : Divinylbenzène

d.w. : Poids sec

EI : Ionisation électronique

ESI : Ionisation par électrospray

FA : Fluoranthène

FAB : Bombardement par atomes rapides

FID : Détecteur à ionisation de flamme

FLD : Détecteur de fluorescence

FLR : Fluorène

FT-ICR : Résonance cyclotronique ionique par transformée de Fourier

GC : Chromatographie en phase gazeuse

GPC : Chromatographie par perméation de gel

HAM : Hydrocarbure(s) aromatique(s) monocyclique(s)

HAP : Hydrocarbure(s) aromatique(s) polycyclique(s)

HPLC : Chromatographie liquide à hautes performances

HS-SPME : Micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête

IARC : International Agency for Research on Cancer

i.d. : Diamètre interne

IP : Indéno(1,2,3-*cd*)pyrène

itMS : Spectromètre de masse à trappe ionique

Koc : coefficient de partage carbone organique/eau

Kow : coefficient de partage octanol/eau

LD50 : Dose létale pour 50 % d'une population

LLE : Extraction liquide-liquide

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

LVI : Injection à large volume

MAE : Extraction assistée par les micro-ondes

MALDI : Désorption-ionisation laser assistée par matrice

MASE : Extraction par solvant assistée par une membrane

MEPS : Micro-extraction par solide compacté

MM : Masse moléculaire

MS : Spectromètre de masse

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

NO_x : Oxydes d'azote

NPH : Naphthalène

PA : Polyacrylate

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PEP : Polar enhanced polymer

PER : Pérylène

PHE : Phénanthrène

PLE : Extraction par liquide sous pression

POP : Polluants organiques persistants

PS-DVB : Polystyrène/divinylbenzène

PTV : Vaporisation par température programmée

PYR : Pyrène

qMS : Spectromètre de masse quadripolaire

QqQ : Triple quadripôle

rpm : Rotation par minute

RT : Température ambiante

SBSE : Extraction par sorption sur barreau magnétique

SFE : Extraction par fluide supercritique

SIM : Mode de sélection d'ion

SLE : Extraction solide-liquide

SPDE : Extraction dynamique en phase solide

SPE : Extraction en phase solide

SPME : Micro-extraction en phase solide

TEF : Facteur d'équivalence toxique

TEQ : Quantité équivalente toxique

TOF : Analyseur de masse à temps de vol

t_R : Temps de rétention

UHPLC : Chromatographie liquide à ultra hautes performances

UAE : Extraction assistée par les ultrasons

US-EPA : Agence de protection de l'environnement américaine

UV : Détecteur ultraviolet-visible

w.w. : Masse fraîche

Introduction générale

Les activités humaines fixes, telles que le chauffage ou les industries, mais aussi les activités mobiles avec le trafic routier, fluvial et aérien sont les principales responsables du rejet d'hydrocarbures aromatiques dans l'atmosphère. Ces polluants sont ensuite largement distribués dans l'ensemble des compartiments environnementaux : l'air, l'eau, les sédiments, le sol et les plantes, entraînant ainsi une contamination des espèces aquatiques et terrestres. La mise en place de dispositifs de surveillance des hydrocarbures aromatiques dans l'environnement est donc nécessaire.

Chez l'Homme, certains hydrocarbures aromatiques sont associés à des excès de cancer après exposition par inhalation. Cependant, bien que la toxicité des hydrocarbures aromatiques soit généralement reconnue par inhalation, l'impact de ces composés absorbés à travers l'alimentation reste globalement méconnu et assez peu étudié. Le benzo(*a*)pyrène est, par exemple, le seul hydrocarbure aromatique à faire l'objet d'une réglementation dans les produits alimentaires.

L'objectif du travail de thèse vise donc à développer les connaissances sur le niveau de contamination des hydrocarbures aromatiques dans les pommes, sélectionnées comme aliment d'étude.

Le premier chapitre de ce document propose, tout d'abord, une présentation générale des hydrocarbures aromatiques puis, traite de la dispersion de ces composés dans l'environnement. Ce chapitre étudie ensuite la présence des hydrocarbures aromatiques dans les aliments et particulièrement leur contenu dans les fruits et les légumes. Après avoir présenté la toxicité potentielle des hydrocarbures aromatiques *via* l'alimentation, les différentes méthodes d'extraction et d'analyse disponibles dans la littérature pour la détermination de ces composés sont passées en revue.

Le second chapitre est consacré aux détails du contexte de l'étude à travers la présentation du principal fruit investigué qui est la pomme, ainsi que de l'environnement des vergers en Normandie. Une présentation des objectifs du travail de thèse est également apportée à la fin de ce chapitre.

Le troisième chapitre présente le matériel ainsi que les conditions opératoires des différentes techniques d'extraction et d'analyse permettant la détection et la quantification des hydrocarbures aromatiques dans les fruits.

Le quatrième chapitre, consacré aux hydrocarbures aromatiques monocycliques (BTEX), aborde dans une première partie les méthodologies mises en œuvre pour la détermination de ces composés dans la pomme mais également dans d'autres fruits : la poire, la prune et le raisin. Le choix des méthodes d'extraction et d'analyse est tout d'abord discuté puis, le

processus d'optimisation est détaillé. Les performances des méthodologies optimisées sont finalement présentées et comparées entre elles ainsi qu'avec les données de la littérature.

Dans une seconde partie, les méthodes sont appliquées à la détermination des hydrocarbures aromatiques monocycliques dans des matrices fruitières. Ainsi, le contenu en BTEX dans des fruits (pomme, poire, prune et raisin) provenant d'un supermarché et dans des pommes récoltées en Normandie est évalué. Les BTEX résultants d'expositions aux fumées de combustion de biomasse et aux gaz d'échappement d'un moteur diesel sont également quantifiés.

Le cinquième chapitre, reprend la même structure que le chapitre précédent et présente les résultats obtenus pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Enfin, le sixième et dernier chapitre fait office de conclusion générale des travaux de thèse et propose des perspectives au regard du potentiel des méthodologies optimisées.

Chapitre 1 : Introduction Bibliographique

Chapitre 1 : Introduction Bibliographique

La pollution atmosphérique représente une préoccupation mondiale majeure à cause du réchauffement climatique observé depuis le début du XX^{ème} siècle, mais aussi en raison du lien établi entre les polluants atmosphériques et de nombreux problèmes de santé tels que des problèmes respiratoires, cardiovasculaires ou encore neurologiques (Curtis, 2006). Même si la qualité de l'air tend à s'améliorer en Europe depuis les années 1980, la pollution atmosphérique reste une cause importante de morbidité et de surmortalité (Elichegaray, 2010). La plus grande partie des polluants retrouvés dans l'atmosphère est d'origine anthropique. En effet, les activités humaines fixes : chauffage, industries, agriculture... et mobiles : trafic automobile, fluvial et aérien entraînent le rejet de nombreux polluants sous forme gazeuse tels que le monoxyde de carbone (CO) et les oxydes d'azotes (NOx) mais aussi dans la phase particulaire comme les métaux. L'agence de protection de l'environnement américaine (US-EPA) a établi une liste de polluants prioritaires à surveiller dans les échantillons environnementaux (US-EPA, dernière mise à jour décembre 2014). 16 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ainsi que 3 composés monocycliques (benzène, toluène et éthylbenzène) figurent dans cette liste. Les hydrocarbures aromatiques sont des composés ubiquitaires associés à des excès de cancer chez les personnes les ayant inhalés. Cette introduction bibliographique cible plus particulièrement ces hydrocarbures aromatiques et va dans un premier temps être consacrée à la présentation de leurs principales caractéristiques (structure, propriétés physico-chimiques, origine, sources et formation). La dispersion des hydrocarbures aromatiques dans les différents compartiments de l'environnement ainsi que les conséquences écologiques engendrées par leur présence seront, dans un second temps, abordées. La contamination des aliments et la toxicité de ces composés par voie orale sera ensuite évoquée. Enfin, la dernière partie de cette introduction bibliographique traitera des différentes méthodes d'extraction et d'analyse des hydrocarbures aromatiques.

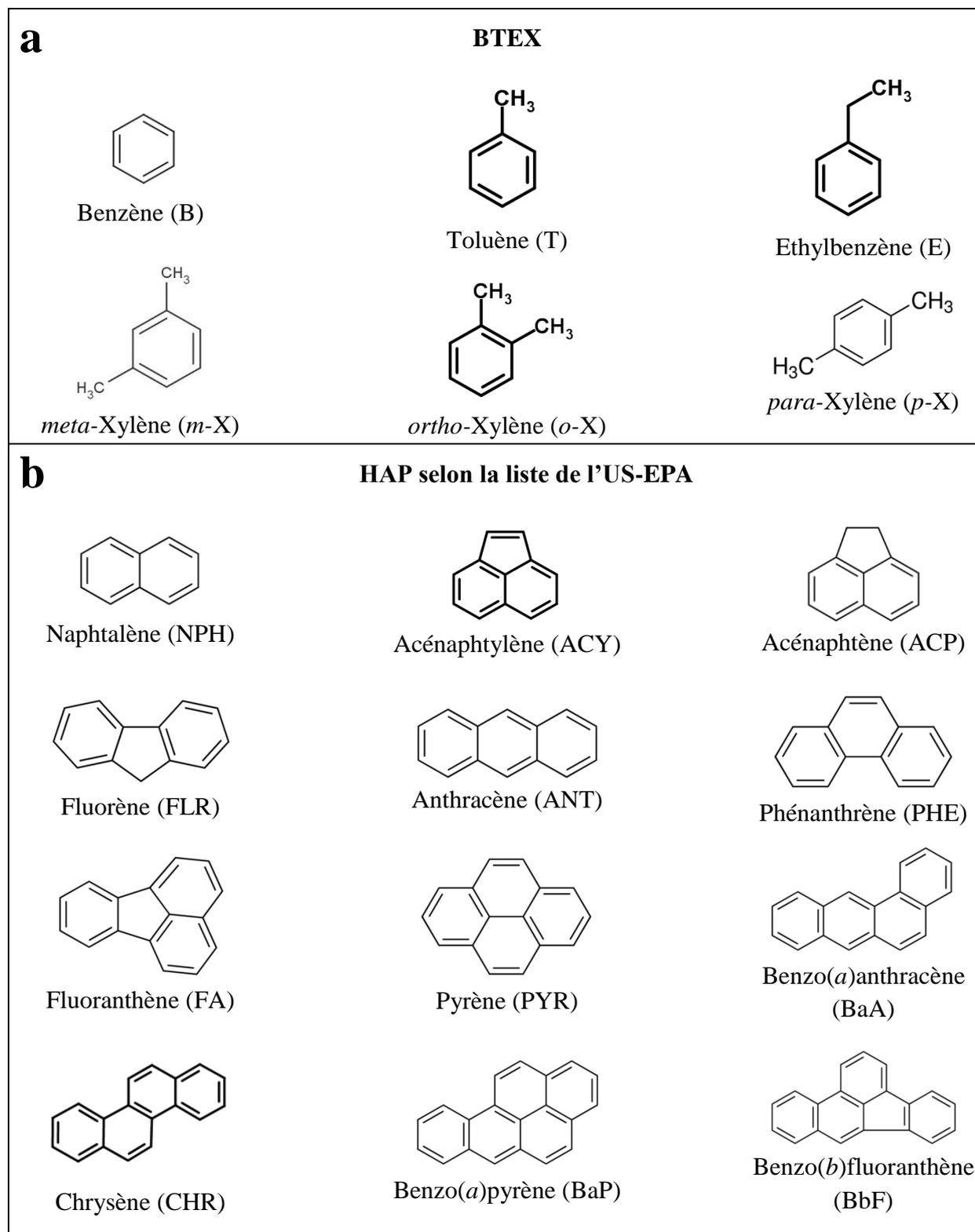
1.1. Présentation des hydrocarbures aromatiques

Il existe un très grand nombre d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (plus de 1000) mais les 16 de la liste de l'US-EPA établissant les polluants prioritaires à surveiller seront plus particulièrement abordés. Ces HAP possèdent au minimum 2 cycles aromatiques et peuvent en comporter jusqu'à 6 ou plus. En ce qui concerne les hydrocarbures aromatiques monocycliques, ils regroupent le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes (BTEX). Les diméthylbenzènes également appelés xylènes se composent de trois isomères (méta, ortho et para).

1.1.1. Structure et propriétés

Les hydrocarbures aromatiques sont composés d'atomes de carbone et d'hydrogène formant un ou plusieurs cycles insaturés. Les BTEX comportent un seul cycle aromatique tandis que

les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont constitués d'au moins deux cycles benzéniques (figure 1).



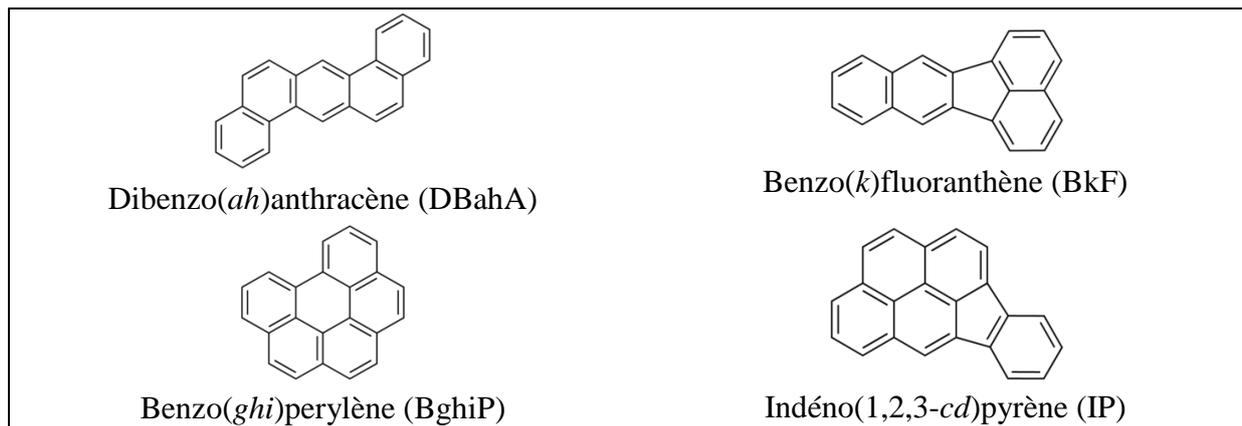


Figure 1 : Structure des BTEX (a) et des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques prioritaires de la liste de l'US-EPA (b)

Les hydrocarbures aromatiques sont des composés lipophiles et possèdent une bonne solubilité dans les solvants organiques et sont faiblement solubles dans l'eau. Le benzène est, par exemple, 4 fois moins soluble dans l'eau que l'hexan-1-ol, 7 fois moins que l'acide hexanoïque et 54 fois moins que la cyclohexanone. Parmi les hydrocarbures aromatiques, les BTEX sont des composés plus volatils et plus solubles dans l'eau que les HAP. Le benzène est le composé le plus soluble dans l'eau, avec une solubilité de $1,6 \times 10^3$ mg/L. La présence supplémentaire de groupements carbonés au noyau benzénique entraîne une diminution de la solubilité des composés. L'acénaphthylène, comportant 3 cycles aromatiques, a une solubilité dans l'eau de 3,9 mg/L contre $5,7 \times 10^{-3}$ mg/L pour le benzo(*a*)anthracène qui possède 4 cycles (tableau 1). Certains HAP possèdent le même nombre de cycle benzénique mais leur différence de configuration leur confère des propriétés différentes. La solubilité des HAP dans l'eau varie notamment en fonction de la complexité de leur structure moléculaire.

Les pressions de vapeur élevées des BTEX expliquent en partie leur forte volatilité (tableau 1). Comme pour la solubilité, la présence de groupements carbonés supplémentaires diminue la pression de vapeur du composé, ce qui réduit sa capacité à se volatiliser. Les HAP sont quant à eux assez peu volatils. Le naphthalène qui est le HAP le plus volatil possède une pression de vapeur 80 à 1200 fois inférieure à celles des BTEX (tableau 1). Néanmoins, les HAP légers, de masse moléculaire inférieure ou égale à 178 g/mol, sont considérés comme plus volatils (avec des pressions de vapeur supérieures à $2,3 \times 10^{-3}$ Pa) que les HAP lourds ($MM \geq 202$ g/mol) dont les pressions de vapeur sont inférieures à $6,7 \times 10^{-4}$ Pa (tableau 1). Les HAP possèdent une importante capacité à se lier à la matière organique. Cette propension est exprimée par un coefficient de partage carbone organique/eau (K_{oc}) élevé (tableau 1). Le caractère lipophile des hydrocarbures aromatiques est estimé par le coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}). Ces deux propriétés sont liées à la masse moléculaire du composé considéré (tableau 1, INERIS 2005 ; Skupinska 2004).

Tableau 1 : Données physico-chimiques sur les BTEX et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (16 HAP de la liste de polluants prioritaire établie par l'US-EPA)

BTEX et HAP	Abbréviation	Masse moléculaire (g/mol)	CAS N°	Nombre de cycles	Solubilité dans l'eau ^{ab} à 25 °C (mg/L)	log Kow ^a	Log Koc ^a	Pression vapeur ^a (Pa)
Benzène	B	78	71-43-2	1	1,6 10 ³ c	2,13a	1,81a	1,3 10 ⁴ (25 °C)c
Toluène	T	92	108-88-3	1	5,2 10 ² c	3,34a	3,04a	3,8 10 ³ (25 °C)c
Ethylbenzène	E	106	100-41-4	1	1,7 10 ² c	2,79a	2,48a	1,3 10 ³ (25 °C)c
<i>meta</i> -Xylène	<i>m</i> -X	106	108-38-3	1	1,6 10 ² c	3,20d	2,22e	1,1 10 ³ (25 °C)c
<i>para</i> -Xylène	<i>p</i> -X	106	106-42-3	1	1,6 10 ² c	3,15d	2,31e	1,2 10 ³ (25 °C)c
<i>ortho</i> -Xylène	<i>o</i> -X	106	95-47-6	1	1,8 10 ² c	3,12d	2,11e	8,8 10 ² (25 °C)c
Naphtalène	NPH	128	91-20-3	2	3,2 10 ¹	3,29a	2,97a	1,1 10 ¹ (25 °C)
Acénaphthylène	ACY	152	208-96-8	3	3,9	3,72a	3,39a	3,9 10 ⁰ (20 °C)
Acénaphthène	ACP	154	83-32-9	3	3,4	3,98a	3,66a	2,1 10 ⁻¹ (25 °C)
Fluorène	FLR	166	86-73-7	3	1,7	4,18a	3,86a	8,6 10 ⁻² (25 °C)f
Anthracène	ANT	178	120-12-7	3	4,5 10 ⁻²	4,45a	4,15a	2,3 10 ⁻³ (25 °C)
Phénanthrène	PHE	178	85-01-8	3	1,0	4,45a	4,15a	1,3 10 ⁻¹ (25 °C)
Fluoranthène	FA	202	206-44-0	4	2,1 10 ⁻¹	4,90a	4,58a	6,7 10 ⁻⁴ (25 °C)
Pyrène	PYR	202	129-00-0	4	1,3 10 ⁻¹	4,90a	4,58a	3,3 10 ⁻⁴ (25 °C)
Benz(a)anthracène	BaA	228	56-55-3	4	5,7 10 ⁻³	5,61a	5,30a	2,9 10 ⁻⁶ (20 °C)
Chrysène	CHR	228	218-01-9	4	1,8 10 ⁻³	5,61a	5,30a	8,4 10 ⁻⁷ (25 °C)
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	BbF	252	205-99-2	5	1,4 10 ⁻²	6,06a	5,74a	6,7 10 ⁻⁵ (20 °C)
Benzo(<i>k</i>)fluoranthène	BkF	252	207-08-9	5	4,3 10 ⁻³	6,06a	5,74a	6,7 10 ⁻⁵ (20 °C)
Benzo(<i>a</i>)pyrène	BaP	252	50-32-8	5	3,8 10 ⁻³	6,06a	6,74a	7,5 10 ⁻⁷ (25 °C)
Indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	IP	276	193-39-5	6	5,3 10 ⁻⁴	6,50a	6,20a	1,3 10 ⁻⁸ (20 °C)
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	BghiP	276	191-24-2	6	2,6 10 ⁻⁴	6,50a	6,20a	1,4 10 ⁻⁸ (25 °C)
Dibenz(<i>ah</i>)anthracène	DBahA	278	53-70-3	5	5,0 10 ⁻⁴	6,84a	6,52a	1,3 10 ⁻⁸ (20 °C)

Kow : coefficient de partage octanol/eau, Koc : coefficient de partage carbone organique/eau, a : Mabey 1982, b : May 1978, c : Sanemasa 1982, d : Hansch 1995, e : Abdul 1987, f : Verevkin, 2004

1.1.2. Origines

Les hydrocarbures aromatiques (HAP et BTEX) peuvent être d'origine naturelle ou anthropogénique. Ils sont notamment présents à l'état naturel dans le pétrole brut et des processus tels que les éruptions volcaniques ou les feux de forêts sont à l'origine de leurs émissions dans l'environnement.

Le naphtalène est également suspecté d'être un composant physiologique de certaines fleurs de magnolia permettant d'identifier le sous genre *Yulania*. Le naphtalène est retrouvé (10,0 à 36,5 % de la composition de l'extrait étheré) dans les pétales de 5 taxons de *Magnolia* (*Magnolia* (*M.*) *denudata*, *M. liliiflora*, *M. tomentosa*, *M. p.* var. *praecocissima* et var. *borealis*) alors qu'il n'est rencontré ni dans leurs feuilles, ni dans aucune partie des autres taxons étudiés (Azuma, 1996). Dans la forêt amazonienne, 20 HAP sont également retrouvés

dans des nids de termites (201-4208 µg/kg) et à proximité (dans les branches de bois : 477-1464 µg/kg et dans le sol : 15-397 µg/kg) avec une prédominance pour le naphthalène, le phénanthrène et le perylène. Dans les nids de termites, la concentration en naphthalène atteint 3645 µg/kg et 547 µg/kg pour celle du perylène. Dans le bois et le sol à proximité des termitières, le perylène (14 et 11 µg/kg respectivement) et le naphthalène (jusqu'à 1436 et 400 µg/kg respectivement) ont de plus faibles concentrations, ce qui laisse penser que ces composés sont produits dans les nids de termites. Le perylène pourrait être produit lors de la digestion anaérobie du bois et du sol dans l'intestin des termites (Wilcke, 1999). En ce qui concerne le naphthalène, il est libéré par les termites pour la fumigation de leurs nids afin de les protéger des prédateurs, il leur sert également d'agent antiseptique contre les micro-organismes pathogènes (Chen, 1998). De même, en raison d'une quantité importante de phénanthrène observée dans les écorces et les branches des arbres *Vismia cayennensis*, les auteurs considèrent une origine biologique possible pour ces deux HAP (Krauss, 2005).

Malgré leur présence à l'état naturel, les principales sources d'émission des hydrocarbures aromatiques sont anthropogéniques. Ces composés peuvent être issus de la combustion du bois, des gaz d'échappement automobile, de l'évaporation de carburant au cours de son stockage, de son transport et de sa distribution. Ils sont aussi retrouvés dans de nombreux solvants ainsi que dans la fumée de cigarette. Les transports sont responsables de l'émission de 30 % des HAP retrouvés dans l'atmosphère. Les secteurs résidentiel et tertiaire, auxquels appartient notamment le chauffage domestique, représentent la principale source d'émission avec plus de 60 % des HAP émis. De même, en Aquitaine en 2010, 88 % des émissions de benzène ont été imputées aux secteurs résidentiel et tertiaire (AIRAQ Atmo Aquitaine, 2013).

1.1.3. Identification de profils d'hydrocarbures aromatiques émis en fonction des sources d'émission

En fonction de la source de combustion (biomasse, produits pétroliers...) différents types d'hydrocarbures aromatiques sont émis. Les composés de faibles masses moléculaires, présentant moins de trois cycles benzéniques, se forment à de faibles températures de combustion lors de la combustion du bois, par exemple. Les composés de masses moléculaires plus élevées (trois cycles ou plus) sont majoritairement émis à de plus fortes températures, comme au cours de la combustion de l'essence (Tobiszewski, 2012). La dominance des HAP légers est également suggérée pour les émissions de véhicules de fort tonnage à motorisation diesel, tandis que les véhicules légers à essence sont la principale source de benzo(a)pyrène et de dibenzo(ah)anthracène (Miguel, 1998). Ces différences ont permis la mise en place de ratios ayant pour but d'identifier la source des émissions d'hydrocarbures aromatiques (tableau 2).

Tableau 2 : Exemples de ratios utilisés pour déterminer la provenance des HAP (Tobiszewski, 2012)

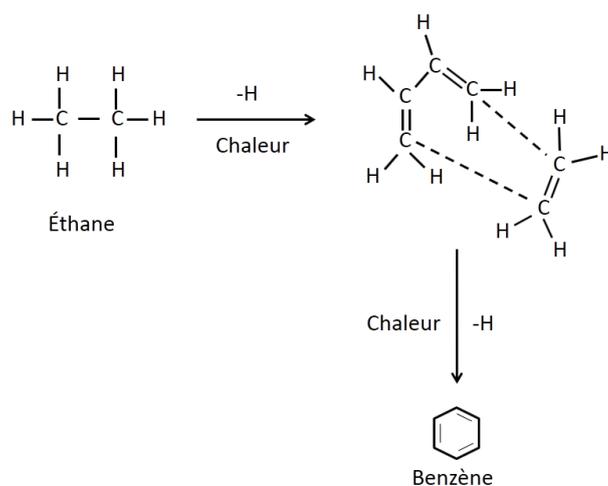
Ratio	Valeur	Source d'émission	Référence
FA/(FA + PYR)	0,4-0,5	Combustion de combustibles fossiles	De La Torre-Roche, 2009
	>0,5	Combustion d'herbe, bois, charbon	
IP/(IP + BghiP)	0,2-0,5	Combustion de produits pétroliers	Yunker 2002
	>0,5	Combustion d'herbe, bois, charbon	
BaP/BghiP	>0,6	Émissions liées au trafic	Katsoyiannis 2007
	<0,6	Émissions non liées au trafic	

FA : fluoranthène, PYR : pyrène, IP : indéno(1,2,3-*cd*)pyrène, BaP : benzo(*a*)pyrène, BghiP : benzo(*ghi*)pérylène

Ces ratios sont des outils de diagnostic permettant de déterminer l'origine des hydrocarbures aromatiques ; ils peuvent être utilisés pour l'air, le sol, les sédiments, l'eau et certains bio-indicateurs tels que les feuilles, les aiguilles de pins ou les moules (Li, 2008 ; Tobiszewski, 2012). Néanmoins, certains ratios sont établis avec des composés tels que le chrysène, le benzo(*a*)anthracène, l'anthracène et le phénanthrène, dont les niveaux peuvent être affectés par la présence de lumière ou par les changements climatiques (Tobiszewski, 2012).

1.1.4. Formation

Les hydrocarbures aromatiques sont généralement issus de combustions incomplètes. Les deux principaux mécanismes de formation des hydrocarbures aromatiques sont la pyrosynthèse et la pyrolyse (Kislov, 2013). Les hydrocarbures aromatiques peuvent être synthétisés, dans des conditions déficitaires en oxygène, à partir d'hydrocarbures saturés, tels que l'éthane (figure 2).

**Figure 2 : Pyrosynthèse du benzène à partir de l'éthane** (Ravindra, 2008)

Le benzène peut également être généré par polymérisation de l'acétylène (figure 3). Les dérivés substitués du benzène que sont le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes peuvent ensuite être formés par substitution aromatique électrophile.

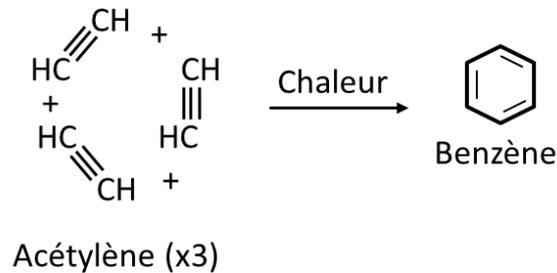


Figure 3 : Formation du benzène par polymérisation de l'acétylène

Les hydrocarbures monocycliques peuvent ensuite être à l'origine des HAP grâce à une pyrosynthèse. A une température excédant 500 °C, les liaisons carbone/carbone et carbone/hydrogène sont rompues et forment des radicaux libres. La combinaison de l'acétylène à ces radicaux crée alors les structures aromatiques (figure 4, Kislov, 2013).

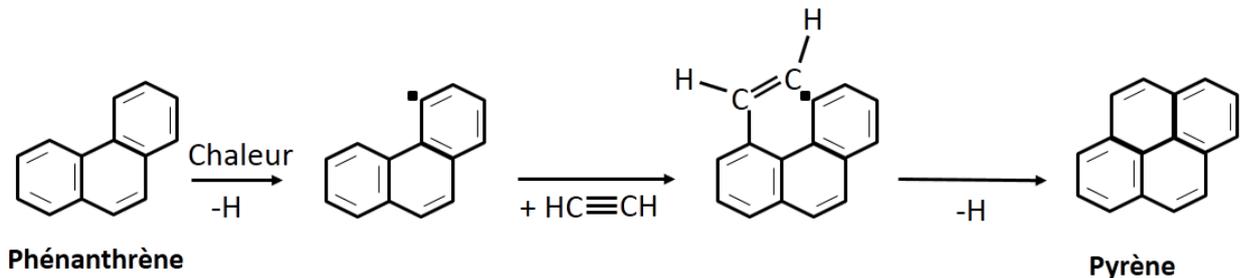


Figure 4 : Formation du pyrène par combinaison de l'acétylène avec le radical phénanthrène (Kislov, 2013)

En ce qui concerne la pyrolyse des hydrocarbures aromatiques, les produits primaires sont principalement des composés phénoliques. La réaction de dégradation pyrolytique du phénol implique tout d'abord l'élimination de monoxyde de carbone à partir du carbone porteur de la fonction hydroxyle. Les radicaux cyclopentadiéniques s'associent ensuite deux à deux pour former la tétraline dont la décomposition thermique conduit au naphthalène (figure 5) mais également à la plupart des hydrocarbures aromatiques (Cypres, 1975).

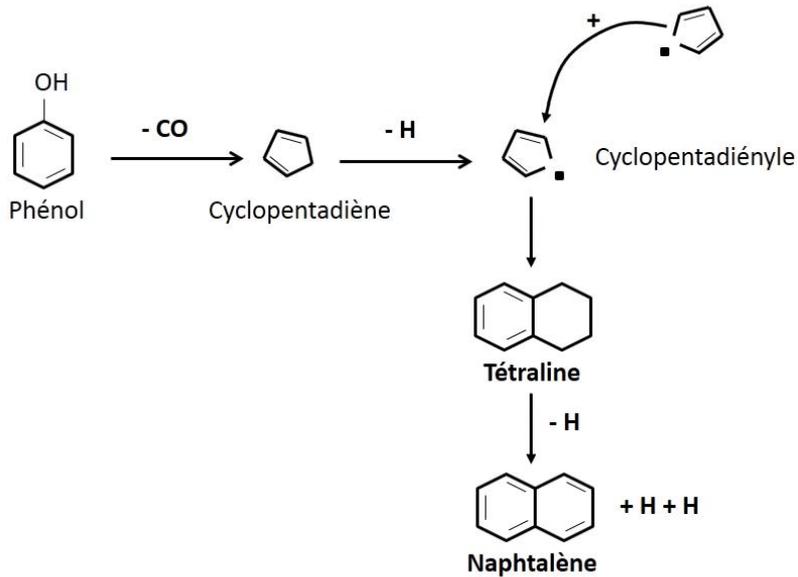


Figure 5 : Formation du naphthalène par pyrolyse à partir du phénol (Sharma, 2003)

1.2. Dispersion et mécanismes de dégradation des hydrocarbures aromatiques dans l'environnement

Les sources d'émission des hydrocarbures aromatiques sont multiples. Ces composés se dispersent dans l'environnement puis sont retrouvés dans l'ensemble des matrices environnementales (air, eau, sol).

1.2.1. Dispersion des hydrocarbures aromatiques dans l'air

Les hydrocarbures aromatiques présents dans l'atmosphère peuvent se trouver à l'état gazeux ou associés aux particules. La distribution des HAP dans la phase particulaire ou gazeuse dépend de la pression de vapeur des composés (données dans le tableau 1) qui est liée à leur masse moléculaire. Les HAP avec de faibles pressions de vapeur, comme le benzo(*a*)pyrène ($7,5 \cdot 10^{-7}$ Pa à 25 °C), ont tendance à être adsorbés sur des particules, tandis que les hydrocarbures aromatiques à fortes pressions de vapeur, comme les BTEX ou le naphthalène ($1,1 \cdot 10^1$ Pa à 25 °C), se trouvent principalement en phase vapeur (Abdel-Shafy, 2016). Ainsi, les HAP lourds ($MM \geq 252$ g/mol), caractérisés par leur faible volatilité et leurs températures de condensation relativement élevées, sont généralement adsorbés sur les particules atmosphériques (Tobiszewski, 2012). Les HAP semi-volatils ($228 \geq MM \geq 202$ g/mol) peuvent être rencontrés dans les phases particulaires et gazeuses, tandis que les HAP légers ($MM \leq 178$ g/mol) et les BTEX se retrouvent principalement dans la phase gazeuse (Tobiszewski, 2012). La plupart des HAP présents dans la phase particulaire sont adsorbés sur des particules atmosphériques ayant un diamètre aérodynamique compris entre 0,1 et 2,0 μm (Kiss, 1998)

La répartition de ces composés dans les deux phases dépend également de la température. Les fortes températures (en été ou dans les régions tropicales) engendrent une augmentation de la représentation des HAP dans la phase gazeuse tandis que les plus faibles températures (pendant l'hiver ou dans les régions arctiques) augmentent le niveau de HAP dans la phase particulaire (Li, 2006). Le contenu important en HAP dans la phase particulaire pendant l'hiver est aussi dû à l'augmentation du chauffage domestique. Dans la région de la Haute-Silésie en Pologne, la concentration en fluoranthène (HAP semi-volatile) dans la phase particulaire est environ 30 fois plus élevée en hiver qu'en été, notamment en raison de l'utilisation du charbon pour le chauffage domestique (Bodzek, 1993).

Les hydrocarbures aromatiques de la phase gazeuse peuvent être transportés dans l'air sur de longues distances contrairement aux HAP lourds (à partir de 4 cycles) sur les particules, qui ne sont que légèrement mobiles et sont principalement déposées près de leur source d'émission (Hautala, 1995 ; Wania, 1996 ; Yang, 1991). Le vent est un paramètre météorologique ayant une influence importante sur le transport et la dispersion des hydrocarbures aromatiques, aussi bien grâce à sa vitesse qu'à sa direction. En effet, la direction du vent oriente les retombées de polluants, quant à la vitesse, elle influe sur leur dilution et leur dispersion. Des vents faibles favorisent l'accumulation locale de polluants. De plus, lorsque les vents sont faibles, l'influence du relief local devient plus forte. La vitesse du vent augmente avec l'altitude, par conséquent, la dispersion est facilitée avec l'élévation des composés dans l'atmosphère (Diaf, 2003). Les situations dépressionnaires correspondent généralement à des zones de fortes turbulences, ce qui implique que la dispersion des composés en phase gazeuse soit facilitée. Par contre, ces conditions instables empêchent le dépôt des particules puisque les forts courants atmosphériques permettent leur maintien en suspension. Les fortes pressions caractérisant les situations anticycloniques induisent une stabilité favorable à l'accumulation de polluants à l'état gazeux et aux retombées des particules (Abdel-Shafy, 2016 ; Diaf, 2003).

L'adsorption des hydrocarbures aromatiques à la surface des poussières les rend hautement thermo- et photo-sensibles. Dans l'atmosphère, la photo-oxydation constitue la voie de dégradation la plus importante pour les HAP (Skupinska, 2004). Les hydrocarbures aromatiques réagissent notamment avec l'ozone, les oxydes d'azote (NO_x), les oxydes de soufre (SO_x) et les radicaux hydroxyle (•OH). Leur durée de vie dans l'atmosphère varie de quelques heures à plusieurs mois pendant l'hiver (INERIS, 2004). La réaction de l'acénaphthylène avec le NO₃ induit notamment l'addition du NO₃ à la double liaison insaturée carbone-carbone du cycle cyclopentane. La figure 6 présente différents composés de dégradations obtenus en phase gazeuse ou particulaire après réaction de l'acénaphthylène avec les radicaux hydroxyle et nitrate ainsi qu'avec l'ozone en phase gazeuse.

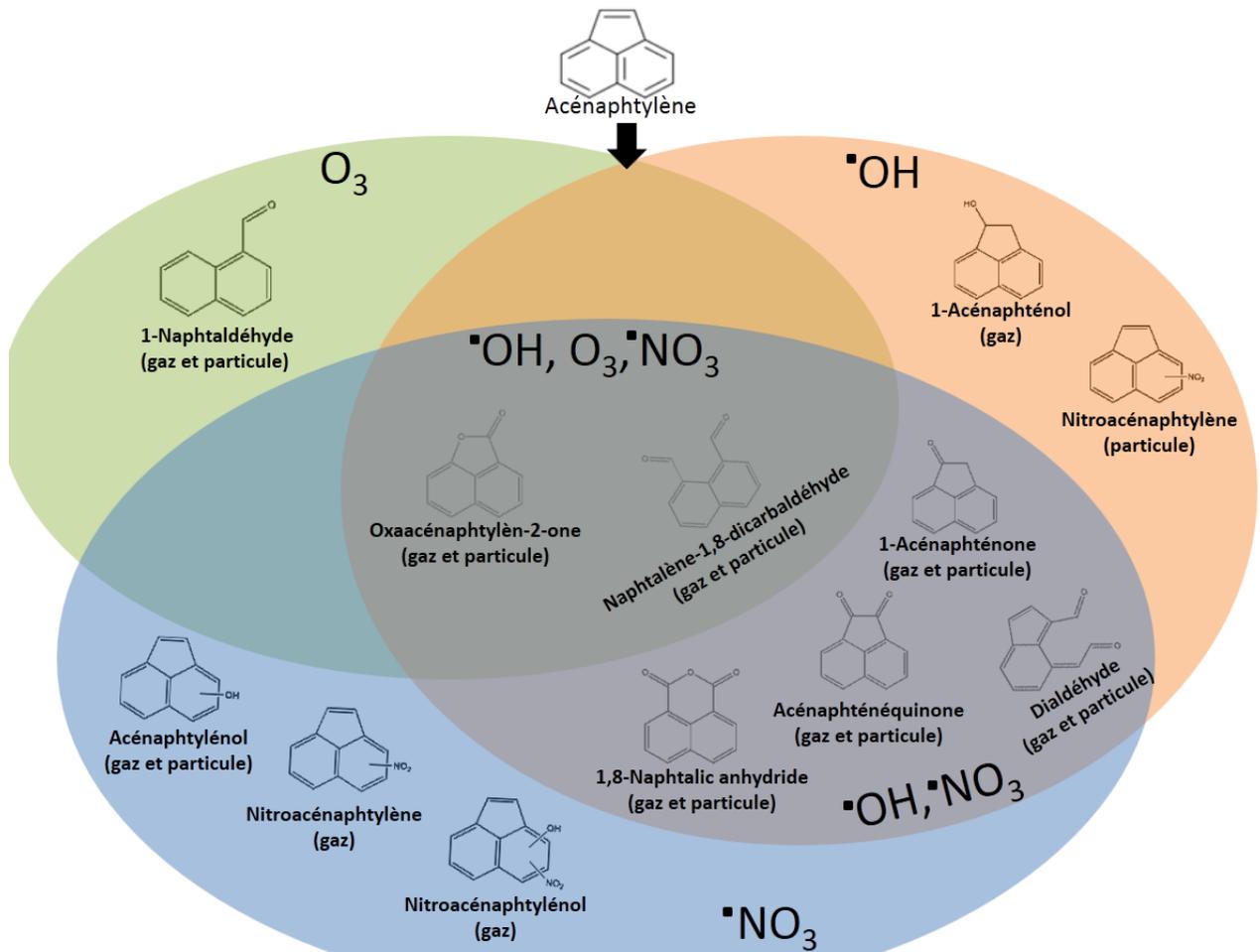


Figure 6 : Composés de dégradation obtenus après réaction de l'acénaphtylène avec un radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), l'ozone (O_3) ou le radical nitrate ($\bullet\text{NO}_3$) (Zhou, 2013)
L'indication entre parenthèses précise si le composé est retrouvé en phase gazeuse ou particulaire

Les HAP ont des vitesses de réaction similaires avec les radicaux $\bullet\text{OH}$. Certains comme le chrysène, l'anthracène, le phénanthrène, le benzo(a)pyrène et le perylène réagissent plus rapidement avec le NO_2 que le phénanthrène, par exemple (Esteve, 2004 ; Fraser, 1998 ; Tobiszewski, 2012 ; Niu, 2007).

Les hydrocarbures aromatiques peuvent également être soustraits de l'atmosphère par dépôt sec (particules et poussières) et humides (précipitations) et contaminer les eaux, les sols ainsi que les végétaux (figure 7).

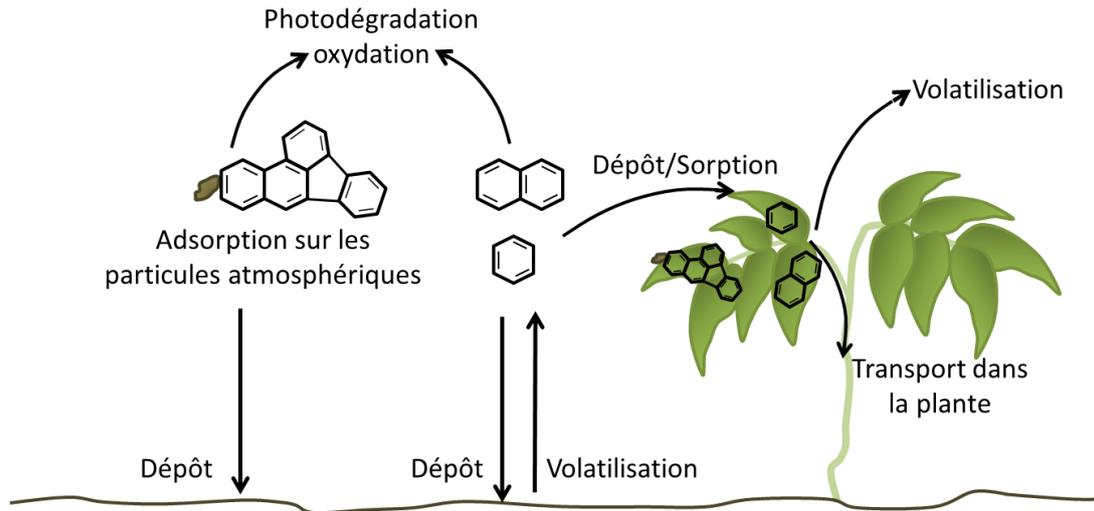


Figure 7 : Devenir des hydrocarbures aromatiques dans l'atmosphère

1.2.2. Dispersion des hydrocarbures aromatiques au niveau du sol

Influence des conditions climatiques

L'humidité de l'atmosphère influe sur les concentrations des polluants retrouvés au niveau du sol. Les précipitations permettent d'entraîner les poussières ainsi que les polluants de l'atmosphère vers le sol, avec une plus grande efficacité pour les grosses particules (Dégremont, 2009). La pluie lessive tout d'abord les HAP de fortes masses moléculaires (plus de quatre cycles) associés aux particules atmosphériques. Lorsque les précipitations augmentent, le lessivage des hydrocarbures aromatiques de plus faibles masses moléculaires (jusqu'à 4 cycles) devient plus efficace (Dégremont, 2009 ; Kipoulou, 1999).

La température agit également sur les propriétés physiques des polluants : de faibles températures vont entraîner la diminution de la volatilité des composés qui vont donc s'accumuler au niveau du sol (Kipoulou, 1999). Au contraire, l'élévation de la température augmente la solubilité et la pression de vapeur saturante des hydrocarbures aromatiques diminuant ainsi leur adsorption dans le sol.

Les caractéristiques du sol influent sur l'écoulement des flux gazeux et donc sur la dispersion des polluants. Par exemple, la rugosité du sol augmente la turbulence des masses d'air, induisant ainsi le dépôt des particules par capture aérodynamique. La quantité de polluants éliminés de l'air par dépôt sec dépend du type de sol et plus particulièrement de sa sensibilité aux phénomènes d'érosion et de sa capacité à adsorber les composés ou à les remettre en suspension (Diaf, 2003 ; Desalme, 2013).

Influence de la distance avec la source d'émission

Les concentrations en hydrocarbures aromatiques retrouvées dans les sols sont très variables en raison de la distance avec les sources de pollution, de la profondeur d'échantillonnage ou même des éventuels déversements accidentels.

La contamination des sols urbains et industriels est généralement plus importante que celle des sites ruraux. En Suisse, le niveau en HAP (somme de 16 HAP) dans le sol de surface (0-20 cm) atteint 8465 µg/kg de poids sec (d.w.) dans un parc urbain contre 32 µg/kg d.w. pour un site protégé de toute activité humaine directe (Desaules, 2008). Dans des échantillons de sol (forêts et prairies) en surface (0-5 cm) provenant du Royaume-Uni (27 échantillons) et de Norvège (26 échantillons), les concentrations en HAP (somme de 15) varient respectivement entre 42 et 11200 µg/kg (d.w.) et entre 8,6 et 1100 µg/kg (d.w.). Dans cette étude, les échantillons de sol se trouvent plus contaminés au Royaume-Uni qu'en Norvège, en raison d'une industrialisation et une densité de population plus importante (Nam, 2008).

Les concentrations en polluants diminuent avec l'éloignement de la source de contamination. La quantité en HAP (somme de 17 composés) retrouvée dans le sol à 10 mètres (2627 µg/kg d.w.) d'une autoroute française (70 000 véhicules par jour) est significativement supérieure ($p < 0,05$) aux concentrations mesurées à 50 (1228 µg/kg d.w.) et 150 mètres (1078 µg/kg d.w.) (Crépineau, 2003). Le dépôt d'hydrocarbures aromatiques se produit principalement sur une distance de 15 mètres d'une circulation routière (Yang, 1991). La quantité en HAP près d'une autoroute tchèque (0,5 m) est 30 fois plus importante que la concentration relevée à 500 m de l'autoroute (respectivement 3095 et 106 µg/kg de sol sec) (Tuháčková, 2001). Ce sont principalement les composés de plus haute masse moléculaire (plus de 4 cycles) qui sont déposés à proximité de la voie alors que les composés plus légers ($MM < 252$ g/mol) sont quant à eux distribués plus largement (Yang, 1991 ; Hautala, 1995).

Devenir dans le sol

Le caractère lipophile des hydrocarbures aromatiques leur permet de s'adsorber sur la fraction organique des particules du sol (Jánská, 2006). Leur adsorption sur les matières organiques implique une faible mobilité dans le sol et une accumulation sur de longues périodes de temps. Les composés de faibles masses moléculaires, tels que les BTEX, sont moins susceptibles d'être retrouvés dans le sol à long terme car ils possèdent des pressions de vapeur saturantes et des solubilités élevées. Ils vont donc facilement se volatiliser de la surface du sol ou être entraînés dans l'eau par ruissellement ou lixiviation. La volatilisation, la lixiviation, les dégradations biotiques et abiotiques ainsi que l'absorption par les plantes sont les principales voies d'élimination des hydrocarbures aromatiques présents dans les sols (figure 8, Kipopoulou, 1999).

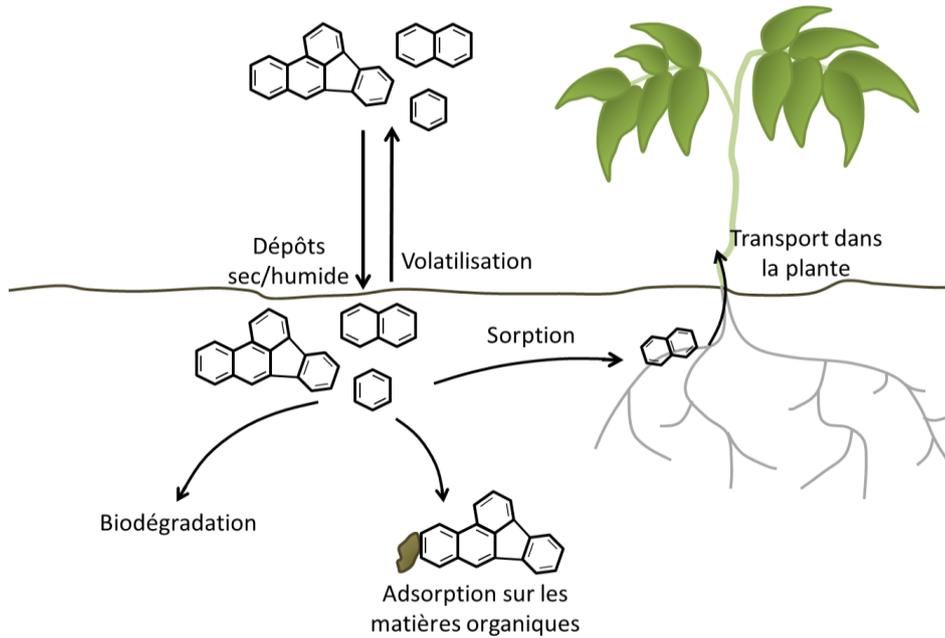


Figure 8 : Devenir des hydrocarbures aromatiques au niveau du sol

Les sols tempérés et tropicaux sont fortement soumis à ces processus d'élimination en raison des conditions météorologiques telles que l'exposition importante au soleil, des températures élevées et des précipitations fréquentes et substantielles (Li, 2008 ; Wilcke, 1999). La diminution de la température inhibe, quant à elle, la croissance et le développement des micro-organismes du sol réduisant ainsi les réactions biochimiques et donc la dégradation des hydrocarbures aromatiques (Kipopoulou, 1999). Cette biodégradation est le fait de bactéries ou de champignons, par le biais d'oxydase libérées dans des conditions aérobies, et concerne plus particulièrement les hydrocarbures aromatiques ayant une masse moléculaire inférieure ou égale à 202 g/mol (Posada-Baquero, 2011). Le champignon *Cladophialophora* et les bactéries *Pseudomonas putida* ou *Mycobacterium* sp.6PY1, sont notamment connus pour dégrader les hydrocarbures aromatiques (Chevron Cottin, 2007 ; Prenafeta-Boldú, 2002 ; Christofolletti Mazzeo, 2010). Au cours de la dégradation bactérienne, les hydrocarbures aromatiques sont d'abord oxydés en cis-dihydrodiols puis en composés aromatiques dihydroxylés (catéchols) (figure 9, Johnsen, 2005 ; Prenafeta-Boldú, 2002 ; Christofolletti Mazzeo, 2010).

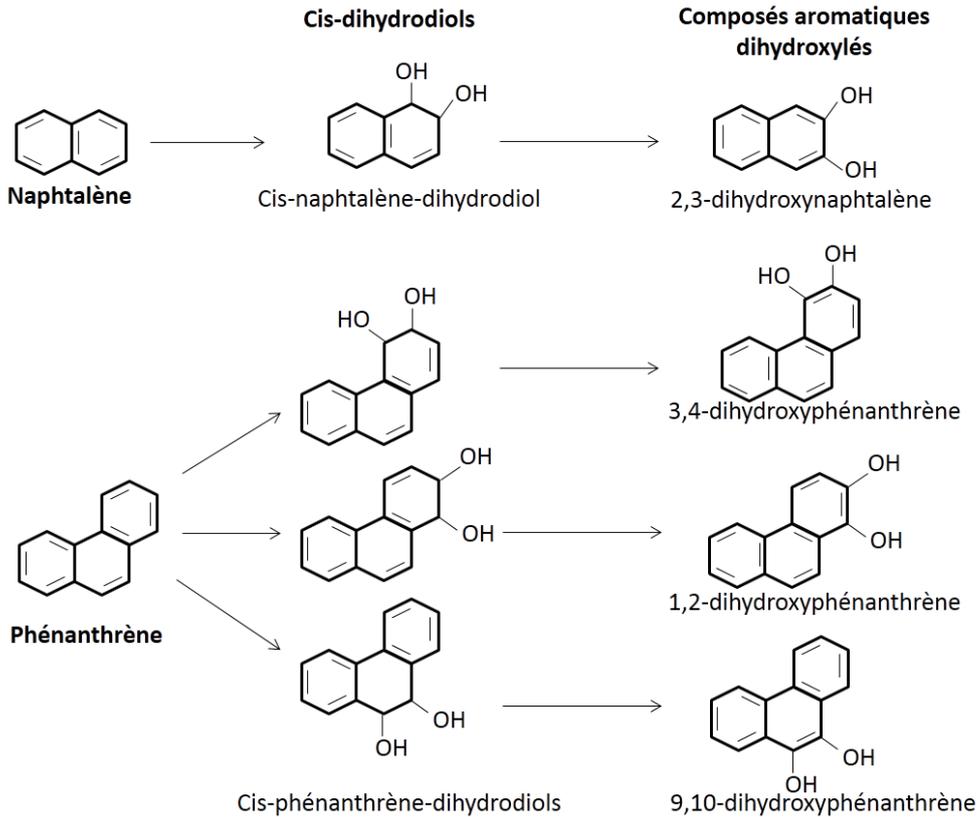


Figure 9 : Cis-dihydrodiols et composés aromatiques dihydroxylés formés après oxydation du naphthalène et du phénanthrène

La présence de racines de plantes favorise l'élimination des hydrocarbures aromatiques du sol. Des diminutions rapides des quantités de pyrène ont été montrées dans des sols cultivés avec des plants de poivre et de radis. En 8 semaines, 74% du pyrène est éliminé des sols cultivés contre 40% pour les sols sans végétaux (Liste, 2000).

Divers mécanismes sont proposés pour expliquer la remédiation des composés organiques présents dans le sol par les plantes. Tout d'abord, la phytoremédiation peut s'expliquer par la dégradation importante des composés organiques au niveau de la rhizosphère, en raison des densités élevées de microorganismes à cet endroit (Cunningham, 1996). Ensuite, la transpiration des plantes peut favoriser le transport des contaminants dissous dans l'eau vers les racines, avec une plus grande probabilité pour les composés organiques les plus solubles dans l'eau (Ferro, 1994 ; Nyer, 1996).

Malgré les divers processus d'élimination, la plupart des hydrocarbures aromatiques sont persistants dans le sol (Kipopoulou, 1999). Les mécanismes de biodégradation peuvent être limités en fonction de la solubilité des hydrocarbures aromatiques, la disponibilité des nutriments, la température mais aussi de la présence ou l'absence d'oxygène (Zhang, 2006). De plus, la biodégradation est affectée par la bioaccessibilité réduite des hydrocarbures aromatiques. L'adsorption des hydrocarbures aromatiques sur la matière organique du sol,

implique une faible surface d'échange entre la fraction potentiellement biodégradable des composés et les micro-organismes (Posada-Baquero, 2011).

1.2.3. Dispersion des hydrocarbures aromatiques dans l'environnement aquatique

Les évènements climatiques tels que le vent, la pluie et le lessivage des sols sont responsables de fortes concentrations en hydrocarbures aromatiques retrouvées dans l'eau et les sédiments des océans et des rivières (Cavalcante, 2009 et 2010). Dans un environnement aquatique, les composés les moins hydrophobes, les BTEX et les HAP légers (2 et 3 cycles aromatiques), sont principalement retrouvés dans l'eau. Les HAP plus hydrophobes (4 à 6 cycles aromatiques) s'accumulent préférentiellement dans la fraction organique des sédiments (Kafilzadeh, 2015).

Eau douce

Le lessivage des sols par la pluie est notamment responsable de la présence de HAP (somme de 14 composés) entre 0,4 et 16,3 µg/L dans l'eau de la ville de Columbia en Caroline du Sud (11 échantillons) (Ngabe, 2000). Aux Etats-Unis, le toluène et le xylène font partie des composés organiques les plus fréquemment détectés dans les eaux urbaines. Dans la rivière Sava, qui est le deuxième plus grand affluent du Danube et qui traverse la Slovénie, la Croatie et la Serbie, les niveaux de BTEX relevés dans les sédiments varient de moins de 54 µg/kg à 3886 µg/kg (d.w.). Cet important niveau de pollution mesuré suite à une inondation est notamment expliqué par des rejets d'eaux usées ainsi que par la présence d'industries de raffinage du pétrole (Medunić, 2015). Pour la rivière de Tonghui (Pékin), touchée par l'important développement urbain et industriel des alentours, la concentration totale en HAP (somme de 16) retrouvée dans les sédiments est supérieure à celle mesurée dans l'eau, avec des valeurs variant de 127 à 928 µg/kg et de 0,2 à 2,6 µg/L respectivement. Les HAP composés de 2 (38,5 %) et 3 (36,5 %) cycles aromatiques sont les plus représentés dans les échantillons d'eau tandis que les HAP avec 3 (40,8 %) et 4 (28,8 %) cycles sont majoritaires dans les échantillons sédimentaires (Zhang, 2004).

Murphy *et al.* (1988) indiquent que plus de 90% des hydrocarbures sont adsorbés sur les matières particulaires dans les rivières et ne traversent pas la zone de l'estuaire, en raison des changements physico-chimiques entraînées par le mélange de l'eau douce et l'eau salée. L'augmentation de la salinité entraîne l'adsorption des polluants sur les particules qui se retrouvent donc concentrés dans les estuaires par floculation (Brunk, 1997). En Normandie, en 2003, le contenu en HAP (somme de 21 HAP) retrouvé dans les sédiments de l'estuaire de Seine varie entre 1275 et 12492 µg/kg d.w. et entre 1763 et 2457 µg/kg d.w. pour les sédiments de la baie de Seine. Dans ces mêmes sédiments, le niveau de BaP atteint jusqu'à 1122 µg/kg de poids sec dans l'estuaire et 176 µg/kg d.w. dans la baie (Cachot, 2006).

Eau salée

L'environnement aux abords du lieu de prélèvement influence le niveau d'hydrocarbures aromatiques relevés dans les eaux salées et les sédiments. Dans l'Océan Atlantique, sur les côtes de Fortaleza au Brésil, le toluène est retrouvé à un niveau de 1,63 µg/L et de 1,15 µg/L pour le xylène. Pour ces composés, le principal contributeur à cette pollution apparaît être le ruissellement urbain (Cavalcante, 2010). La Lagune de Karavasta (Albanie) est impactée par de nombreuses sources de contamination, telles que les déversements d'eaux urbaines et de l'industrie pétrolière, les courants marins provenant de la mer Adriatique, ou encore les transports routier et maritime. Le contenu total dans l'eau de cette lagune est de 0,7 à 1,5 µg/L pour les BTEX et de 0,1 à 1,2 µg/L pour les HAP (somme de 13). Dans les sédiments les HAP sont retrouvés dans les mêmes concentrations que dans l'eau avec des valeurs entre 0,1 et 1,0 µg/kg (Dukaj, 2015). Dans des lagunes de la côte turque, le contenu en BTEX relevé dans les sédiments varie de 1 à 370 µg/kg (d.w.). Le toluène est le composé le plus retrouvé (51,5 %) avec les *m/p*-xylènes (40,3 %). La prédominance du toluène est notamment expliquée par l'utilisation excessive de produits chimiques provenant des activités agricoles (engrais et pesticides) et de la lutte contre les moustiques, puisque les lagunes ne se trouvent pas à proximité de sites industriels (Ünlü, 2017).

Les activités portuaires sont également responsables de fortes teneurs en hydrocarbures aromatiques rencontrés dans les sédiments. Dans le port de Boston qui est le port le plus pollué des Etats-Unis, les concentrations en HAP (somme de 16) dans les sédiments de surface (environ 10 cm) varient de 7300 à 358000 µg/kg (d.w.). Les HAP y sont retrouvés 4 à 7 fois plus associés aux particules sédimentaires les plus grosses (> 250 µm) qu'à celles inférieures à 62 µm avec une prédominance (79-93 %) des composés de 3 cycles et plus (Wang, 2001).

1.3. Conséquences écologiques**1.3.1. Contamination des végétaux**

Le contenu en hydrocarbures aromatiques dans les végétaux varie principalement en fonction du niveau de pollution du site de croissance. Les plantes cultivées dans les zones urbaines sont généralement plus contaminées que dans les zones rurales. Dans la zone métropolitaine de Campinas au Brésil (6 lieux de prélèvements), le niveau de HAP (somme de 10 HAP) mesuré dans la laitue en zone rurale est de 9,12 µg/kg de poids frais (3 déterminations) et atteint 17,93 µg/kg de poids frais (3 déterminations) à proximité de la route (Camargo, 2003). Les hydrocarbures aromatiques majoritairement présents dans les fruits et légumes sont ceux ayant moins de 3 cycles aromatiques (Lei, 2011). Ces composés s'accumulent préférentiellement dans la peau qui est la partie la plus lipophile des végétaux (Górna Binkul, 1996 ; Górna-Binkul, 1997). Le benzène est notamment retrouvé en concentration plus importante dans la peau des fruits comme l'orange (55,8 µg/kg), la pomme (26,6 µg/kg) et le kiwi (32,1 µg/kg) que dans la pulpe où il n'a pas pu y être détecté (Górna-Binkul, 1996). L'élimination de la peau des concombres après épluchage permet de réduire le contenu en HAP (somme de 8 HAP) de 11,6 à 7,6 µg/kg de poids frais (Ashraf, 2012).

Contamination des végétaux par voie aérienne

L'adsorption des hydrocarbures aromatiques dépend du mode de croissance (aérien ou souterrain) du végétal. La concentration moyenne en HAP (somme de 16 HAP) rencontrée dans 3 légumes souterrains (pomme de terre, radis et navet) est de 32,26 µg/kg de poids sec contre 60,73 µg/kg de poids sec pour 6 légumes feuillus (épinard, fenugrec ou le chou-fleur par exemple). La différence significative observée entre ces deux groupes de végétaux montre que les échanges aériens semblent être les principaux responsables de leur contamination par les HAP (Tuteja, 2011). Dans une étude menée en Grèce en 1993, le profil en HAP déterminé dans des légumes (choux, carottes, laitues, poireaux et endives) cultivés près d'une zone industrielle est similaire à celui observé dans l'air (Kipopoulou, 1999). Les transferts d'hydrocarbures aromatiques de l'air vers les plantes dépendent du coefficient de partage octanol/air des composés (Górna-Binkul, 2001, Kipopoulou, 1999). Le facteur de bioconcentration entre l'air et la végétation, qui est le ratio entre les concentrations en hydrocarbures aromatiques dans l'air et dans la plante, est plus important lorsque le coefficient de partage octanol/air augmente (Kipopoulou, 1999).

L'adsorption des composés organiques volatils de l'atmosphère dépend de la morphologie de la plante. De grandes surfaces d'échange avec la phase gazeuse favorisent la contamination. Ce phénomène est notamment observé pour le chou (14 cm²/g) et le maïs (36 cm²/g), dont les grandes feuilles représentent une large surface d'échange par rapport au raisin (1,9 cm²/g) ou la tomate (0,55 cm²/g). Dans les échantillons prélevés près d'une industrie chimique ayant brûlée une semaine auparavant, la teneur totale en HAP (somme de 10 HAP) est beaucoup plus importante dans les feuilles de chou et de maïs, avec 4,2±3,5 µg/kg et 2,4±1,8 µg/kg w.w. respectivement, que dans le raisin (0,3±0,2 µg/kg) et la tomate (environ 0,09±0,04 µg/kg). Lorsque la concentration en HAP est ramenée à la surface externe du végétal étudié, il apparaît que le niveau de contamination à la surface du raisin (176 pg de HAP/ cm²) et de la tomate (160 pg de HAP/ cm²) est supérieur à celui des feuilles de maïs (67 pg de HAP/ cm²). La plus faible teneur, des HAP en µg/kg dans ces fruits est due, selon les auteurs, à leur biomasse plus importante (Rey-Salgueiro, 2008b).

De plus, dans des conditions de culture similaires, des teneurs en HAP plus élevées sont retrouvées dans les légumes à feuilles larges et rugueuses (*Vernonia amygdalina*) que dans ceux possédant des petites feuilles lisses (*Lasianthera africanum*) (Inam, 2016).

Contamination des végétaux par le sol

Même si les échanges avec la phase gazeuse constituent la principale voie de contamination des végétaux aériens, un transfert des hydrocarbures aromatiques du sol vers les fruits *via* le xylème peut également être envisagé. Le transfert du sol vers les parties aériennes a été démontré pour des cultures de légumes (laitue, carotte, pomme de terre, haricots et tomates) sous atmosphère contrôlée dans des pots contenant des sols pollués. Les parties aériennes y sont environ 10 fois moins contaminées que les racines. Un faible transfert des HAP vers les fruits est donc constaté (Fimes, 2004). Pour les plantes (12 espèces) poussant dans des sols additionnés de phénanthrène et de pyrène, les parties aériennes sont moins contaminées (jusqu'à 1,96 et 7,37 mg/kg d.w., respectivement) que les racines (jusqu'à 6,72 et 199 mg/kg

d.w., respectivement) (Gao, 2004). Les auteurs suggèrent un transfert restreint des composés étudiés des racines vers les parties aériennes mais aussi une possible contamination provenant de la volatilisation des HAP du sol.

En ce qui concerne les légumes souterrains, des concentrations élevées en hydrocarbures aromatiques ont notamment été mesurées dans les pommes de terre et les carottes (Ashraf, 2012 ; Kipopoulou, 1999 ; Samsøe-Petersen, 2002). Dans le sol des champs de cultures, la concentration en BaP la plus importante est rencontrée pour un ancien site d'enfouissement près de Copenhague avec 15 mg/kg (d.w.). Les quantités en BaP retrouvées dans les carottes et les pommes de terre non pelées atteignent des concentrations extrêmes d'environ 1,4 mg/kg et 0,8 mg/kg poids humide respectivement. Le transfert des hydrocarbures aromatiques du sol vers les végétaux souterrains est lié à leur solubilité ainsi qu'au coefficient de partage octanol/eau. Le facteur de bioconcentration sol-végétal (soit la concentration en HAP dans le végétal divisée par leur concentration dans le sol) augmente avec la solubilité des HAP dans l'eau et avec la diminution du coefficient de partage octanol/eau (Kipopoulou, 1999). Les hydrocarbures aromatiques de faible poids moléculaire sont relativement solubles dans l'eau (tableau 1), volatils et mobiles dans le sol. Ils sont ainsi facilement éliminés par volatilisation ou lessivage. Les BTEX sont par conséquent absents des légumes souterrains (navet, pomme de terre, radis, panais, céleri-rave, carotte) (Górna-Binkul, 1996).

Le niveau de contamination des sols ne semble pas être systématiquement corrélé à la concentration des HAP retrouvée dans les plantes. Cela peut s'expliquer, d'une part, par la faible mobilité des HAP comportant plus de 4 cycles qui ne peuvent pas migrer vers le végétal, et d'autre part, par les processus de biodégradation au niveau du sol qui entraîne l'élimination d'une partie des HAP (Li, 2008 ; Samsøe-Petersen, 2002).

L'absorption des HAP par les racines est renforcée par la présence de la microflore du sol. L'inoculation d'un champignon mycorhiziens dans le sol facilite le transfert des HAP vers la racine de ray-grass. Après 60 jours, les niveaux de fluorène et de phénanthrène relevés dans les racines des sols non inoculés sont de 1,2 et 0,2 µg/kg d.w. respectivement, alors qu'ils atteignent 62,6 et 4,8 µg/kg d.w. respectivement pour les racines des sols inoculés avec des champignons mycorhiziens (Gao, 2010). L'inoculation des champignons (*Lewia sp.*) dans le sol (contaminé avec du pyrène et du phénanthrène à 1500 mg/kg d.w.) favorise également la sorption du pyrène par les racines de fétuque. La concentration de pyrène est de 695 ± 246 mg/kg d.w. dans les racines provenant des sols non inoculés et de 1603 ± 336 mg/kg d.w. dans les racines des sols inoculés (3 échantillons par conditions) (Cruz-Hernández, 2013).

1.3.2. Contamination de la faune terrestre

Les insectes, tels que les abeilles, sont souvent utilisés comme indicateurs de la qualité de l'environnement en raison de leur exposition et de leur sensibilité aux polluants, mais aussi de leur large distribution dans l'environnement et de l'accès à un nombre suffisant d'individus pour obtenir des résultats significatifs (Fernández, 2001 ; Kevan, 1999 ; Lambert, 2012). Les abeilles sont exposées aux hydrocarbures aromatiques pendant leur vol mais aussi par ingestion lors de la récolte du pollen et du nectar des fleurs (Lambert, 2012). Une étude

réalisée en Bretagne sur différents ruchers situés à proximité ou non d'agglomérations, du trafic routier ou du trafic maritime a montré la présence de HAP dans le miel et les abeilles. De plus fortes concentrations sont mesurées dans le corps des abeilles ($7,03 \pm 1,25 \mu\text{g/kg d.w.}$ en moyenne) que dans le miel ($0,82 \pm 0,01 \mu\text{g/kg w.w.}$ en moyenne). Des teneurs significatives sont retrouvées dans les abeilles ($0,87\text{-}73,83 \mu\text{g/kg}$), le miel ($0,48\text{-}5,80 \mu\text{g/kg}$), et le pollen ($0,79\text{-}129,41 \mu\text{g/kg}$) de l'île d'Ouessant, probablement en raison du trafic intensif de bateaux (Lambert, 2012).

L'absorption d'hydrocarbures aromatiques à partir du sol par des animaux terrestres tels que la chèvre ou la vache, engendre l'excrétion de métabolites par les voies lactée et urinaire (Costera, 2009 ; Ounnas, 2009 ; Grova, 2006 ; Lutz, 2006). Les métabolites principalement retrouvés dans les fluides biologiques (3-hydroxyphénanthrène, 1-hydroxypyrene) sont mono-hydroxylés (Ounnas, 2009 ; Lutz, 2006). Une relation dose-réponse ($R^2 = 0,96$) a pu être établie entre les doses de pyrène ingérées et les quantités de 1-hydroxypyrene excrété dans l'urine et le lait de chèvre (Ounnas, 2009). Les métabolites de HAP sont majoritairement excrétés par voie urinaire puisque leur concentration est 20 à 30 fois plus importante dans les urines que dans le lait des ruminants (Costera, 2009 ; Ounnas, 2009). Le 1-hydroxypyrene atteint, par exemple, jusqu'à $8000 \mu\text{g/L}$ dans les urines et $450 \mu\text{g/L}$ dans le lait des chèvres, 9 h après la consommation de 49 mg de phénanthrène, 43 mg de pyrène et 50 mg de benzo(a)pyrène provenant d'un échantillon de sol (Costera, 2009). L'ingestion involontaire de sol par les ruminants représente une source non négligeable de transfert des HAP dans la chaîne alimentaire car le sol est plus contaminé par les HAP que les fourrages (Costera, 2009 ; Ounnas, 2009 ; Grova, 2006 ; Lutz, 2006).

En Corée, les concentrations en métabolites hydroxylés, retrouvées dans l'urine de vaches laitières, sont comprises entre 0,1 et $5,9 \mu\text{g/L}$ pour le 3-hydroxyphénanthrène et entre 0,5 et $3,6 \mu\text{g/L}$ pour le 1-hydroxypyrene. Ces concentrations en métabolites hydroxylés sont assez corrélées à celles des HAP non métabolisés retrouvées dans les muscles squelettiques, avec 0,7 à $4,8 \mu\text{g/kg}$ de poids frais pour le phénanthrène ($R^2 = 0,58$) et 0,4 à $4,1 \mu\text{g/kg}$ de poids frais pour le pyrène ($R^2 = 0,66$) (Kang, 2011).

Une étude réalisée en République tchèque (administration de HAP par apport alimentaire, percutané et par inhalation), montre que les HAP non métabolisés sont retrouvés dans tous les tissus bovins et porcins étudiés (le foie, les reins, les poumons, les muscles, les tissus adipeux, le cristallin et l'humeur vitrée). Les plus fortes concentrations en HAP (somme de 16) sont mesurées au niveau du cristallin avec 20 à $170 \mu\text{g/kg}$ de poids frais pour les porcs et 7,2 à $21,9 \mu\text{g/kg}$ de poids frais pour les bovins. Malgré le caractère hydrophobe des HAP, leurs concentrations restent faibles dans les tissus adipeux, 0,02 à $0,11 \mu\text{g/kg}$ de poids frais pour les porcs et 0,02 à $0,32 \mu\text{g/kg}$ de poids frais pour les bovins, en raison de leur métabolisation rapide (Ciganek, 2006).

1.3.3. Conséquences sur les micro-organismes du sol

La contamination du sol par les HAP a des conséquences sur la composition, l'abondance ainsi que sur l'activité des micro-organismes (champignons et bactéries). La présence des HAP dans le sol affecte la composition de la communauté microbienne. Par rapport au sol non contaminé, le sol contaminé par les HAP montre plus de *γ-Proteobacteria* et moins de *Bacteroidetes*. Les actinobactéries semblent être les plus représentées dans les sols contaminés par le fluoranthène (Sawulski, 2014).

L'abondance en microorganismes est affectée par le niveau des HAP dans le sol et dépend de la distance avec la source de contamination. Près de l'autoroute, dans un sol contaminé par 3095 µg/kg d.w. (Somme de 10 HAP), la quantité en bactéries et champignons est respectivement 8 et 3 fois supérieure au niveau rencontré à 500 mètres, dans une prairie dont le sol possède une teneur en HAP de 106 µg/kg d.w. (Tuháčková, 2001). L'augmentation de la présence de ces micro-organismes avec le rapprochement de la source de pollution est due à l'utilisation des hydrocarbures aromatiques comme source d'énergie pour le développement des colonies (Tuháčková, 2001). Néanmoins, l'effet inverse est observé pour d'autres bactéries, telles que les actinomycètes (majoritairement des nocardioformes), dont la présence se trouve diminuée avec le rapprochement de la source en HAP.

La présence des HAP dans le sol réduit significativement ($p < 0,05$ par rapport au sol non contaminé), d'environ 50 %, l'activité (déshydrogénase) des bactéries, des archées et des champignons, 2 jours après la contamination. Cependant, 20 jours après la contamination l'activité de ces micro-organismes dans les sols contaminés n'est pas significativement différente de celle observée dans le sol non contaminé (Sawulski, 2014).

1.3.4. Contamination des espèces aquatiques

Contamination des espèces en eau douce

Une étude menée dans différents lac d'Europe et du Groenland montre la présence de HAP dans le foie des poissons. Des concentrations similaires en HAP (somme de 14) sont relevées dans le foie des truites (2 et 65 µg/kg w.w.) et des ombles (11 et 65 µg/kg w.w.). Les résultats montrent chez ces poissons la dominance de HAP légers, principalement le phénanthrène (plus de 50 %) et dans de moindres mesures le fluorène, le fluoranthène et le pyrène (environ 10 % chacun) (Vives, 2003). Dans une réserve naturelle en Camargue, le phénanthrène est généralement le HAP le plus retrouvé dans le foie (32-166 µg/kg) et la vésicule biliaire (27-111 µg/kg) des poissons (carrassins, anguilles, poissons chat) (Pointet, 2000).

Contamination des espèces en eau salée

Dans les algues *Fucus serratus* et *Fucus vesiculosus*, provenant d'un petit port de Norvège où les activités principales sont l'industrie et la circulation des bateaux, les niveaux de BaP relevés sont respectivement égaux à 20 et 64 µg/kg d.w. (Knutzen, 1982).

De nombreuses espèces marines telles que les mollusques bivalves, les phytoplanctons et les zooplanctons, se développent et se nourrissent dans le compartiment sédimentaire impliquant

l'absorption et l'accumulation des hydrocarbures aromatiques. Une étude réalisée sur différentes espèces de poissons (thon, maquereau, saumon, l'espadon et autres poissons blancs) et de fruits de mer (moules, palourdes et crevettes) provenant du commerce espagnol, montre que les plus fortes concentrations en HAP (16 composés) sont retrouvées dans les coquillages. Dans les moules, les palourdes et les crevettes, les fortes teneurs en HAP (2 à 21 µg/kg w.w.) sont associées à leur incapacité à métaboliser ces polluants, impliquant une importante accumulation (Martí-Cid, 2007). Dans la moule bleue provenant des zones côtières nordiques (Islande, Norvège et Suède), les niveaux en HAP fluctuent entre 40 et 11670 µg/kg d.w. (Skarphéðinsdóttir, 2007). Pour les moules *Mytilus galloprovincialis* prélevées le long des côtes européennes (Allemagne, France et Espagne), la contamination en BaP varie entre 0,22 µg/kg d.w. en Méditerranée (côtes françaises, Corse et Sardaigne) et 166 µg/kg d.w. dans le Bassin d'Arcachon (zones hautement urbanisées avec espaces de loisirs) (Baumard, 1999). Ces valeurs restent très inférieures aux critères d'évaluation écotoxicologique (EAC) compris entre 5000 et 50 000 µg/kg d.w. pour le BaP dans les moules (OSPAR, 2000).

1.3.5. Contamination des aliments

La contamination des aliments bruts (animaux et végétaux) se produit pendant la croissance mais aussi pendant le transport, le stockage ainsi qu'au cours des processus de transformation (produits séchés, grillés, rôtis, fumés ou fris).

Les concentrations en HAP (somme de 16 composés en µg/kg w.w.) sont généralement plus faibles dans les fruits (de 0,7 pour la banane à 1 µg/kg pour la pêche) et les légumes (de 0,7 pour l'oignon à 4,1 µg/kg pour le chou-fleur) que dans les produits gras (de 18,1 pour le beurre à 19,2 µg/kg pour la margarine), les produits laitiers (de 0,6 pour le yaourt à 12,8 µg/kg pour le fromage) et la viande (de 1,2 pour la longe de porc à 364,9 µg/kg pour le salami). Le niveau de toluène est également plus élevé dans les échantillons de margarine (272 µg/kg), de fromage (255 µg/kg) et de bacon (230 µg/kg) que dans les fruits tels que l'orange (183 µg/kg), la banane (36 µg/kg) et la fraise (16 µg/kg) ou dans les légumes comme l'avocat (3 µg/kg) (Fleming-Jones, 2003). Ceci peut notamment être expliqué par le caractère lipophile des hydrocarbures aromatiques qui ont une plus forte affinité pour les lipides (Camargo, 2003 ; Martí-Cid, 2008).

La viande et les produits carnés ainsi que les huiles et les graisses sont considérés comme les principaux contributeurs à l'absorption journalière de HAP par ingestion, avec respectivement 57-71 % et 8-12 % pour les adultes (Martorell, 2010). La consommation de fruits et de légumes (environ 31 % de l'apport alimentaire total) contribue pour 5 à 10 % à l'absorption des HAP (Martorell, 2010). Néanmoins, l'absorption journalière d'hydrocarbures aromatiques peut varier selon la proportion de fruits et de légumes intégrée à l'alimentation ou le niveau de contamination de ces aliments qui dépend de leur environnement de culture, de leur stockage ou des procédés utilisés pour leur transformation. Les fruits et les légumes représentent donc une source significative d'apport d'hydrocarbures aromatiques qui doit être considérée.

1.3.5.1. Contenu en hydrocarbures aromatiques dans les fruits et les légumes

1.3.5.1.1. Contenu en BTEX dans les fruits et légumes

Dans la littérature, très peu de données sont disponibles sur la présence de BTEX dans les fruits et les légumes. De plus, la plupart de ces études visent à déterminer les concentrations en BTEX dans des produits achetés en supermarché générant un manque d'information sur leurs conditions de culture mais aussi de stockage et de transport.

Répartition des BTEX dans les fruits et légumes

Pour certains fruits et légumes, les contenus en BTEX dans la peau et la pulpe sont comparés. Les concentrations en toluène retrouvées dans la pulpe des tomates, des kiwis, des prunes, des poires et des pommes sont moins importantes que celles déterminées dans leurs peaux respectives. En ce qui concerne le benzène, qui n'est pas détecté dans la pulpe des pommes, sa concentration dans la peau est de 0,02 µg/kg (w.w.). Dans le cadre d'une contamination aérienne, les BTEX semblent préférentiellement s'adsorber et s'accumuler au niveau de la peau qui forme une barrière lipophile et qui est plus hydrophobe que la pulpe.

L'étude des BTEX dans des légumes souterrains, tels que le navet, les pommes de terre, le radis, le panais, le celeri et la carotte, n'a révélé la présence d'aucun hydrocarbure aromatique monocyclique. Ces résultats semblent indiquer que l'absence de contact avec l'air au cours de la croissance prévient d'une contamination de ces végétaux par les BTEX (Górna-Binkul, 1996). Cette hypothèse est confortée par les pressions de vapeur élevées des BTEX impliquant une importante volatilisation de ces composés au niveau du sol.

Distribution des BTEX

Parmi les BTEX, le toluène semble être l'hydrocarbure aromatique monocyclique le plus fréquemment retrouvé dans les échantillons de fruits et de légumes. Le niveau de toluène dans les fruits varie de 0,03 µg/kg w.w. dans la pulpe de kiwi à 36 µg/kg w.w. dans la pulpe de banane. En ce qui concerne les légumes, les concentrations en toluène sont comprises entre 0,02 µg/kg w.w. dans les feuilles de chou et 3 µg/kg w.w. dans l'avocat.

Le benzène peut atteindre une concentration très forte de 132 µg/kg w.w. pour la banane (Fleming-Jones, 2003).

L'éthylbenzène et les xylènes ne sont détectés que dans un faible nombre d'échantillons. L'éthylbenzène est présent dans la peau d'orange, les olives et l'avocat avec des quantités respectives de 0,02, 1,5 et 5 µg/kg w.w. Le niveau en *m/p*-xylènes est d'environ 0,08 µg/kg w.w. dans la peau d'orange et est compris entre 1 et 3,9 µg/kg w.w. dans les olives. Seule la peau d'orange montre une présence d'*o*-xylène avec environ 0,002 µg/kg w.w.

Des contenus importants en BTEX ont été déterminés dans les bananes, les fraises et les avocats, notamment en raison de concentrations en benzène élevées entre 11 et 132 µg/kg (w.w.). Les investigations, pour ces fruits et légumes, sont menées par les mêmes auteurs (Fleming-Jones, 2003). Il est donc possible d'envisager que les conditions de culture et de

stockage, si elles sont similaires pour l'ensemble des fruits et légumes étudiés, soient à l'origine des niveaux de contamination élevés.

1.3.5.1.2. Contenu en HAP dans les fruits et légumes

Comparés aux BTEX, un plus grand nombre de travaux visant à déterminer le contenu en HAP dans les fruits et les légumes sont disponibles, dans la littérature. La plupart de ces investigations, sont menées dans des environnements contaminés par des sources particulières de HAP (brûlage de déchets, industries, activités urbaines). Les niveaux de HAP détectés dans les fruits et les légumes sont globalement faibles. Des quantités entre 0,01 et 0,5 µg/kg (w.w.) sont retrouvées pour les HAP classés comme polluants prioritaires par l'US-EPA. Cependant, plusieurs études révèlent dans divers fruits et légumes des concentrations supérieures à 0,5 µg/kg w.w. pour certains composés qui peuvent même atteindre jusqu'à 5 µg/kg (w.w.). Le niveau de HAP est dépendant du fruit ou du légume étudié, de son environnement de croissance ainsi que du HAP considéré.

Influence de l'environnement des cultures sur le contenu en HAP dans les fruits et légumes

Parmi les études disponibles, certains environnements apparaissent plus contaminés par les HAP entraînant de plus importantes concentrations retrouvées dans les cultures. Des quantités élevées en HAP (fréquemment > 6 µg/kg jusqu'à 110 µg/kg) peuvent être observées dans différents légumes (chou, carotte, chou-fleur, laitue et tomate) provenant de Chine (Lei, 2011 ; Mo, 2009 ; Wang, 2012 ; Wu, 2016 ; Zhong, 2002). La proximité des cultures avec un site de combustion de déchet électronique dans le sud de la Chine résulte en d'importants niveaux de HAP (somme de 8 HAP lourds) dans les pois et les échalotes, avec 65,5 et 48,8 µg/kg w.w. respectivement (Wang, 2012). Des concentrations en HAP lourds (somme de 8) supérieures à 10 µg/kg sont trouvés dans le chou (11±16 µg/kg), le céleri (jusqu'à 19±46 µg/kg dans les feuilles), le concombre (15±14 µg/kg dans la peau), l'aubergine (12±15 µg/kg dans la peau), la pomme de terre (15±15 µg/kg) et la tomate (13±14 µg/kg dans la peau) cultivés dans une région du nord de la Chine où le charbon trouve de multiples applications (industrie, chauffage, cuisson) (Zhong, 2002). Certains niveaux en HAP sont associés à des écarts types importants. La quantité d'anthracène retrouvée dans la peau des pommes de terre (26 échantillons) est estimée à 10,2±32,8 µg/kg w.w., indiquant une importante variabilité des concentrations retrouvées dans les différents échantillons (Zhong, 2002). Dans les légumes provenant de zones densément peuplées et industrialisées de Chine (Nanjing : 8 millions d'habitants, présence d'industries pétrochimique et sidérurgique ; Wuhan: 10 millions d'habitants, présence d'industries sidérurgique, important trafic terrestre, fluvial et aérien), le fluorène et pyrène sont détectés en fortes concentrations. Le pyrène atteint 100 µg/kg dans le chou fleur et la concentration en fluorène est d'environ 39 µg/kg dans le luffa (Lei, 2011 ; Wu, 2016). Dans ces deux études, les taux de récupération obtenus pour certains HAP excèdent les 100 %. Quelques estimations des niveaux de naphthalène, d'acénaphthène et de fluorène sont inférieures aux gammes de linéarité déterminées par Lei *et al.* (2011) (entre 10 et 2000 µg/kg pour le naphthalène et l'acénaphthène, et de 2 à 2000 µg/kg pour le fluorène).

La proximité des cultures avec une source de pollution influe sur la quantité en HAP retrouvée dans les végétaux. Les végétaux provenant de zones urbaines ou industrielles présentent un contenu en HAP plus important que ceux cultivés dans les zones rurales. Le niveau de HAP lourds (somme de 8) retrouvé dans la laitue (moyenne de 3 déterminations) est d'environ $1,3 \pm 0,4$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. lorsqu'elle est cultivée dans une zone rurale contre $4,1 \pm 1,5$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. pour celle récoltée près d'une route à proximité d'une métropole (Camargo, 2003). Pour les feuilles d'aneth provenant d'une zone urbaine, le niveau total en HAP (somme de 15) est d'environ $5,2$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. alors qu'il est de $0,7$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. pour celles cultivées dans une zone rurale (Soceanu, 2014).

Dans un environnement pollué par les HAP, l'exposition aérienne semble être la principale voie contribuant à la contamination des végétaux. La comparaison des niveaux en HAP dans des végétaux aériens et souterrains cultivés dans un même environnement montre que les parties aériennes sont généralement plus contaminées que les parties souterraines. La concentration moyenne en HAP (somme de 16) dans 6 légumes à feuilles ($60,7$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w.) récoltés aux alentours d'une ville indienne (Panipat) est significativement supérieure à celle trouvée dans 3 légumes souterrains ($32,3$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w.) (Tuteja, 2011). De même, dans une zone urbaine en Roumanie, le niveau en HAP (somme de 15 composés) détecté dans les feuilles de chou se situe autour de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. contre 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. pour les pommes de terre (Soceanu, 2014).

Influence de la variété sur le contenu en HAP dans les fruits et légumes

L'accumulation des HAP dans les fruits et les légumes semble être dépendante de la variété. Parmi 3 variétés de carottes provenant de fermes biologiques, les carottes de variété « Nairobi » (3 échantillons), avec $16,0 \pm 2,5$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. dans la peau et $5,1 \pm 0,8$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. dans la chair, sont celles absorbant la plus grande quantité de HAP (somme de 15 HAP) par rapport au niveau de contamination du sol ($589,7 \pm 43,0$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w.). Parmi 4 variétés de pommes de terre étudiées, la pomme de terre de type « Désirée » (3 échantillons) présente la plus forte absorption de HAP avec des concentrations de $20,6 \pm 2,2$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. dans la peau et $10,5 \pm 1,3$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. dans la chair, pour un niveau de HAP de $978,0 \pm 69,2$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w. dans le sol. L'adsorption des HAP du sol est significativement dépendante de la variété de légume cultivé (Zohair, 2006). Pour les tomates à maturité provenant de Constanta en Roumanie, le niveau de HAP (somme de 15 HAP) retrouvé pour la variété « Campbell 146 » est de $5,29$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. et de $2,98$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. pour la variété « cœur de bœuf » (Soceanu, 2012).

Influence du stade de maturité sur le contenu en HAP dans les fruits et légumes

Le niveau en HAP dans les fruits et légumes ne semble pas dépendre de leur stade de maturité. Le contenu en HAP (somme de 8 HAP lourds) mesuré dans les variétés de tomates « cœur de bœuf » cultivées dans une zone urbaine est d'environ 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les tomates à maturité et de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. pour les tomates non arrivées à maturité (Soceanu, 2012). Le contenu en HAP (somme de 15 HAP) semble plus faible pour les pommes ($0,6$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w.), les cerises ($5,1$ $\mu\text{g}/\text{kg}$), les nectarines ($3,3$ $\mu\text{g}/\text{kg}$) et les abricots ($0,4$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w.) non mûrs ou à quasi maturités comparé aux fruits à maturité ($5,2$, $7,7$, $7,6$ et $3,9$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivement).

Néanmoins, la relation entre le contenu en HAP et le stade de maturité n'a pas pu être établie par les auteurs (Soceanu, 2016).

Différences de contenus en HAP entre les fruits et les légumes

Les fruits et les légumes-fruits, tels que les tomates, ont généralement un plus faible contenu en HAP que les légumes. Dans les fruits et les tomates étudiés dans la littérature (excepté ceux présentés pour la Chine) les teneurs en HAP lourds (somme de 8) excèdent rarement 4 µg/kg. Par contre, dans les légumes tels que les épinards et le navet, les HAP lourds peuvent être retrouvés autour de 6 µg/kg (Ashraf, 2012 ; 2013). Le contenu total en HAP (somme de 10 HAP) varie entre 4,38 et 17,93 µg/kg w.w. pour les légumes contre 3,77 à 4,05 µg/kg w.w. pour les fruits provenant du Brésil (Camargo, 2003).

Distribution des HAP dans les fruits et légumes

Les HAP semblent s'accumuler préférentiellement au niveau de la peau des fruits et des légumes. Le niveau en HAP (somme de 15 HAP) relevé dans la pulpe (échantillons extraits en triplicat) de banane ($0,72 \pm 0,01$ µg/kg w.w.) est environ 8 fois plus faible que celui présent dans la peau ($5,51 \pm 0,24$ µg/kg w.w.) (Soceanu, 2016). Concernant les carottes « Major » et « Autumn Kings » provenant de fermes biologiques anglaises, le contenu en HAP total (somme de 15 HAP) dans la peau est environ 4 fois plus important que celui rencontré dans leur chair respective (Zohair, 2006). Pour 4 variétés de pommes de terre, les concentrations en HAP (somme de 15 HAP) dans la peau sont environ deux fois supérieures à celles de la chair (Zohair, 2006). L'épluchage des pommes de terre cultivées en Egypte permet de réduire fortement le niveau de 7 HAP susceptibles d'être cancérigènes (somme de 7 composés) de 3,6 à 0,2 µg/kg ce qui représente une perte d'environ 93 % (Abou-Arab, 2014). Le contenu lipidique de la peau est généralement plus important que celui de la chair, ce qui peut expliquer l'accumulation préférentielle des contaminants hydrophobes dans la peau des végétaux (Chiou, 2001).

Dans les fruits et légumes, les HAP légers avec des masses moléculaires comprises entre 128 et 202 g/mol sont rencontrés en plus fortes concentrations que les HAP lourds ($MM \geq 228$ g/mol) (Bishnoi, 2002 ; Jánská, 2006). Excepté pour le kiwi et le pamplemousse (Soceanu, 2016), les contenus en HAP lourds (somme de 8) rencontrés dans les fruits (Bishnoi, 2002 ; Jánská, 2006 ; Soceanu, 2016) sont inférieurs à 6 µg/kg w.w., tandis que la valeur de 8 µg/kg w.w. est fréquemment atteinte pour les HAP légers (somme de 8). Pour les fruits (pomme, sapota, papaye, raisin et ananas) provenant de Mumbai en Inde, les HAP possédant 2 et 3 cycles représentent 60 à 85 % du contenu total en HAP (somme de 14 HAP) (Bishnoi, 2006). En ce qui concerne les légumes, excepté pour certaines études réalisées en Chine, les quantités en HAP lourds (somme de 8) excèdent rarement 8 µg/kg tandis que les niveaux en HAP légers (somme de 8 HAP) atteignent jusqu'à 31 µg/kg w.w. dans le chou (Jánská, 2006) et environ 19 µg/kg w.w. dans le taro (Bishnoi, 2002 ; Wang 2012). Pour l'épinard et la courge blanche (légumes aériens), les HAP légers (sans l'acénaphène) représentent environ 89 % du contenu total en HAP (16 composés) et ce pourcentage atteint 95 % pour la pomme de terre et le radis (légumes souterrains) (Tuteja, 2011). Les HAP légers (somme de 8) constituent plus de 75 % du contenu total en HAP (somme de 15 HAP) pour les carottes ainsi

que pour la peau et la chair des pommes de terre (Zohair, 2006). Cette prédominance des HAP légers peut être expliquée par leur mobilité plus importante dans l'air et le sol ainsi que par leur solubilité plus élevée dans l'eau ; cela induit une adsorption préférentielle des HAP légers par rapport aux HAP lourds sur les végétaux (Bishnoi, 2006).

1.3.5.2. Impact de l'emballage et du stockage sur le contenu en hydrocarbures aromatiques dans les aliments

La contamination de certains produits alimentaires bruts par les hydrocarbures aromatiques peut se produire pendant le transport ou le stockage. Les niveaux de HAP dans la cachaça, une boisson obtenue à partir de la canne à sucre, conservée 24 mois à température ambiante dans différents emballages ont pu être comparés. La quantité de HAP (somme de 16 HAP) retrouvée dans la cachaça stockée dans des contenants en polyéthylène est significativement plus élevée (49,24 µg/L) que celle observée après conservation dans des bouteilles en verre (6,89 µg/L) (Machado, 2014). Néanmoins, les emballages en polyéthylène téréphtalate semblent également être responsables d'une sorption de BaP. La concentration en BaP dans l'huile de tournesol stockée dans des récipients de polyéthylène téréphtalate diminue de 37,1 à 25,9 µg/kg, après 50 h de stockage (écart-type de 1,2 µg/kg) (Šimko, 2006). Au cours du stockage à température ambiante, la présence d'un grand volume d'air dans les récipients fermés, peut induire une formation de HAP par oxydation d'un produit alimentaire comme l'huile. Dans des récipients avec 50 cm³ d'air, les niveaux en fluorène et en naphtalène dans l'huile sont supérieurs, de 72 et 16 % respectivement, à ceux retrouvés pour des échantillons stockés avec 11 cm³ d'air (Guillén, 2008).

1.3.5.3. Impact des procédés de cuisson sur le contenu en hydrocarbures aromatiques dans les aliments

Au cours de la cuisson, des hydrocarbures aromatiques peuvent également être produits par pyrolyse de la matière organique (protéines, lipides, stéroïdes, et sesquiterpènes) contenue dans les végétaux et les tissus animaux (Chen, 2001 ; Britt, 2003 ; Francis, 2012). La formation des hydrocarbures aromatiques pendant les processus de cuisson dépend du type d'aliment, de la température de cuisson, de la présence d'oxygène, de la durée et du type de cuisson. La comparaison de différents procédés de cuisson (figure 10, Perelló, 2009), durant entre 5 et 7 min, montre que les concentrations en HAP (somme de 16 HAP) sont plus importantes pour le merlu et le poulet rôtis (19,26 et 27,93 µg/kg de masse fraîche respectivement pour des températures de cuisson de 187 °C et 170 °C) que pour le merlu et le poulet frits (13,30 et 14,96 µg/kg de masse fraîche respectivement pour des températures de cuisson de 119 °C et 174 °C) ou grillés (respectivement 6,58 et 6,25 µg/kg de masse fraîche pour des températures de cuisson de 224 °C et 221 °C).

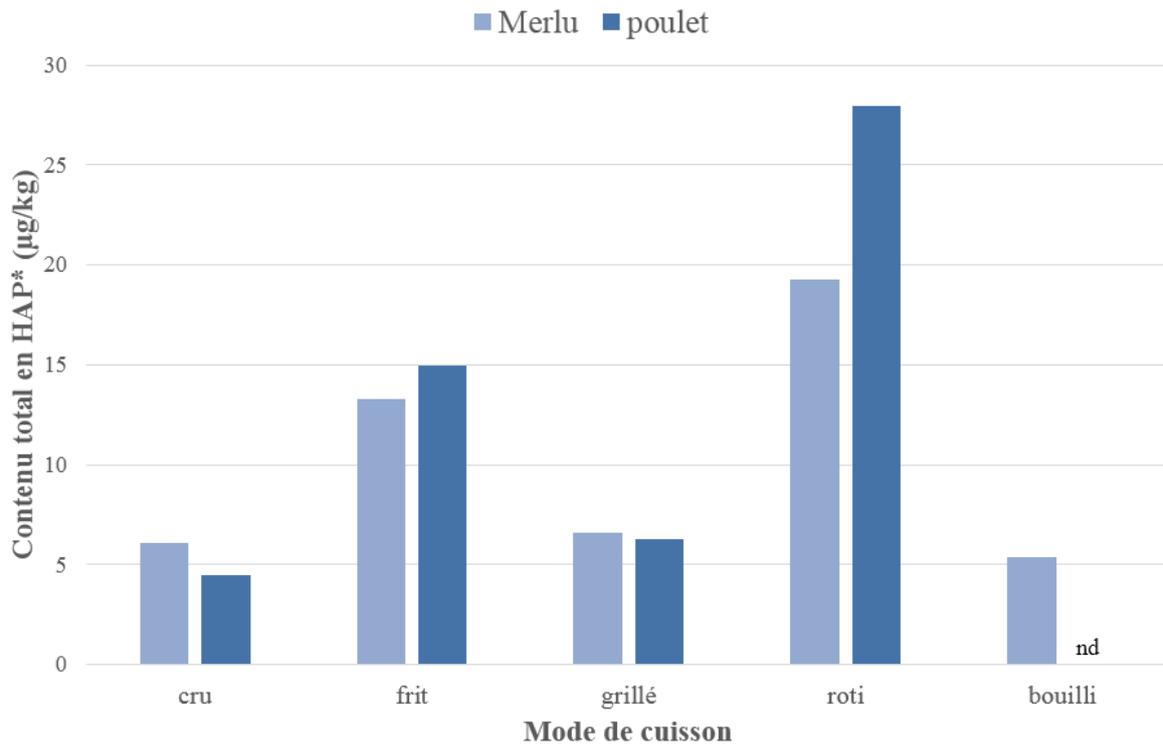


Figure 10 : Evolution du contenu en HAP (µg/kg) en fonction du mode de cuisson

d'après les résultats de Perelló *et al.* 2009 (pas d'écart-type disponibles)

* somme de 16 HAP exprimée en µg/kg de masse fraîche

nd : non déterminé

Le niveau maximal de benzène retrouvé dans les viandes et les produits carnés séchés, fumés, ou fermentés (environ 6 µg/kg) est 5 fois plus élevé que dans ces produits crus (1,25 µg/kg). De même, les poissons crus gras (9 µg/kg) ou non gras (2 µg/kg) ont un contenu 8 à 38 fois moins important que les poissons fumés (76 µg/kg) (Medeiros, 2012).

Une autre étude montre que 3 fois plus de HAP (526,8 µg/kg) sont retrouvés dans le magret de canard fumé à 60 °C pendant 3 h, qu'après un fumage de 30 min (154,6 µg/kg) (Chen, 1997). Pendant la cuisson au barbecue, les graisses tombées sur la source de chaleur génèrent des fumées concentrées en hydrocarbures aromatiques. Ces fumées sont les principales responsables du transfert d'hydrocarbures aromatiques sur les denrées alimentaires préparées au barbecue (Viegas, 2012 ; Saint-Aubert, 1992). L'utilisation de charbon de bois de noix de coco permet la réduction de la formation des HAP dans les aliments carnés gras par rapport à l'utilisation du charbon de bois (Viegas, 2012).

Les fruits et les légumes sont principalement consommés crus, mais quelques-uns nécessitent une étape de cuisson avant d'être consommés ; c'est notamment le cas pour la pomme de terre. L'ébullition, qui est la procédure la plus courante pour la cuisson des légumes, peut entraîner une diminution du contenu total en HAP. Par exemple, la quantité en HAP (somme de 15 HAP) est réduite de 88% pour les pommes de terre et 81% pour les épinards après ébullition (figure 11, Abou-Arab, 2014).

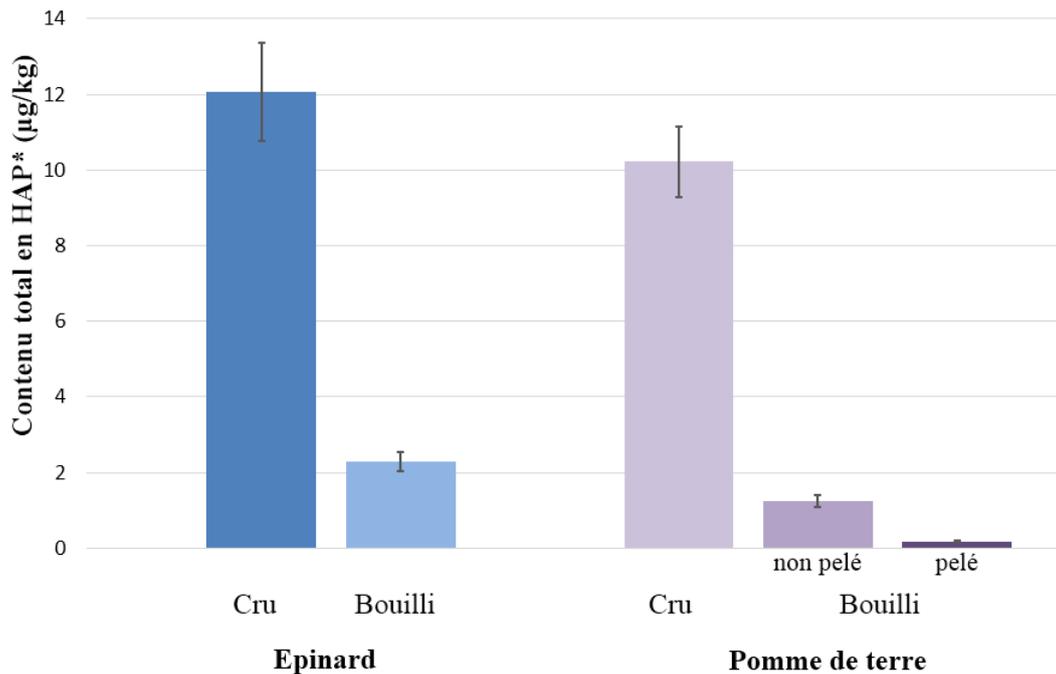


Figure 11 : Evolution du contenu en HAP (µg/kg) des épinards et des pommes de terre après cuisson par ébullition d'après les résultats de Abou-Arab et al. 2014

* somme de 15 HAP

D'autres procédés de transformation peuvent également être à l'origine de la formation d'hydrocarbures aromatiques. Dans la province de Fujian, en Chine, les différentes étapes de transformation du thé noir (flétrissage, laminage, fermentation et séchage) augmentent la teneur en HAP (somme de 16) de 132 µg/kg de masse sèche pour les feuilles de thé fraîches à 9650 µg/kg de masse sèche à la fin du procédé (Lin, 2004). Pour les pommes de terre, le contenu en HAP (somme de 16 HAP) est 9 fois plus important après friture (28,69 µg/kg w.w) qu'après ébullition (3,15 µg/kg w.w) (Perelló, 2009).

La formation de composés aromatiques, tels que le benzène, est également possible par décarboxylation oxydative du benzoate de sodium, de potassium ou de calcium (figure 12) en présence d'acide ascorbique, qui favorise la formation de radicaux hydroxyles. Ces deux substances sont utilisées comme additifs alimentaires, ou peuvent être d'origine naturelle dans les aliments et les boissons (Medeiros, 2010).

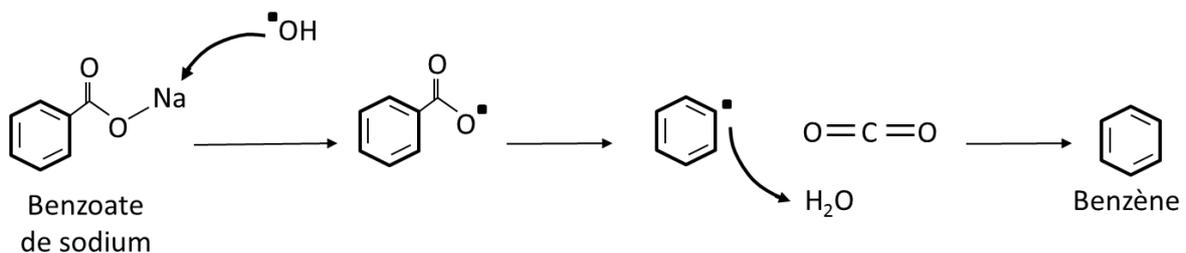


Figure 12 : Formation du benzène à partir du benzoate de sodium (mécanisme proposé par Gardner et Laurence, 1993)

1.3.5.4. Exposition humaine aux hydrocarbures aromatiques via l'alimentation

La présence d'hydrocarbures aromatiques dans les aliments expose les consommateurs à l'ingestion de ces composés potentiellement toxiques.

En République tchèque, l'apport journalier alimentaire en HAP a été estimé pour certains fruits et légumes. Il varie de 448,6 ng/jour pour les pommes à 13,6 ng/jour pour le chou, avec des proportions de benzo(a)pyrène respectivement égales à 2,3 et 0,1 ng/jour (Jánská, 2006). L'exposition aux HAP par voie alimentaire a également été estimée en Catalogne pour des personnes d'âge et de sexe différent ; ce sont les adolescents de sexe masculin qui absorbent les plus grandes quantités de HAP avec 8,3 µg/jour. En revanche, l'exposition alimentaire aux HAP est moins importante chez les personnes âgées de sexe féminin avec 2,7 µg/jour. Cette différence est due à leurs habitudes alimentaires : les viandes et produits carnés transformés, fortement contaminés par les HAP, représentent respectivement 78 et 38 % de l'alimentation des adolescents masculins et des personnes âgées de sexe féminin (Martorell, 2010).

Les hydrocarbures aromatiques étant des composés ubiquitaires, l'Homme est exposé quotidiennement à ces composés par voie alimentaire. Le sous-chapitre suivant s'intéresse donc aux voies métaboliques utilisées par les hydrocarbures aromatiques ainsi qu'à leur potentielle toxicité par voie orale.

1.4.Exposition et métabolisme des hydrocarbures aromatiques : potentielle toxicité par voie orale

1.4.1. Les BTEX

Parmi les BTEX, seul le benzène est reconnu comme cancérigène pour l'Homme par l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC). En ce qui concerne le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes, il n'existe pas de preuves suffisantes pour établir leur cancérigénicité chez l'Homme. En effet, l'exposition à ces composés s'effectue simultanément à d'autres substances dangereuses (IARC, 2000).

1.4.1.1. Métabolisme des BTEX

Le toluène, l'éthylbenzène et le xylène sont facilement éliminés de l'organisme, soit directement dans l'air expiré, soit par les urines après avoir été métabolisés. Après absorption par voie orale, respiratoire et cutanée, le benzène est rapidement distribué dans l'organisme. Il est surtout retrouvé dans les tissus riches en lipides comme les tissus adipeux, le cerveau, les reins, le sang et le foie. Après absorption, le benzène est principalement métabolisé au niveau du foie et de la moelle osseuse. Les transformations biochimiques, présentées en figure 13, sont celles reliées aux effets toxiques du benzène.

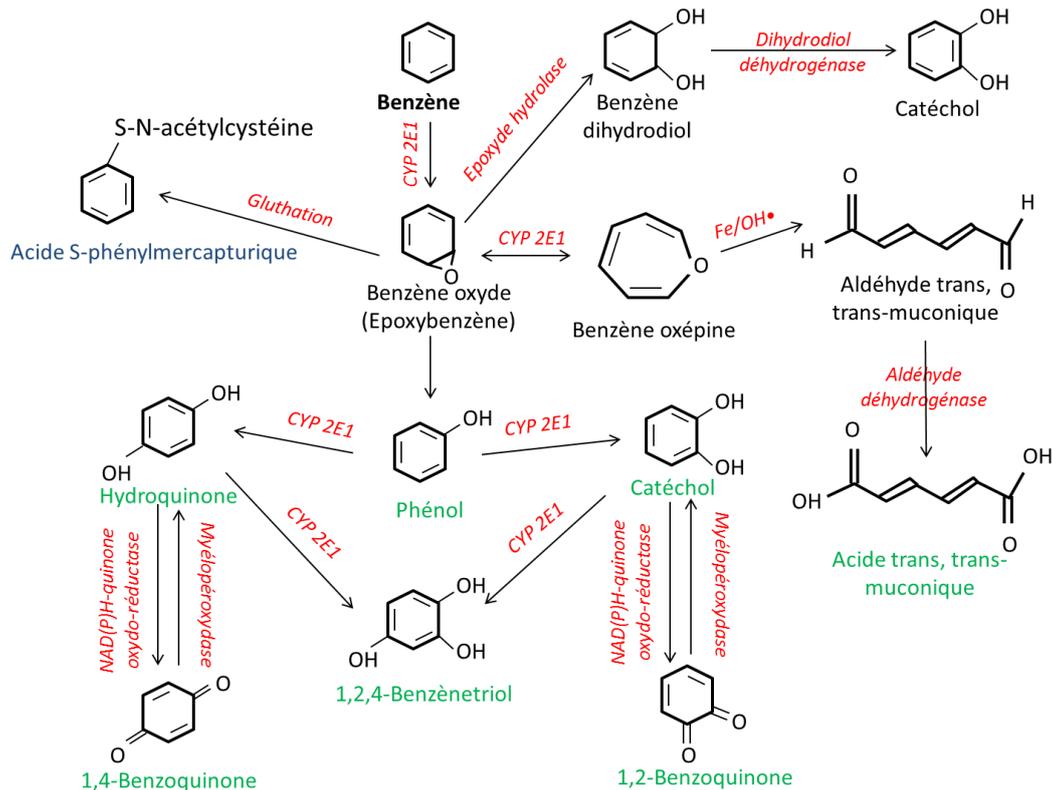


Figure 13 : Métabolisme du benzène

CYP 2E1 le cytochrome P450, en bleu un métabolite urinaire et en vert les métabolites urinaires éliminés sous forme de conjugués glucuronide ou sulfate (INRS FT 49)

La première réaction de métabolisation subie par le benzène lorsqu'il pénètre dans l'organisme est une catalyse par le cytochrome P450 2E1 (CYP 2E1). L'absence du gène CYP 2E1 codant pour le cytochrome P450 induit une métabolisation significativement réduite du benzène par rapport aux individus exprimant le gène, après 6 heures passées dans une atmosphère contaminée par le benzène (200 ppm) (Valentine, 1996). L'absence de génotoxicité et de cytotoxicité du benzène dans la moelle osseuse, le sang et les tissus lymphoïdes des souris sans CYP 2E1 montre que son métabolisme par le CYP2E1 est nécessaire au développement de sa toxicité (Valentine, 1996). Les métabolites, hydroquinone et acide *trans,trans*-muconique, responsables des effets toxiques sont formés à partir de l'époxybenzène (INRS, FT 49, figure 13).

1.4.1.2. Toxicité des BTEX chez l'Homme

L'ensemble des BTEX induisent des effets toxiques chez l'Homme, comme l'indique le tableau 3. Néanmoins, très peu de données sont disponibles sur la toxicité de ces composés par ingestion, en raison des difficultés liées à la réalisation d'essais sur l'Homme. Parmi les BTEX, le benzène est reconnu comme étant le plus toxique.

Tableau 3 : Effets toxiques des BTEX chez l'Homme

	benzène	toluène	éthylbenzène	xylènes
Toxicité aiguë	-Voie orale : troubles digestifs	-Voie orale : troubles digestifs, dépression du système nerveux central, pneumopathie	-Voie orale : fausses routes, atteinte bronchique	-Voie orale : troubles digestifs, dépression système nerveux central, pneumopathie
	-Voie cutanée : irritations cutanées	-Voie cutanée : irritation	-Voie cutanée : rougeur	-Voie cutanée : irritation cutanée
	-Voie respiratoire : effets neurologiques centraux	-Voie respiratoire : irritation des voies aérienne, affection réversible du système nerveux central	-Voie respiratoire : irritation des voies aérienne, dépression du système nerveux ventral	-Voie respiratoire : effets neurologiques réversibles, irritation des voies aériennes
Toxicité chronique	Troubles neuropsychiques, atteinte du système hématopoïétique	Modifications hématologiques, troubles neuropsychiques, toxicité neurosensorielle	Troubles neuropsychiques, perturbations hématologiques et hépatiques	Troubles neuropsychiques
Classement carcinogénique	Cancérogène pour l'homme groupe 1 CIRC (1982)	Inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme groupe 3 CIRC (1999)	Suspecté cancérogène groupe 2 B CIRC (2012)	Inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme groupe 3 CIRC (1999)

L'inhalation de benzène induit une augmentation du risque de développer des leucémies myéloïdes aiguës et des modifications hématologiques à partir de faibles doses (Johnson, 2007 ; Lan, 2004). Une diminution des globules blancs, des lymphocytes et des granulocytes est observée chez des travailleurs, de la région de Tianjin en Chine, ayant inhalé moins d'1 ppm de benzène au cours de l'année (Lan, 2004). Très peu d'études décrivent l'impact de l'absorption de benzène par voie orale. A la fin du XIX^{ème} siècle, le benzène était administré sous forme de capsules de gélatine afin de traiter la leucémie chez l'homme. Le benzène est connu pour induire une leucopénie, c'est-à-dire une diminution des globules blancs (leucocytes) dont la production est excessive chez les personnes atteintes par la leucémie (Huff, 1989 ; Boardman, 1915). Le traitement (3 à 5 g de benzène par jour) induisait, dans un premier temps, une amélioration de l'état des patients leucémiques avec une diminution de la taille de la rate et des ganglions lymphatiques, une augmentation du nombre de globules rouges et une diminution du nombre de leucocytes. Puis, quelques mois après le début du traitement survenaient des complications telles que des troubles gastro-intestinaux, des maux de tête, des éruptions cutanées, l'irritation des bronches et des reins, des anémies et des hémorragies aboutissaient finalement à la mort des patients (Huff, 1989 ; Boardman, 1915).

1.4.1.3. Toxicité des BTEX chez les animaux

Les animaux, et plus particulièrement les rongeurs, sont utilisés pour déterminer la dose qui absorbée par voie orale provoque la mort de 50% de la population animale (DL 50). Ces valeurs sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Données de toxicité aigüe pour l'absorption des hydrocarbures aromatiques monocycliques par voie orale

Composés	Toxicité aigüe par voie orale DL 50 ^a
Benzène	50-500 mg/kg (Homme) 3306 mg/kg (rat) ^a 4700 mg/kg (souris) ^a
Toluène	2600-7500 mg/kg (rat) ^a
Ethylbenzène	3500-5460 mg/kg (rat) ^a
Xylènes	3523-8600 mg (mélange de xylènes)/kg (rat) ^a

^a : valeurs provenant de National Institutes of Health (NIH)

DL 50 : dose létale pour 50 % d'une population

L'administration de benzène par ingestion à des rats et des souris provoque des tumeurs malignes et des carcinomes. Les effets cancérigènes du benzène par ingestion varient selon les animaux testés. L'ingestion de benzène est associée aux carcinomes de la glande de Zymbal et du pré-estomac chez les rats et les souris. Seuls les rats sont affectés par les carcinomes de la cavité buccale et les tumeurs du poumon ne sont retrouvées que chez la souris (Maltoni, 1989 ; Huff, 1989).

Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a estimé que les études épidémiologiques et animales apportent des preuves suffisantes de la cancérigénicité du benzène, c'est pourquoi il est classé comme cancérigène pour l'Homme (1982) où il est notamment responsable d'hémopathies malignes et de lymphopathies.

1.4.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

En raison de la multitude des sources d'émission, les HAP se retrouvent dans l'environnement sous forme de mélanges. Il est ensuite impossible d'effectuer des études épidémiologiques sur un HAP en particulier, c'est pourquoi les effets toxicologiques individuels de ces composés restent souvent inconnus. Les HAP les plus lourds, comportant 4 à 6 cycles aromatiques sont stables et ont un grand potentiel cancérigène. Le benzo(*a*)pyrène, qui comporte 5 cycles, est notamment classé comme cancérigène avéré par le CIRC, le cyclopenta(*cd*)pyrène (5 cycles), le dibenzo(*ah*)anthracène (5 cycles) ainsi que le dibenzo(*al*)pyrène (6 cycles) sont classés dans le groupe des cancérigènes probables, et 11 autres HAP lourds sont des cancérigènes possibles. Les HAP légers (2 à 3 cycles) sont, quant à eux, génotoxiques et

induisent une toxicité aigüe à faible dose (Purcaro, 2013 ; Dégremont, 2009, Tuháčková, 2001 ; Kim, 2013).

1.4.2.1. Métabolisme des HAP

Les HAP pénétrant dans l'organisme humain interagissent avec les mécanismes cellulaires par fixation directe sur les sites lipophiles ou par l'intermédiaire de leurs métabolites. Lors de la métabolisation, les transformations biochimiques mises en œuvre pour tenter d'éliminer les HAP de l'organisme entraînent une augmentation de la polarité des composés par l'ajout de groupements polaires (figure 14 INRS FT 204 ; Purcaro, 2013). Les métabolites, plus hydrophiles que les HAP, se fixent sur des structures cellulaires telles que les protéines ou l'ADN et peuvent induire des tumeurs par la formation d'adduits (Ifremer environnement, Purcaro, 2013). Les adduits à l'ADN entraînent des mutations au niveau des gènes. L'évolution de la cellule vers le stade cancéreux dépend de la capacité individuelle à réparer les lésions à l'ADN. Si l'organisme n'est pas capable d'effectuer la réparation enzymatique des adduits ou d'induire la mort cellulaire par apoptose, alors la cellule devient cancéreuse. Les adduits à l'ADN participent donc à l'augmentation du risque de développement de cancers (van Schooten, 1995 ; Kim, 2013).

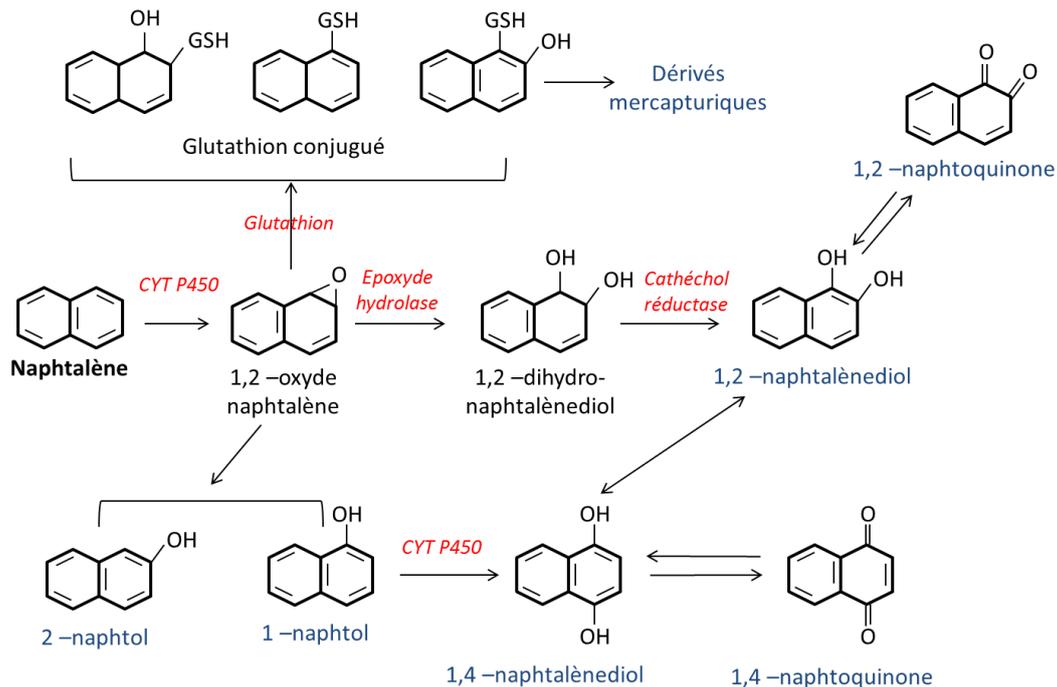


Figure 14 : Métabolisme du naphthalène

CYP P450 : cytochrome P450, en bleu les métabolites urinaires (INRS FT 204)

1.4.2.2. Toxicité des HAP chez l'homme

Les effets néfastes des HAP sur la santé humaine dépendent de la voie et de la durée d'exposition, de la concentration, de la toxicité ainsi que de l'âge, de l'état de santé et des habitudes, notamment tabagiques et alimentaires, de l'individu (Kim, 2013).

Les études épidémiologiques portant sur les HAP sont majoritairement réalisées en milieu professionnel, cokerie, raffinerie ou fonderie, et sont représentatives des effets de mélanges de HAP par inhalation (Kim, 2013, Okona-Mensah, 2005 ; Thériault, 1984 ; Blot, 1983 ; Armstrong, 1994 ; Chau, 1993). Ces études rapportent un risque accru de développement de cancers au niveau des poumons, du colon, de l'estomac ou encore de la vessie chez les travailleurs exposés aux HAP (Kim, 2013 ; Okona-Mensah, 2005 ; Thériault, 1984 ; Blot, 1983 ; Armstrong, 1994 ; Chau, 1993).

Il n'existe aucune donnée épidémiologique sur l'effet de l'absorption des HAP par voie digestive chez l'Homme. Néanmoins, la contamination de l'organisme par les hydrocarbures aromatiques peut être étudiée par le suivi de métabolites urinaires. L'excrétion urinaire de 1-hydroxypyrene est 4 à 12 fois plus importante lorsque le régime alimentaire se compose d'aliments grillés ou frits que lorsque l'alimentation est principalement constituée de fruits et de légumes. Cette différence s'explique par la présence de 100 à 250 fois plus de benzo(a)pyrène dans les repas contenant des aliments grillés et frits (2267 à 5613 ng/repas) que ceux comprenant des fruits et légumes (22 à 47 ng/repas) (Buckley, 1992).

1.4.2.3. Toxicité des HAP chez l'animal

Chez l'Homme, l'impact des HAP par voie alimentaire reste peu documenté, mais de nombreuses données existent pour les animaux. La majorité des études porte sur le BaP, qui a été le premier HAP à être identifié comme cancérigène, et qui est souvent utilisé comme marqueur de cancérogénicité pour les mélanges de HAP.

Des études sur les animaux ont notamment permis de déterminer les doses létales (tableau 5).

Tableau 5 : Données de toxicité aigüe pour l'absorption d'hydrocarbures aromatiques polycycliques par voie orale

Composés	Toxicité aigüe par voie orale DL 50 ^a
Naphthalène	490 mg/kg (rats) 2200 (male) - 2400 (femelle) mg/kg (rat Sherman) 1200 mg/kg (cobayes)
Anthracène	18000 mg/kg (souris)
Phénanthrène	700-1000 mg/kg (souris)
Fluoranthène	2000 mg/kg (rats)
Benzo(a)pyrène	>1600 mg/kg (souris)

^a : valeur de l'organisation mondiale de la santé (WHO 2006)

DL 50 : dose létale pour 50 % d'une population

Espèces aquatiques

Des travaux sur l'exposition d'espèces piscicoles comme les flets (en milieu naturel) et le médaka japonais (en laboratoire) aux sédiments de l'estuaire de Seine ont démontré le caractère mutagène et cancérogène ainsi que le potentiel embryotoxique et tératogène de composés organiques tels que les HAP de haut poids moléculaires contenus dans les sédiments (Dégremont, 2009). Les conséquences observées sur les flets sont la diminution de l'intégrité de l'ADN, l'augmentation de la fréquence des tumeurs hépatiques et de la mortalité. Le caractère génotoxique des sédiments exerce également une pression sélective au profit des individus les plus résistants et donc une diminution de la diversité génétique. De plus, les étapes de réparation de l'ADN ont un coût énergétique important et se font donc au détriment d'autres processus biologiques comme la croissance, la fécondité ou la fertilité (Dégremont, 2009 ; White, 1999 ; Cachot, 2006).

Les hydrocarbures aromatiques sont principalement retrouvés dans le foie des poissons, comme pour la sole, ce qui provoque le développement de tumeurs hépatiques. Pour les mollusques bivalves, tels que la moule bleue, les hydrocarbures aromatiques s'accumulent au niveau des branchies et dans les organes digestifs induisant la formation d'adduits à l'ADN (Landahl, 1990 ; Skarphéðinsdóttir, 2007).

Rongeurs

La consommation de benzo(a)pyrène affecte la prise de poids ainsi que le développement neurologique des souriceaux allaités par des souris auxquelles sont administrés par voie orale 2 et 20 mg/kg de benzo(a)pyrène. Les petits ainsi exposés au benzo(a)pyrène par la lactation ont une masse plus importante et montrent plus de difficultés de motricité par rapport aux souriceaux non exposés (Bouayed, 2009). Les rats exposés (gavage) au BaP (0,15 mg/kg) dissous dans une solution de caféine développent plus de tumeurs du pré-estomac que ceux contaminés *via* l'alimentation (Altromin). L'exposition à 39, 18 et 6 mg/kg/an de BaP dissous dans une solution à 1,5% de caféine provoque la formation de papillomes du pré-estomac chez respectivement 22%, 39%, et 17% des rats (Brune, 1981).

Concernant l'absorption de BaP (10 mg/kg) par voie orale, les adduits à l'ADN sont 2,5 fois plus présents dans les globules blancs que dans l'estomac, ce qui montre que le BaP passe facilement à travers la muqueuse gastro-intestinale. L'alimentation est donc une voie d'absorption et de contamination importante pour le BaP (Godschalk, 2000). Certains aliments, selon leur hydrophobicité et leur composition, peuvent modifier l'absorption des HAP au niveau de l'intestin. Ainsi, le carbone ou encore la quercétine et l'acide chlorogénique présents dans les légumes verts réduisent le transfert du benzo(a)pyrène à travers la paroi intestinale alors que les aliments gras facilitent l'absorption intestinale de cet HAP (Purcaro, 2013 ; Van Veld, 1987 ; Stavric, 1994).

Le Comité scientifique de l'alimentation humaine considère que les preuves de mutagénicité/génotoxicité, sur des cellules somatiques animales *in vivo*, sont suffisantes pour considérer le benzo(a)pyrène, le dibenzo(ah)anthracène, le benzo(a)anthracène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(j)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, le chrysène, le

benzo(*ghi*)pérylène, et l'indéno(1,2,3-*cd*)pyrène comme potentiellement génotoxiques et cancérigènes pour l'Homme *via* l'alimentation (EFSA, 2008).

1.5. Réglementations concernant la présence d'hydrocarbures aromatiques dans l'eau de consommation et les aliments

La potentielle toxicité des hydrocarbures aromatiques par voie orale s'est traduite par l'existence de normes pour les eaux destinées à la consommation ainsi que pour les aliments.

1.5.1. L'eau

Les limites de pollution de l'eau potable par le benzène varient en fonction des pays. La norme européenne fixe une limite de 1 µg/L alors que les valeurs pour l'US EPA (Environmental Protection Agency) et l'OMS sont respectivement de 5 µg/L et 10 µg/L. L'US EPA donne également des concentrations maximales légales (MCL) dans l'eau pour le toluène : 1000 µg/L, l'éthylbenzène : 700 µg/L et les xylènes : 10000 µg/L. L'OMS (2006) indique quant à elle, des valeurs guides pour ces mêmes composés qui sont de 700 µg/L pour le toluène, 300 µg/L pour l'éthylbenzène et 500 µg/L pour les xylènes. En Europe, à l'exception du benzène, il n'existe pas de norme pour les BTEX.

En France, l'arrêté du 11 janvier 2007 portant sur l'eau destinée à la consommation humaine (sauf l'eau minérale naturelle) impose que la somme de quatre HAP : le benzo(*b*)fluoranthène, le benzo(*k*)fluoranthène, le benzo(*ghi*)pérylène et l'indéno(1,2,3-*cd*)pyrène, soit en concentration inférieure à 0,1 µg/L et fixe la limite de qualité pour le benzo(*a*)pyrène à 0,01 µg/L. Pour l'eau potable, l'OMS fixe une teneur limite de 0,2 µg/L pour six HAP (fluoranthène, benzo(*b*)fluoranthène, benzo(*k*)fluoranthène, benzo(*a*)pyrène, benzo(*ghi*)pérylène et indéno(1,2,3-*cd*)pyrène) avec une valeur limite pour le benzo(*a*)pyrène de 0,7 µg/L (WHO. Guidelines for drinking-water quality, third edition – Chemical fact Sheets, p429).

1.5.2. Les aliments

D'après l'ensemble des données collectées jusqu'en juin 1991, Santé Canada a pu évaluer la dose journalière admissible (DJA) exprimée en fonction du poids corporel (p.c.), qui représente ce qu'une personne pourrait ingérer quotidiennement au cours de sa vie entière sans effet nuisible. Les valeurs obtenues pour les xylènes et le toluène sont respectivement de 1,5 et 0,22 mg/kg p.c./jour (Santé Canada, 1996).

L'institut national de la santé publique et de l'environnement des Pays-Bas (RIVM: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu) a évalué la dose virtuellement sûre (VSD) pour le benzo(*a*)pyrène, sa VSD est de 5 ng/kg p.c./jour. Cette dose absorbée par voie orale provoque un cas supplémentaire de cancer pour 1 million de personnes exposées et est déterminée à partir des études de cancérigénicité chez les animaux (Afssa, 2003).

Dans le cadre de l'UE, les directives du conseil 88/388/EEC du 22 juin 1988 fixent pour le BaP, présent suite à l'utilisation d'exhausteurs de goût, une limite de 0,03 µg/kg dans les aliments et les boissons.

Selon le Règlement (CE) n° 208/2005 du 4 Février 2005, le benzo(a)pyrène peut être utilisé comme marqueur de la présence ainsi que des effets cancérigènes des HAP dans les aliments. Cette réglementation européenne impose des concentrations maximales en BaP (tableau 6) dans différents aliments.

Tableau 6 : Teneurs maximales (ML) pour le benzo(a)pyrène (Règlement CE n°208/2005)

Aliments	ML (µg/kg masse fraîche)
Huiles et graisses (sauf beurre de cacao)	2
Produits carnés fumés	5
Produits de la pêche fumés (sauf mollusques bivalves, chair brune de crabe, homard et crustacés semblables)	5
Crustacés et céphalopodes non fumés (avec les mêmes exclusions que précédemment)	5
Poissons non fumés	2
Mollusques bivalves	10
Aliments pour nourrissons et enfants en bas âge	1

La toxicité des aliments contaminés par des mélanges de HAP peut être évaluée grâce à l'application de facteurs d'équivalence toxique (TEF) pour chaque composé. La toxicité des aliments évaluée avec les facteurs d'équivalence toxique est exprimée en quantité équivalente toxique (TEQ) (Nisbet, 1992 ; Afssa, 2003). Le TEF est un facteur de pondération établi par rapport à un composé de référence considéré comme étant le plus toxique de la famille. Les TEF sont utilisés pour exprimer la toxicité d'un produit contaminé par un mélange de polluants. Pour les HAP, ces facteurs sont établis à partir du BaP, qui a été le premier HAP reconnu comme cancérigène et qui sert de référence ; le TEF appliqué à ce composé est donc de 1 (Afssa, 2003 ; Nisbet, 1992 ; Okona-Mensah, 2005). Les facteurs d'équivalence toxique pour les HAP prioritaires décrits par l'US-EPA sont présentés dans le tableau 7. Le facteur d'équivalence toxique de 5 attribué par Nisbet *et al.* pour le dibenzo(ah)anthracène a été réévalué par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa). Cet organisme indique que le potentiel carcinogène du dibenzo(ah)anthracène (DBahA) est équivalent à celui du BaP et donc qu'un facteur d'équivalence toxique de 1 est plus approprié pour le dibenzo(ah)anthracène. Le BaP et le DBahA sont les composés considérés comme étant les plus toxiques (TEF=1) suivi par l'indéno(1,2,3-cd)pyrène, le benzo(k)fluoranthène, le

benzo(*b*)fluoranthène et le benzo(*a*)anthracène (TEF=0,1). Les HAP les plus légers sont généralement associés à un TEF plus faible (0,001) que les HAP les plus lourds.

Tableau 7 : Facteurs d'équivalence toxique (TEF) pour les HAP prioritaires défini par l'US-EPA (Nisbet, 1992)

Composés	TEF
Naphtalène	0,001
Acénaphtylène	0,001
Acénaphène	0,001
Fluorène	0,001
Anthracène	0,01
Phénanthrène	0,001
Fluoranthène	0,001
Pyrène	0,001
Benzo(<i>a</i>)anthracène	0,1
Chrysène	0,01
Benzo(<i>a</i>)pyrène	1
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	0,1
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	1*
Benzo(<i>k</i>)fluoranthène	0,1
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	0,01
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	0,1

*valeur de l'Afssa (2003) pour le dibenzo(*ah*)anthracène

L'emploi de ces facteurs d'équivalence toxique a été remis en cause par le groupe d'étude sur les contaminants de la chaîne alimentaire (groupe CONTAM) de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Selon eux, l'application de ces facteurs ne permet pas une évaluation satisfaisante de la toxicité des aliments, en raison du manque de données sur la cancérogénicité orale des HAP pris individuellement (EFSA, 2008). Le groupe CONTAM préconise, à la place, la caractérisation du risque toxique des aliments à partir de HAP pour lesquels des données de cancérogénicité par voie orale sont disponibles. L'usage de la somme des benzo(*a*)pyrène, chrysène, benzo(*a*)anthracène et benzo(*b*)fluoranthène (HAP4) ou des benzo(*a*)pyrène, benzo(*a*)anthracène, benzo(*b*)fluoranthène, benzo(*k*)fluoranthène, benzo(*ghi*)perylène, chrysène, dibenzo(*ah*)anthracène et indéno(1,2,3-*cd*)pyrène (HAP8) est donc conseillé (EFSA, 2008).

Les hydrocarbures aromatiques sont des polluants considérés comme prioritaires, leur présence doit donc être surveillée dans l'ensemble des matrices environnementales. L'accumulation des hydrocarbures aromatiques au long de la chaîne alimentaire conduit à des niveaux élevés chez les omnivores, comme l'Homme, qui est au sommet de la chaîne alimentaire. L'ubiquité des hydrocarbures aromatiques et leur potentiel cancérogène pour

l'Homme nécessite de surveiller et d'évaluer l'apport de ces polluants *via* l'alimentation. Pour cela, les techniques d'extraction et d'analyse doivent être efficaces, reproductibles, sensibles, et adaptées aux matrices alimentaires afin d'estimer de façon fiable le contenu en BTEX et HAP dans les aliments.

1.6. Méthodes de détermination des hydrocarbures aromatiques

Le suivi global des hydrocarbures aromatiques dans les échantillons peut dans un premier temps être mis en œuvre à travers l'application de méthodes spectroscopiques. L'utilisation des caractéristiques de fluorescence, d'absorbance et de vibration spécifiques aux hydrocarbures aromatiques permet leur identification au sein de la matrice (Kumke, 1995 ; Pirali, 2006 ; Tommasini, 2016).

Les principales difficultés rencontrées lors du suivi des hydrocarbures aromatiques sont liées à leurs propriétés physiques (volatilité), leurs faibles concentrations et la complexité de la matrice environnementale, biologique ou alimentaire, dans laquelle ils sont contenus. La recherche individuelle plus précise des hydrocarbures aromatiques dans un échantillon requiert donc une méthode d'extraction permettant de récupérer spécifiquement les composés d'intérêt.

Détermination simultanée des BTEX et des HAP

Dans la littérature les méthodologies de dosage des hydrocarbures aromatiques sont nombreuses. Certaines stratégies ont permis l'analyse simultanée des BTEX et des HAP pour un nombre limité de matrices. La micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME) est notamment utilisée pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques contenus dans l'huile d'olive avec une fibre Divinylbenzène/Carboxen/Polydiméthylsiloxane (Vichi, 2005). Cependant, seuls les BTEX et les HAP jusqu'à quatre cycles aromatiques ont pu être identifiés. Au Brésil, une étude réalisée sur l'eau (de bouteille, de rivière et du robinet) utilise une étape de micro-extraction en phase solide en immersion directe (DI-SPME) suivie d'une étape de HS-SPME afin de détecter les BTEX et les HAP lourds (5 et 6 cycles) comme le dibenzo(*ah*)anthracène ou le benzo(*ghi*)perylène (Bianchin, 2012). Néanmoins, cette méthode ne peut s'appliquer qu'à des échantillons liquides.

Globalement, la différence de volatilité entre le groupe des BTEX et des HAP légers et celui des HAP lourds (plus de quatre cycles) nécessite l'utilisation de techniques d'extraction distinctes. Les principales méthodologies appliquées aux échantillons alimentaires et environnementaux seront présentées.

La présence des hydrocarbures aromatiques à faibles teneurs dans les échantillons peut nécessiter de compléter la procédure d'extraction par une étape de concentration afin d'obtenir une meilleure sensibilité. La séparation des composés extraits en mélange requiert l'utilisation d'un système résolutif. Cette séparation peut être effectuée au moyen d'une méthode chromatographique telle que la chromatographie liquide à hautes performances (HPLC) ou la chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'évaluation des quantités individuelles d'hydrocarbures aromatiques, présents à des concentrations de l'ordre du mg/kg ou du µg/kg dans les échantillons implique l'usage d'un détecteur suffisamment sensible, en aval du système de séparation chromatographique.

Contraintes expérimentales pour la préparation des échantillons

La manipulation d'échantillons contenant des hydrocarbures aromatiques nécessite certaines précautions. Les échantillons doivent notamment être protégés de la lumière car les hydrocarbures aromatiques sont photo-sensibles et peuvent être dégradés par photo-irradiation et oxydation (Mottier, 2000 ; Purcaro, 2013). Le chrysène et le benzo(*a*)anthracène ainsi que l'anthracène et le phénanthrène sont particulièrement affectés par la lumière et subissent une photodégradation importante (Tobiszewski, 2012 ; Niu, 2007). En raison de l'omniprésence des hydrocarbures aromatiques dans notre environnement, tout le matériel en contact avec l'échantillon doit être préalablement nettoyé avec un solvant afin de limiter la contamination. De plus, seuls les matériaux inertes comme l'aluminium, le verre et l'acier inoxydable peuvent être utilisés car les hydrocarbures aromatiques s'adsorbent sur les matières plastiques telles que le polyéthylène (Purcaro, 2013).

Pour les échantillons liquides non gras, dans lesquels les hydrocarbures aromatiques sont faiblement solubles, les composés organiques sont susceptibles de s'adsorber sur les parois de la verrerie ou sur les surfaces des cartouches utilisées pour l'extraction. L'ajout de petites quantités de solvants organiques (entre 1 et 25%) tels que le méthanol, l'acétonitrile ou le 2-propanol permet de minimiser la perte d'hydrocarbures aromatiques (Purcaro, 2013). En raison de la volatilité des hydrocarbures aromatiques, des pertes peuvent également se produire pendant les étapes d'évaporation qui sont fréquemment utilisées afin de concentrer l'échantillon en analytes d'intérêt. Les conditions drastiques d'évaporation doivent être évitées en particulier, pour les composés les plus volatils, tels que les BTEX.

Pour certaines de ces matrices, des méthodes standardisées pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques sont disponibles. En ce qui concerne les fruits et les légumes, aucune méthode standardisée n'est rapportée dans la littérature. Pour ces matrices, une synthèse plus exhaustive des méthodologies permettant la détermination des hydrocarbures aromatiques sera apportée.

1.6.1. Méthodes d'extraction

Les méthodes les plus communément utilisées pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques dans les aliments sont des techniques d'extraction par solvant parmi lesquelles se trouvent le Soxhlet ainsi que l'extraction liquide-liquide (LLE) ou solide-liquide (SLE), pouvant être assistées par les ultrasons (UAE), la pression (PLE) ou les micro-ondes (MAE). Ces techniques d'extraction par solvant sont faiblement sélectives et requièrent généralement une étape de purification qui peut être réalisée par extraction sur phase solide (SPE) ou par chromatographie d'exclusion. La présence des hydrocarbures à l'état de traces dans les échantillons ainsi que les quantités importantes de solvants mises en jeu au cours des extractions par un liquide nécessitent, généralement, de concentrer l'extrait en composés d'intérêt. Cette étape de concentration consiste en une évaporation du solvant notamment grâce à un flux d'azote ou par l'utilisation d'un évaporateur rotatif.

L'extraction des hydrocarbures aromatiques peut également être effectuée par des techniques utilisant des supports d'extraction comme dans le cas de la micro-extraction en phase solide

(SPME), de l'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE), de la micro-extraction par solide compacté (MEPS) ou encore de l'extraction dynamique en phase solide (SPDE).

L'ensemble de ces techniques a pour objectif l'extraction sensible et sélective des hydrocarbures aromatiques afin de permettre leur détermination. Le principe de chacune de ces techniques va être, dans un premier temps, détaillé. Dans un deuxième temps, des exemples d'application de ces procédures à des matrices environnementales et alimentaires seront présentées et selon les données disponibles dans la littérature les applications aux fruits et légumes seront plus particulièrement ciblées.

1.6.1.1. Techniques d'extraction par solvant

1.6.1.1.1. Soxhlet

Le soxhlet est une technique apparue en 1879, elle a été développée par Franz von Soxhlet pour l'extraction de lipides à partir d'une matrice solide.

Le soxhlet est une méthode d'extraction utilisant (i) la solubilité (même limitée) des composés cibles dans un solvant organique pour les extraire d'échantillons solides et (ii) l'insolubilité du reste de l'échantillon dans le solvant choisi.

Le montage soxhlet (figure 15) permet le chauffage du solvant à reflux. Les vapeurs de solvants sont condensées par le système de refroidissement afin de retomber dans la chambre contenant l'échantillon. Une partie des analytes cibles sont transférés de la matrice vers le solvant chaud. Le solvant se charge en composés d'intérêt puis est recyclé pour un nouveau cycle de distillation. A chaque cycle, le solvant se concentre en composés d'intérêt et le processus peut s'étendre sur plusieurs heures ou journées. La partie du solide non soluble dans le solvant reste dans la chambre d'extraction et peut ainsi être facilement éliminée, sans étape supplémentaire de filtration.

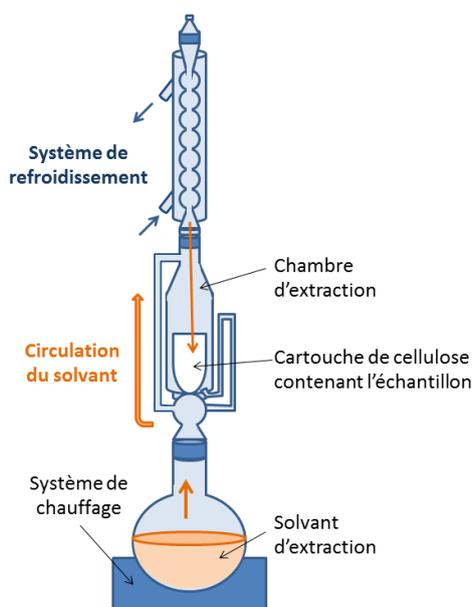


Figure 15 : Schéma d'un appareillage de soxhlet

L'extraction des échantillons est généralement réalisée au point d'ébullition du solvant et sur de longues périodes. Ces conditions sont susceptibles d'entraîner une décomposition thermique des analytes, si les composés ciblés sont thermolabiles. La technique est difficile à automatiser et est limitée à la sélectivité des solvants. En raison de la grande quantité de solvant utilisée, une étape d'évaporation/concentration est souvent nécessaire après l'extraction. La procédure d'extraction est généralement longue (2 à 25h pour les hydrocarbures aromatiques, tableau 8) et consommatrice de solvant (60-300 mL pour les hydrocarbures aromatiques, tableau 8), néanmoins, le soxhlet est une méthode simple utilisant un appareillage peu coûteux qui peut être réutilisé. Des variantes à l'extraction conventionnelle par soxhlet permettent de réduire la durée et la quantité de solvant grâce à l'utilisation de hautes pressions (de 7×10^6 à 10^7 Pa), d'ultrasons ou de micro-ondes. L'équipement Soxtec® peut également être mis en place afin d'automatiser la procédure en combinant la solubilisation des analytes dans le solvant chaud, le rinçage pour l'extraction des composés solubles, la distillation et la récupération du solvant et le séchage pour concentrer les résidus d'extraction.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

Différents paramètres sont susceptibles d'influer sur le rendement d'extraction, comme la nature (polarité) du solvant, la composition de la matrice dans laquelle est contenu l'échantillon et les caractéristiques des analytes (hydrophobicité, volatilité, masse moléculaire...).

Tableau 8 : Applications de la méthode soxhlet pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques dans des matrices environnementales et alimentaires

Référence	Matrice et analytes	Extraction-Purification	Séparation-Détection
Echantillons environnementaux			
Helaleh, 2005	boues 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	2,5 g d'échantillon sec de boue Etude comparative : Soxhlet (150 mL DCM/hexane (1:1), 18 h), Soxtec® (50 mL DCM/hexane (1:1), 3 h), ASE (60 ml DCM/hexane (1:1), 20 min, 100 atm, T° 100 °C), GPC (10 g silice activée, 5 g Al ₂ O ₃ activé, 1 cm sulfate de sodium, élution 120 mL DCM/hexane (1:1)), GPC (SX-3, élution 75 mL DCM/hexane (1:1))	GC-itMS (colonne DB-5MS, 30 m x 0,32mm i.d. x 0,1 µm)
Hollender, 2003	sol 15 HAP (MM 128-278 g/mol)	Etude comparative : Soxhlet (30 g d'échantillon de sol, 8 h, 300mL n-pentane ou DCM), UAE (10 g d'échantillon de sol, sonication 100mL acétone, DCM, n-pentane, toluène, ACN, méthanol, acétone/toluène, méthanol/toluène, éthanolamine/acétone, acide acétique/acétone, 40 min, RT, 20kHz), concentration des extraits soxhlet et UAE (évaporateur rotatif, ajout 10 mL ACN, concentration, ajout 5 mL ACN, concentration par évaporateur rotatif) SFE (5 g d'échantillon de sol, CO ₂ +co-solvant, 10 MPa augmentation 5 MPa toutes les 3 min jusqu'à 40 MPa, 90 °C) ASE (5 g d'échantillon de sol, 90 °C, 14MPa, ACN, méthanol, acétone, n-pentane, DCM/acétone (85:15), acétone/toluène (1:1); méthanol/toluène (1:1), évaporation à sec et ajout 10 mL ACN)	HPLC-FLD-DAD (colonne RP-C18, 250 mm x 3 mm i.d. x 5 µm, pré-colonne 12,5mm x 3mm)
Smith, 2006	Végétaux de pâture 31 HAP (MM 128-278 g/mol)	Etude comparative : Comparaison UAE (DCM) et Soxhlet (30 g d'échantillon de végétaux + 50 g sulfate de sodium, 350 mL d'hexane, DCM ou hexane/acétone 4:1, 2x4h) + saponification (méthanol/KOH), colonne chromatographique (colonne 1 cm de granule de sulfate de sodium anhydre activé, 20 g de gel de silice et 10 g d'alumine activée)	GC-qMS (colonne HP-5MS 30m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)
Fruits et légumes			
Abou-Arab, 2014	18 fruits et 78 légumes 15 HAP (MM 152-278 g/mol)	30 g d'échantillon frais + 90 g de sulfate de sodium anhydre. Soxhlet (hexane/acétone 1:1, 300 mL, 24h), colonne chromatographique (Florisil® activé et sulfate de sodium anhydre, élution DCM et n-hexane), évaporation à sec (évaporateur rotatif, RT), dissolution dans 1 mL hexane	GC-qMS (colonne HP-5, 50 m x 0,2 mm i.d. x 0,3 µm)

Ashraf, 2012	9 légumes 8 HAP (MM 178-278 g/mol)	50 g d'échantillon frais et pelé + 100-150 g de sulfate de sodium anhydre. Soxhlet (cyclohexane/acétone 2:1, 8h), colonne chromatographique (gel de silice + sulfate de sodium anhydre, élution 75 mL DCM), évaporation (N ₂), dissolution 2 mL ACN	HPLC-UV (colonne C18, 250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm, phase mobile ACN-eau 75:25, 1,5 mL/min)
Jánská, 2006	3 fruits et 5 légumes 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	20 g d'échantillon + 80 g de sulfate de sodium anhydre Soxhlet (170 mL hexane/acétone 1:1, 6h), évaporation à sec (évaporateur rotatif, 40 °C), GPC (Bio-Beads S-X3, 500 mm x 8mm i.d., chloroforme 2,5 mL, 0.6 mL/min), évaporation à sec (évaporateur rotatif, 40 °C), dissolution dans 0,5 mL ACN	HPLC-FLD (colonne Supelcosil™ LC-PAH, 250 mm x 4,6 mm i.d., colonne de garde Supelcosil™ LC-18, 20 mm x 4 mm i.d., phase mobile gradient: 0 min ACN-eau 55:45, 40 min 100% ACN, 1 mL/min)
Kipopoulou, 1999	5 Légumes 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	5-10 g de légume déshydraté + 5-10 g de sulfate de sodium anhydre Soxhlet (DCM, 6h), évaporation jusqu'à 2 mL (évaporateur rotatif) SPE (Florisil® 2g élution DCM), évaporation à sec (N ₂), dissolution dans ACN	HPLC-FLD (colonne Hypersil Green PAH 100 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm, colonne de garde 4,6 mm i.d. x 5 µm, phase mobile gradient : 0-5 min ACN-eau 50:50, 5-20 min 100% ACN, 1,5 mL/min)
Samsøe-Petersen, 2002	8 fruits et 6 légumes 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	10 g d'échantillon Soxwave (Soxhlet + micro-ondes, hexane/acétone, 1:1), rinçage (3x hexane:acétone 1:1), centrifugation, SPE (colonne NH ₂ -SAX), évaporation	HPLC-FLD et GC-MS
Soceanu, 2012	Tomates 15 HAP (MM 128-278 g/mol)	Soxhlet, procédure de purification (5 g de Al ₂ O ₃ activé + 5 g de gel de silice activé + sulfate de sodium anhydre, élution hexane/DCM, 3:1), évaporation (Kuderna-Danish et N ₂)	GC-qMS (colonne capillaire silice HP-5, 29,6m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm)
Soceanu, 2014	10 Légumes 15 HAP (MM 128-278 g/mol)	Soxhlet, procédure de purification (5 g de Al ₂ O ₃ activé + 5 g de gel de silice activé + sulfate de sodium anhydre, élution hexane/DCM, 3:1), évaporation (Kuderna-Danish et N ₂)	GC-qMS (colonne capillaire silice HP-5, 29,6m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm)

Abbreviations : ACN : acétonitrile, ASE : extraction accélérée par solvant (ou PLE : extraction liquide pressurisée), DCM : dichlorométhane (CH₂Cl₂), GC : chromatographie en phase gazeuse (itMS : spectromètre de masse trappe ionique, qMS : spectromètre de masse quadripolaire), GPC : chromatographie par perméation de gel, HPLC : chromatographie liquide à hautes performances (DAD : détecteur à barrettes de diode, FLD : détecteur à fluorescence, UV : détecteur ultraviolet-visible), i.d. : diamètre interne, MAE : extraction assistée par les micro-ondes, MM : masse moléculaire, RT : température ambiante, SPE : extraction sur phase solide, UAE : extraction assistée par les ultrasons

Choix du solvant

Pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques, les solvants utilisés sont organiques, en raison de la forte solubilité de ces composés dans ces solvants. Les solvants organiques utilisés pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques doivent avoir un point d'ébullition faible (<115 °C) puisque les solvants ayant un haut point d'ébullition induisent la perte des HAP les plus volatils, tels que le naphthalène et l'acénaphthène (Hollender, 2003). Quelle que soit la matrice : sol, boue, fruit, légume (tableau 8) les solvants les plus utilisés pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques sont le dichlorométhane (DCM), l'hexane, le cyclohexane mais aussi des mélanges de solvants tels que le mélange hexane/acétone ou cyclohexane/acétone (Jie, 2007 ; Smith, 2006 ; Serrano, 2006). L'ensemble des hydrocarbures aromatiques n'est pas extrait de la même manière selon le solvant utilisé. Les solvants peu polaires, ayant une constante diélectrique faible (tableau 9), sont plus favorables à l'extraction des composés lourds tandis que les solvants plus polaires, avec une constante diélectrique plus élevée, permettent une meilleure extraction des composés légers. Les valeurs des constantes diélectriques pour certains solvants d'extraction sont indiquées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Constantes diélectriques pour quelques solvants usuels

Solvant	Constante diélectrique ϵ
Pentane	1,84 (20 °C)
Hexane	1,88 (25 °C)
Heptane	1,92 (20 °C)
Cyclohexane	2,02 (20 °C)
Toluène	2,38 (25 °C)
Ether éthylique	4,33 (20 °C)
Acétate d'éthyle	6,02 (25 °C)
Dichlorométhane (DCM)	8,93 (25 °C)
Acétone	20,70 (25 °C)
Méthanol	32,70 (25 °C)
Acétonitrile (ACN)	37,50 (20 °C)
Eau	80,10 (20 °C)

Données issues des propriétés de solvants établies par Riddick et Bunger (1970)

L'extraction par soxhlet (pendant 4h avec 350 mL de solvant) menée, sur des végétaux de pâture (30 g), avec trois solvants (le dichlorométhane (DCM), un mélange hexane/acétone (4/1, v/v) et l'hexane) proposant des solubilisations différentes pour les HAP a montré que la quantité totale de HAP extraite varie significativement en fonction du solvant. Le DCM, qui est le solvant le plus polaire parmi ceux testés, permet l'extraction la plus efficace des HAP dans les conditions opératoires établies, avec 38,2 µg/kg de masse fraîche contre 31,2 µg/kg avec l'hexane. Cependant, les différences s'avèrent non significatives pour les composés pris séparément (Smith, 2006). L'extraction par soxhlet des HAP contenus dans des échantillons de sols (durant 8h avec 300 mL de solvant) montre que l'utilisation du pentane, permet d'obtenir un meilleur rendement d'extraction que le DCM, en particulier pour les HAP de fortes masses moléculaires (Hollender, 2003).

Applications aux matrices environnementales

Le Soxhlet est appliqué à l'extraction des hydrocarbures aromatiques dans de nombreuses matrices environnementales et alimentaires (tableau 8). La norme ISO 13877 : 1998 préconise notamment, l'utilisation du Soxhlet avec un solvant d'extraction non polaire pour l'extraction de fortes quantités de HAP à partir du sol, afin de dissoudre les composés associés aux particules de suie ou de goudron.

La récupération des HAP peut être améliorée par l'addition d'une étape de saponification sur les résidus de l'extrait de Soxhlet. La quantité en HAP extraite à partir des végétaux de pâture est plus importante lorsque le Soxhlet est combinée à la saponification. Cette association permet de récupérer jusqu'à 90 % des HAP contenus dans les végétaux de pâture (Smith, 2006). Néanmoins, la saponification peut induire des pertes de composés tels que le BaP en raison de la formation d'émulsions et de la décomposition des analytes par photo-dégradation, oxydation ou dégradation alcaline.

Applications aux fruits et légumes

La méthode Soxhlet peut facilement s'adapter à l'extraction des HAP dans les fruits et légumes puisque les HAP sont des composés hydrophobes et les fruits et légumes des matrices solides et hydrophiles. Les solvants principalement utilisés pour ces matrices sont généralement sous forme de mélange : hexane/acétone ou cyclohexane/acétone (tableau 8). L'utilisation de solvants avec des polarités différentes est favorable à l'extraction des HAP compris dans une large gamme de masses moléculaires, entre 128 et 278 g/mol. Pour les fruits et légumes, selon Soceanu *et al.* (Soceanu 2014 ; Soceanu, 2012) les taux de récupération observés après l'extraction des HAP par Soxhlet sont généralement satisfaisants avec notamment un recouvrement de 96 à 99 % (tableau 8). Néanmoins, les valeurs sont variables selon les composés. Pour la pomme, des taux de récupération inférieurs à 50 % sont observés pour les HAP légers (naphtalène et acénaphène) alors que le pourcentage atteint jusqu'à 117 % (forte variabilité de l'extraction), pour les composés plus lourds (Jánská, 2006).

1.6.1.1.2. Extractions liquide/liquide et solide/liquide (LLE et SLE)

L'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction solide-liquide (SLE) consistent à mettre en contact l'échantillon liquide pour la LLE et solide pour la SLE avec un solvant. Les composés d'intérêt à extraire doivent avoir une plus forte affinité pour ce solvant que pour la matrice dans laquelle ils sont contenus. La séparation solide/liquide utilise généralement la centrifugation ; l'ampoule à décanter sert à la séparation liquide/liquide. La LLE est notamment utilisée pour l'extraction des HAP à partir d'échantillons d'eaux souterraines, après agitation avec de l'hexane et utilisation d'une ampoule à décanter (Adekunle, 2017).

La SLE est appliquée à l'extraction des BTEX, par addition de dichlorométhane aux échantillons de fruits et légumes et centrifugation pendant 6h (Górna-Binkul, 1996). La norme ISO 13877 : 1998 recommande l'extraction liquide avec un solvant polaire (acétone) pour l'analyse de faibles quantités de HAP dans les sols. Une agitation mécanique est nécessaire afin de briser les agrégats et augmenter la surface de contact de l'échantillon avec le solvant d'extraction. La norme ISO 15753:2006 indique que l'extraction des HAP contenus dans les

corps gras d'origine animale ou végétale s'effectue avec un mélange de solvants polaires acétonitrile/acétone.

Les principaux inconvénients rencontrés en LLE sont la durée de préparation de l'échantillon et l'utilisation de grandes quantités de solvants toxiques et inflammables mais également la formation d'émulsions qui entraîne la perte d'analytes (Purcaro, 2009 ; Rodil, 2007 ; Zhao, 2009).

Afin de réduire la quantité de solvant ainsi que le temps d'extraction et améliorer le rendement de récupération, les techniques d'extraction liquide-liquide et solide-liquide sont généralement assistée (Purcaro, 2009 ; Purcaro, 2013) :

- des ultrasons (ultrasound assisted extraction : UAE)
- des micro-ondes (microwave assisted extraction : MAE)
- de la pressurisation (pressurized liquid extraction : PLE)

1.6.1.1.2.1. Extraction assistée par les ultrasons (UAE)

L'extraction assistée par les ultrasons (UAE) est généralement utilisée pour des échantillons solides. L'échantillon placé dans un solvant d'extraction est soumis à des ondes de pression acoustiques ayant des fréquences généralement autour de 20 kHz. L'utilisation des ultrasons induit une augmentation de la pression et de la température dans le milieu ce qui favorise la pénétration du solvant dans la matrice et améliore la solubilité et la diffusivité des analytes vers le solvant. L'utilisation des ultrasons engendre un déplacement de l'équilibre qui permet de réduire la durée d'extraction.

L'UAE est une procédure dont l'automatisation est difficile mais qui permet l'extraction des analytes thermolabiles qui sont éventuellement dégradés par les conditions appliquées au moyen d'un soxhlet.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

L'UAE a été utilisée pour l'extraction de nombreux contaminants tels que les pesticides, les produits pharmaceutiques (notamment des hormones), les HAP ou encore des métaux à partir d'échantillons environnementaux et alimentaires (Farré, 2012 ; Tadeo, 2010).

Extraction des hydrocarbures aromatiques dans les matrices environnementales

L'UAE est appliquée à l'extraction des HAP dans des échantillons de sol (acétone), de bois (hexane) et de lichens (cyclohexane) (tableau 10, Guidotti, 2003 ; Moret, 2007).

Choix du solvant

L'extraction par UAE des HAP à partir d'échantillons de sol avec différents solvants montre que le méthanol et l'acétonitrile, deux solvants polaires, sont peu efficaces pour la récupération des analytes. Au contraire, le dichlorométhane et l'acétone qui sont moins polaires permettent un meilleur rendement d'extraction pour les HAP (Hollender, 2003).

Durée d'extraction

Les durées d'extraction sont généralement comprises entre 15 min et 2 h (tableau 10). Néanmoins, Tadeo *et al.* indiquent que des cycles de sonication trop longs (supérieurs à 60 min) ne permettent pas d'améliorer le rendement d'extraction à partir d'échantillons de sols, en raison de l'évaporation des HAP les plus volatils. Généralement, deux cycles de 15 min suffisent pour l'extraction en UAE (Tadeo, 2010).

Application aux aliments

La norme ISO 15753 : 2006 décrit une méthode de détermination pour 15 HAP présents dans les graisses d'origine animale et végétale. Les HAP sont extraits par une méthode d'extraction assistée par les ultrasons (UAE) avec un mélange acétonitrile/acétone (60/40 ; v/v).

Néanmoins, l'hexane est le solvant le plus utilisé pour l'extraction des HAP dans les aliments en UAE (tableau 10). Ce solvant est notamment appliqué aux échantillons de viande fumée, de pain grillé ou encore de fruits et de légumes (Bishnoi, 2006 ; Purcaro, 2009 ; Rey-Salgueiro, 2008a ; Rey-Salgueiro, 2008b ; Tuteja, 2011). L'hexane est un solvant apolaire dans lequel les HAP sont particulièrement solubles.

1.6.1.1.2.2. Extraction assistée par les micro-ondes (MAE)

L'utilisation de l'énergie des micro-ondes pour la procédure d'extraction a été pour la première fois décrite au milieu des années 1980 par Ganzler *et al.* (Ganzler, 1986) et Lane et Jenkins (Lane, 1984) pour l'extraction de divers composés dans des produits alimentaires tels que les agrumes, les plantes aromatiques ou les céréales. La MAE est particulièrement adaptée aux échantillons solides qui sont placés dans un solvant et soumis aux micro-ondes. Les micro-ondes sont des rayonnements électromagnétiques non ionisants dont les fréquences varient de 300 MHz à 300 GHz. Les rayonnements chauffent le milieu par la rotation des dipôles et la conduction ionique. La chaleur apportée au milieu d'extraction permet la dissolution et le transfert des analytes dans le solvant.

La procédure MAE utilise une quantité faible de solvant (entre 6 et 30 mL) et la durée d'extraction est plus courte (généralement entre 5 et 15 min) que lors d'une extraction par soxhlet (Ridgway, 2007a ; Serrano, 2006).

Les principaux paramètres susceptibles d'influer sur le rendement d'extraction sont le choix du solvant et le temps d'extraction ainsi que la quantité d'échantillon.

Choix du solvant

Les solvants non-polaires n'absorbent pas l'énergie des micro-ondes et ne sont donc généralement pas utilisés en MAE (Ridgway, 2007a). Néanmoins, l'agitateur Carboflon®, technologie mise au point par la société CEM France, est capable d'absorber les micro-ondes et de transmettre de la chaleur au solvant afin de permettre l'utilisation des solvants apolaires en MAE (Purcaro, 2009). Les solvants plus généralement utilisés en MAE possèdent une constante diélectrique forte et sont capables de convertir l'énergie micro-onde en chaleur. Des mélanges de solvants organiques avec une faible constante diélectrique (hexane,

dichlorométhane, toluène, cyclohexane) et de co-solvants polaires (eau, acétone) en faibles quantités sont fréquemment utilisés (Serrano, 2006).

Applications aux hydrocarbures aromatiques dans les aliments

La MAE est appliquée à l'extraction des HAP dans les fruits et légumes en utilisant l'acétonitrile comme solvant d'extraction (tableau 10, Wu, 2016). Une étude comparative menée sur des viandes fumées en MAE montre que le mélange hexane/acétone (3:1 ; v/v) et l'hexane seul donnent des rendements d'extraction équivalents (tableau 10, Purcaro, 2009). Les rendements d'extraction sont également équivalents avec différentes durées d'extraction (5, 15 et 30 min) et deux températures testées (60 °C et 115 °C). L'augmentation du ratio échantillon/solvant ne modifie pas les résultats pour les HAP lourds mais entraîne une diminution du rendement d'extraction pour les HAP légers, comme le phénanthrène. L'absence de différence significative entre les résultats lors du changement des paramètres d'extraction peut être due à l'adsorption superficielle des HAP sur les viandes fumées, permettant une extraction efficace même avec de faibles températures et temps d'extraction (Purcaro, 2009). La MAE (115 °C, 15 min, hexane) appliquée aux échantillons de viandes fumées lyophilisées, permet une amélioration significative de l'efficacité d'extraction par rapport à l'UAE utilisant le même solvant (Purcaro, 2009).

1.6.1.1.2.3. Extraction par liquide pressurisé (PLE)

L'extraction par liquide pressurisé (PLE), dont la version la plus mise en œuvre est l'extraction accélérée par solvant (ASE), a été pour la première fois décrite en 1996 par Richter *et al.* (Richter, 1996). L'ASE est une technique d'extraction solide-liquide utilisant des solvants à des températures (50-200 °C) et pressions élevées (3,5-20 x10⁶ Pa) mais en dessous de leurs points critiques. Les solvants sont chauffés à des températures supérieures à leur point d'ébullition ce qui réduit leur viscosité ainsi que leur tension superficielle et améliore la solubilité et le transfert des analytes dans le solvant. Les fortes pressions favorisent, quant-à-elles, la pénétration du solvant dans la matrice solide. L'eau est le solvant le plus utilisé au cours de la procédure, car l'ASE modifie les constantes diélectriques (polarité) des analytes d'intérêt ce qui permet de les extraire. L'éthanol, le méthanol, l'hexane, le propane, le dichlorométhane, l'acétone ou l'acétate d'éthyle sont des solvants également très répandus en ASE.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

L'ASE a, par exemple, été utilisée pour l'extraction des HAP dans des échantillons de viandes et de poissons fumés avec un mélange de solvant dichlorométhane/acétonitrile (90:10 ; v/v ; 100 °C ; 10⁷ Pa) (tableau 10, Wang, 1999). Le mélange de solvant acétone/toluène (1:1 ; v/v) conduit, dans ce cas de figure, aux meilleurs résultats lors de l'analyse d'échantillons de sols peu pollués. Cependant, les résultats restent bons quelle que soit la polarité du solvant utilisé par ASE (méthanol, acétonitrile, acétone, pentane...) (Hollender, 2003). Parmi les différentes méthodes d'extraction testées (UAE, SFE, soxhlet, ASE) avec des échantillons de sol l'ASE permet d'obtenir les meilleurs résultats (Hollender, 2003).

Tableau 10 : Applications des méthodes d'extraction par solvant pour la récupération des hydrocarbures aromatiques dans des matrices environnementales et alimentaires

Référence	Matrice et analytes	Extraction-Purification	Séparation-Détection
Echantillons environnementaux			
Adekunle, 2017	eau souterraine 7 HAP (MM 128-202 g/mol)	500 mL d'échantillon d'eau LLE (extraction x 3 : mélange 10 min + 20 mL hexane dans une ampoule à décanter, décantation 15 min), évaporation (N ₂), SPE (silice + 1 g sulfate de sodium, élution 50 mL hexane)	GC-TOF-MS (colonne primaire Rxi-5 SilMS, 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm, colonne secondaire Rxi 17 Sil MS, 1 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)
Burkhardt, 2005	sédiments 41 HAP et HAP alkylés (MM 108-322 g/mol)	15-30 g d'échantillon humide PLE (eau/alcool isopropylique (50:50, v/v), 120 °C, 3x10min, 13 800 kPa), PLE (eau/alcool isopropylique (20:80), 200 °C, 3x10min, 13 800 kPa), SPE (1g PSDVB) + SPE (cartouche 4 g sulfate de sodium, 1 g Florisil®), élution 3x10mL DCM/éther diéthylique (80:20)	GC-qMS (colonne silice (5 % diphenyl 95 % diméthyl polysiloxane), 25 m x 0,20 mm i.d. x 0,33 µm)
Domeño, 2006	lichens 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	0,2 g d'échantillon Etude comparative : ASE dynamique (35 kHz, 20 °C, 0,2 mL/min, 10 min, différents solvants : hexane, cyclohexane, DCM, méthanol et toluène), ASE statique (4 x 15mL DCM, 15 min, 20 °C)+ colonne chromatographique (Al ₂ O ₃ 3%, 2 g sulfate de sodium anhydre, élution 20mL hexane-DCM (3:1)), Soxhlet (250mL DCM, 6 h)	GC-qMS (colonne VF5-ms, 60 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)
Guidotti, 2003	lichens 17 HAP (MM 128-278 g/mol)	2 g d'échantillon UAE (sonication, 2 x 30 mL cyclohexane, 30 min, RT), colonne chromatographique (colonne 10 g silice activée, élution 25 mL dichlorométhane/pentane 2:3)	GC-qMS (colonne HP5-MS, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)
Moret, 2007	sol, bois, olives 13 HAP (MM 166-278 g/mol)	1 g de sol sec UAE (sonication 10 mL acétone, 1 h), centrifugation, évaporateur rotatif, SPE (cartouche silice 500 mg, élution 9 mL cyclohexane) 1 g de bois sec UAE (sonication 10 mL hexane, 2 h), SPE (cartouche silice 500 mg, élution 9mL cyclohexane) 15 g d'olives sèches UAE (sonication 40 mL hexane, 1 h), filtration, évaporateur rotatif, SPE (cartouche silice 5 g, élution 8 mL hexane/DCM 70:30)	HPLC-FLD (colonne C18, 250 mm x 3 mm i.d. x 5 µm, phase mobile ACN/eau, 1 mL/min)

Aliments			
Purcaro, 2009	viande fumée 15 HAP (MM 128-278 g/mol)	Etude comparative : - MAE (20mL hexane+barreau Carboflon, temps d'extraction : 5-30 min, températures 60-115 °C et quantité d'échantillon 1-3 g), SPE (5g silice, élution 8 ml hexane/DCM 70:30) - UAE (2 g d'échantillon, sonication 20 mL hexane, 1 h, RT), SPE (5 g silice, élution 8 ml hexane/DCM 70:30)	HPLC-FLD (colonne C18, 250 mm x 3 mm i.d. x 5 µm, phase mobile ACN/eau, 1 ml/min)
Rey-Salgueiro, 2008a	pain grillé 11 HAP (MM 228-278 g/mol)	1 g d'échantillon, UAE (sonication 3 x 10 min, 10 mL hexane), SPE (cartouche silice, 10 mL hexane), évaporation (N ₂)	HPLC-FLD (colonne Supelcosil LC-PAH, 250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm, phase mobile ACN/eau, 1mL/min)
Wang, 1999	Viandes et poissons fumés 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	5 g d'échantillon fumé, ASE (1500 psi , 100 °C, 20 mL de solvant : hexane, DCM/ACN 9:1, ou DCM/ACN 7:3), colonne chromatographique (colonne 6g Florisil®, élution 10 mL de DCM)	GC-qMS (colonne HP-5MS, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)
Fruits et légumes			
Bishnoi, 2006	fruits et légumes 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	5 g de fruit déshydraté et 2 g de légume déshydraté. UAE (25 mL hexane), centrifugation, filtration, séchage (N ₂ haute pression), SPE (cartouche C18)	HPLC-UV (colonne C18, 250 mm x 4.6 mm i.d. x 5 µm, colonne de garde 10 mm x 4,6 mm, phase mobile ACN/eau 75:25, 1 mL/min)
Górna-Binkul, 1996	fruits et légumes BTEX (MM 78-106 g/mol)	SLE (DCM 0,5 mL/g masse fraîche), agitation (6 h), filtration (filtre Millex-HV 0,45µm), séchage (50-60 °C, 7 j)	GC-qMS (colonne DB-5, 50 m x 0,258 mm i.d. x 0,25 µm)
Mo, 2009	fruits et légumes 12 HAP (MM 128-278 g/mol)	20 g d'échantillon déshydraté UAE (triplicat, 60 mL éther éthylique, 30 min), évaporation jusqu'à 2 mL (évaporateur rotatif, 50 °C), GPC (colonne gel de silice et alumine + sulfate de sodium anhydre, élution 20-80 mL DCM), évaporation jusqu'à 0,5 mL (N ₂)	GC-qMS (colonne HP-5, 30m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)
Rey-Salgueiro, 2008b	plante (feuilles choux, maïs...) 11 HAP (MM 202-278 g/mol)	UAE (20-100mL hexane, 20 min), SPE (cartouche sep-pack silice 690 mg + 10 mL hexane), évaporation à sec (N ₂ TurboVap), dissolution 0,5 mL ACN	HPLC-FLD (colonne Supelcosil 250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm, gradient phase mobile ACN/eau 80:20, 40 min ACN/eau 95:5, 1 min ACN/eau 80:20 maintenu 10 min, 1 mL/min)
Tuteja, 2011	légumes 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	UAE (hexane) + évaporateur rotatif x2, centrifugation (15 min, 12 000 rpm), filtration (filtres seringues 0,45 µm), purification colonne chromatographique	HPLC-UV (colonne C18, 250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm, mobile phase ACN/eau 75:25, 1 mL/min)

Wennrich, 2002	fruits et légumes 14 HAP (MM 154-278 g/mol)	10 g d'échantillon ASE (5 g cellulose, hexane/acétone, 1:1, 10 MPa, 100 °C, 2x5min), addition de 5 mL hexane, évaporation à sec (RT) + 0,5 mL benzène:DCM, 4:1, GPC (colonne de gel de silice, élution 50 mL benzène/DCM, 4:1), concentration à sec (RT) + 0,2 mL ACN	HPLC-FLD (colonne LiChroCART, 250 mm x 3 mm i.d. x LiChrospher PAH 5 µm, gradient phase mobile: 0 min ACN/eau 50:50, 3 min ACN/eau 60:40, 14 min ACN/eau 100:0, 0.5 mL/min)
Wu, 2016	légumes 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	10 g d'échantillon MAE (20 mL ACN, 100 °C, 10 min), centrifugation (x3), addition 100 mL sulfate de sodium (4%), extraction x2 (30 mL hexane), évaporation jusqu'à 1 mL (évaporateur rotatif), GPC (colonne gel silice alumine, élution 20 mL hexane, 70 mL DCM)	GC-qMS (colonne HP-5MS, 30m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)

Abbreviations : ACN : acétonitrile, ASE : extraction accélérée par solvant (ou PLE : extraction liquide pressurisée), DCM : dichlorométhane (CH₂Cl₂), GC : chromatographie en phase gazeuse (qMS : spectromètre de masse quadripolaire, TOF : analyseur de masse à temps de vol), GPC : chromatographie par perméation de gel, HPLC : chromatographie liquide à hautes performances (FLD: détecteur à fluorescence, UV: détecteur ultraviolet-visible), i.d.: diamètre interne, MAE: extraction assistée par les micro-ondes, MM: masse moléculaire, PDMS : polydiméthylsiloxane, PSDVB : co polymère styrène-divinylbenzène, RT : température ambiante, SBSE : extraction par sorption sur barreau magnétique, SPE : extraction sur phase solide, UAE : extraction assistée par les ultrasons

1.6.1.2. Purification

Les extractions par solvant présentées précédemment sont peu sélectives et induisent la co-extraction de composés issus de la matrice. La procédure d'extraction doit donc être complétée par une étape de purification, généralement réalisée grâce à une extraction en phase solide (SPE) ou à une chromatographie d'exclusion stérique. La norme ISO 15753:2006 recommande notamment, suite à l'extraction liquide des HAP contenus dans les corps gras d'origine animale ou végétale, des étapes de purification au moyen d'une phase inverse C18 et d'une phase de type Florisil®.

1.6.1.2.1. Extraction en phase solide (SPE)

L'extraction en phase solide (SPE) a commencé à se développer à partir de 1974 grâce aux travaux de trois chercheurs (Reginald Adams, Thomas Good et Michael Telepchak). La SPE est un procédé de préparation d'échantillon au cours duquel les composés d'intérêt, qui sont dissous ou présents en suspension dans un mélange liquide, sont séparés des autres composés du milieu, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

L'échantillon contenant les analytes constitue la phase mobile. Cette phase mobile est déposée dans une cartouche contenant une phase stationnaire solide à travers laquelle l'échantillon s'écoule. Selon l'affinité des différents composés pour la phase stationnaire, soit les impuretés sont retenues par la phase solide, ce qui purifie et concentre la phase mobile en analytes d'intérêt, soit les analytes sont retenus par la phase solide et les impuretés sont éliminées avec la phase mobile. Dans le cas où les analytes sont retenus par la phase stationnaire, une étape supplémentaire d'élution est nécessaire pour permettre leur récupération (figure 16).

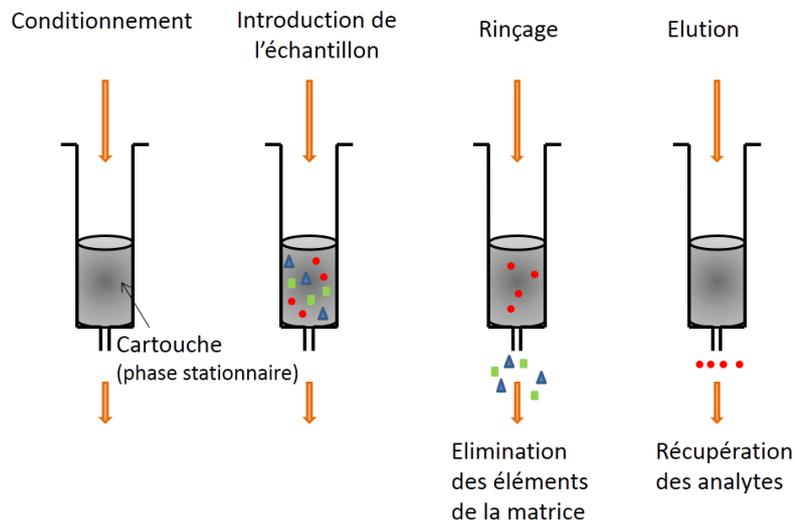


Figure 16 : Principe d'une extraction en phase solide (SPE) avec rétention des analytes

Les supports SPE sont généralement composés de silices ou de polymères. Pour les supports à base de silice, il existe 4 modes de fonctionnement : en phase normale, en phase inverse, en mode mixte ou en mode échange d'ions.

La phase normale

Le mode en phase normale permet la purification de molécules dont la structure présente un grand nombre de fonctions polaires. La silice pure ainsi que des silices greffées au moyen de groupements cyanopropyl (CN) ou diol retiennent par adsorption les composés polaires par l'intermédiaire de liaisons hydrogène. Les composés d'intérêt doivent posséder une meilleure affinité pour le solvant d'élution que pour le support de rétention, afin de permettre leur récupération.

La phase inverse

En mode phase inverse, le greffage hydrophobe de type C8 ou C18 permet des interactions de type Van der Waals. Ce mode, utilisant le partage avec un solvant d'élution, s'applique à la purification de composés hydrophobes ou faiblement hydrophobes. L'utilisation des chaînes carbonées longues permet d'améliorer la rétention des composés d'intérêt hydrophobes. Le greffage phényle est particulièrement adapté à la rétention des composés aromatiques et souvent en association avec des solvants d'élution tels que le méthanol ou l'acétonitrile.

Le mode échange d'ion

En mode échange d'ions, le mécanisme de rétention mis en jeu est l'interaction ionique qui dépend essentiellement du pH et de la force ionique. Le greffage du support induit à son extrémité une attraction forte envers les analytes ayant des fonctions ionisées antagonistes.

Le principe de l'extraction est basé sur la rétention des composés sous leur forme ionisée par des interactions électrostatiques. L'élution est ensuite réalisée à un pH pour lequel les composés sont sous forme neutre. Dans le cas où la neutralité du composé est impossible à obtenir, l'élution est effectuée avec une solution ayant une grande force ionique.

Les phases échangeuses d'anions se composent généralement d'amines permettant d'extraire des acides avec une ou plusieurs charges négatives et les phases échangeuses de cations, ayant des fonctions sulfoniques ou carboxyliques, sont utilisées pour l'extraction de composés basiques avec une ou plusieurs charges positives.

Le mode mixte

Le mode mixte donne les extractions les plus sélectives grâce à des supports en silices comportant un double greffage l'un étant une chaîne carbonée hydrophobe et l'autre permettant l'échange d'ions. Les supports peuvent être constitués d'un acide (sulfonique ou carboxylique) et d'un greffon hydrophobe pour l'extraction de bases portant une ou plusieurs charges positives ou bien d'une base d'amine et de greffons hydrophobes afin d'extraire les acides portant une ou plusieurs charges négatives.

Choix de la phase d'extraction

Le choix de la phase d'extraction dépend de la matrice de l'échantillon mais également des caractéristiques physico-chimiques (solubilité, polarité, présence de groupements fonctionnels chargés, masse moléculaire) des analytes à extraire. Dans le cas d'une matrice aqueuse, des supports hydrophobes sont généralement utilisés puisque l'eau est une phase mobile peu éluante. A l'inverse, si l'échantillon est une phase organique, comme les huiles ou les produits pétroliers, les supports sélectionnés en SPE sont polaires (silices vierges ou greffées polaires, ou alumines).

La SPE est une technique utilisant une quantité assez importante de solvant et dont la sélectivité est limitée. De plus, des problèmes de colmatage de cartouche ont été rapportés (García-Falcón, 2005). Néanmoins, cette procédure est relativement rapide et peut être facilement automatisée.

Applications

La SPE est utilisée pour la purification et la concentration de nombreux analytes (pesticides, stéroïdes, HAP...) dans diverses matrices complexes telles que l'urine, le sang, les boissons, le sol ou encore les tissus animaux.

Extraction des hydrocarbures aromatiques

La SPE est une procédure majoritairement utilisée comme étape de purification et de concentration suite à une extraction liquide de type soxhlet ou SLE. Néanmoins, la SPE peut également être utilisée seule pour l'extraction des HAP contenus dans des échantillons liquides, tels que le café (Houessou, 2005).

Choix du support

Les supports SPE les plus fréquemment rencontrés pour l'extraction des HAP sont l'aminopropyl, la silice, l'alumine, le Florisil®, le polystyrène/divinylbenzène (PS-DVB) ou encore le mélange C18/Florisil® (Plaza-Bolaños, 2010 ; Purcaro, 2009 ; Purcaro, 2013).

Le Florisil® est une phase polaire constituée d'oxydes de silicium (environ 85 %) et de magnésium (environ 15 %) permettant l'extraction des HAP de matrices organiques. Le PS-DVB est un agent de sorption très utilisé pour l'extraction des HAP en raison de son caractère hydrophobe et des interactions π - π avec les HAP (Houessou, 2005). Il peut, de plus, être utilisé pour la plupart des matrices alimentaires (Veyrand, 2007).

Choix du solvant

Des mélanges de solvants de polarité différente (par exemple hexane/dichlorométhane, méthanol/tétrahydrofurane ou isooctane/cyclohexane) peuvent être utilisés pour l'extraction des HAP selon l'échantillon considéré. L'utilisation de mélanges de solvants permet de trouver un compromis pour la récupération des HAP lourds et légers (Purcaro, 2013). L'augmentation du pourcentage de tétrahydrofurane dans le mélange méthanol/tétrahydrofurane diminue la polarité du mélange ; appliqué à des échantillons de

café, cela favorise la solubilisation des HAP et leur désorption de la colonne (Houessou, 2005).

1.6.1.2.2. Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion, technique de séparation en phase liquide, est généralement employée comme étape de purification suite à une procédure d'extraction de type soxhlet, SLE ou LLE. Le principe de cette technique consiste à placer l'échantillon dans une colonne contenant des granules micro-poreuses. Les molécules ayant une taille supérieure à celui des pores ne circulent que dans l'espace extra-granulaire et sont rapidement évacuées de la colonne. Les molécules dont le diamètre est inférieur à celui des pores circulent dans l'espace inter- et intra-granulaire et ont un temps de parcours plus long (figure 17). La chromatographie d'exclusion permet la séparation des molécules selon leur diamètre.

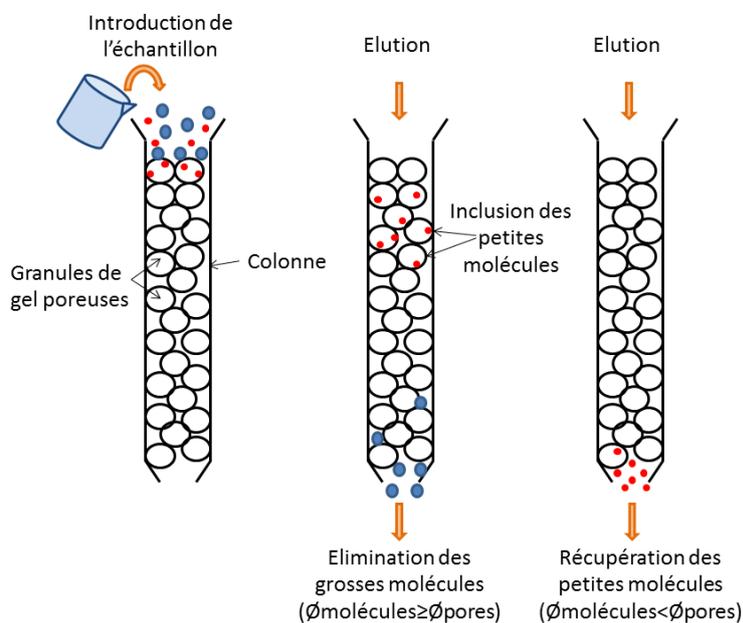


Figure 17 : Principe de la chromatographie d'exclusion

Applications aux hydrocarbures aromatiques

La chromatographie d'exclusion est appliquée suite à une procédure d'extraction liquide telle que le soxhlet, l'ASE, l'UAE ou la MAE pour la récupération des hydrocarbures aromatiques (tableaux 11 et 13).

Cette technique est particulièrement adaptée à la séparation des HAP dont la masse moléculaire est généralement inférieure à 300 g/mol, et des lipides contenues dans les matrices grasses qui ont des masses moléculaires entre 600 et 1500 g/mol (Ballesteros, 2006).

Colonnes chromatographiques

Les colonnes chromatographiques fréquemment rencontrées en chromatographie d'exclusion pour la purification des extraits contenant des hydrocarbures aromatiques se composent de gels d'alumine ou d'oxydes d'aluminium, de silice et également de Florisil®.

Une chromatographie sur gel de silice et d'alumine est, par exemple, associée à la MAE afin d'extraire des HAP contenus dans des échantillons de fruits et de légumes (Wu, 2016).

Solvants d'extraction

La chromatographie d'exclusion est une méthode qui consomme une assez grande quantité de solvant, entre 20 à 80 mL par échantillon. Les solvants utilisés comme phase mobile sont souvent des solvants chlorés tels que le dichlorométhane (DCM) ou le chloroforme (tableaux 11 et 13). Le DCM utilisé seul ou en mélange avec le pentane ou l'hexane est le solvant le plus fréquemment rencontré pour la récupération des hydrocarbures aromatiques. Une élution avec 20 à 80 mL de DCM est notamment réalisée à travers une colonne constituée d'un gel de silice et d'alumine, pour récupérer les HAP d'un extrait UAE de fruits ou de légumes. Cette séparation chromatographique comporte un ajout de sulfate de sodium anhydre fréquemment utilisé comme agent desséchant pour les solutions organiques (Mo, 2009).

1.6.1.3. Procédures d'évaporation de solvant

La présence de faibles quantités d'analytes dans les échantillons et l'utilisation d'importants volumes de solvant au cours de l'extraction nécessitent la mise en place d'une procédure d'évaporation. La réduction du volume de solvant permet ainsi de concentrer l'extrait en composés d'intérêt. L'évaporation des solvants est souvent réalisée par l'application d'un flux gazeux ou par l'utilisation d'un évaporateur rotatif.

1.6.1.3.1. Concentration sous flux gazeux

La concentration sous flux gazeux utilise un gaz inerte, généralement l'azote, avec lequel les composés d'intérêt ne vont pas réagir. Le gaz est envoyé à la surface de l'échantillon à travers une ou plusieurs aiguilles pour permettre l'évaporation du solvant. Cette technique est adaptée aux solvants volatils mais peut se révéler lente pour des solvants tels que l'eau qui sont difficiles à évaporer. Cette technique peut entraîner des pertes par projection dans le cas d'un débit de gaz trop élevé. La concentration s'effectue généralement avec un flux léger.

La concentration sous flux d'azote est notamment utilisée, suite à une étape de purification à travers une colonne de gel de silice et d'alumine, pour réduire le volume de solvants volatils tels que le dichlorométhane (concentration jusqu'à 0,5 mL) dans le cadre de l'extraction des HAP dans des échantillons de fruits et légumes (Mo, 2009).

1.6.1.3.2. Concentration par évaporateur rotatif

L'évaporateur rotatif est un système ayant pour but l'évaporation de solvant afin de concentrer l'échantillon en analytes. Le principe de cette technique est basé sur l'évaporation d'importantes quantités de solvant sous vide d'air. Le solvant contenant l'échantillon est placé dans un ballon mis en rotation dans un bain marie chauffé. La pression du montage est ensuite diminuée grâce à une trompe d'eau. Le solvant porté à ébullition va s'évaporer puis être

refroidi par le système de refroidissement. Les vapeurs condensées de solvant pur vont être récupérées dans un ballon de récupération (figure 18). Cette procédure s'applique à des analytes non thermolabiles afin de minimiser les pertes en composés d'intérêt.

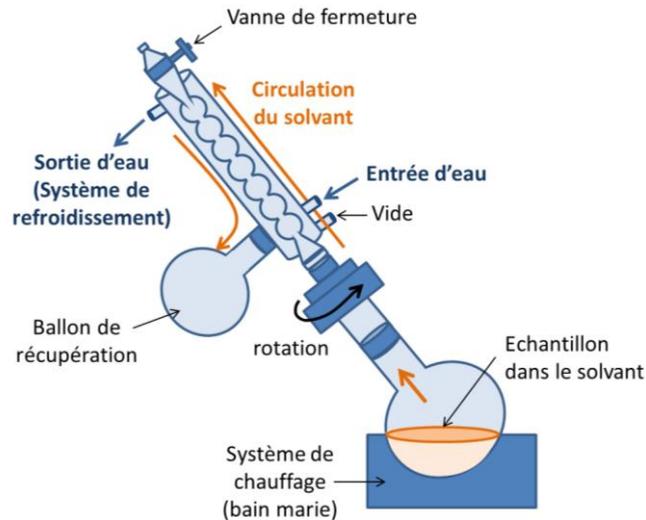


Figure 18 : Principe de l'évaporateur rotatif

L'évaporateur rotatif est notamment utilisé suite à des procédures d'UAE visant à récupérer des HAP dans des fruits et légumes, pour l'élimination de solvants tels que l'hexane ou l'éther éthylique (Mo, 2009 ; Tuteja, 2011).

1.6.1.4. Techniques d'extraction avec support d'extraction miniaturisé

L'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE), la micro-extraction par solide compacté (MEPS), la micro-extraction en phase solide (SPME) et l'extraction dynamique en phase solide (SPDE) sont des techniques d'extraction sans solvant ou très peu consommatrices de solvant également utilisées pour la récupération des hydrocarbures aromatiques. Ce sont des techniques d'extraction miniaturisées basées sur la sorption des analytes sur un support (figure 19).

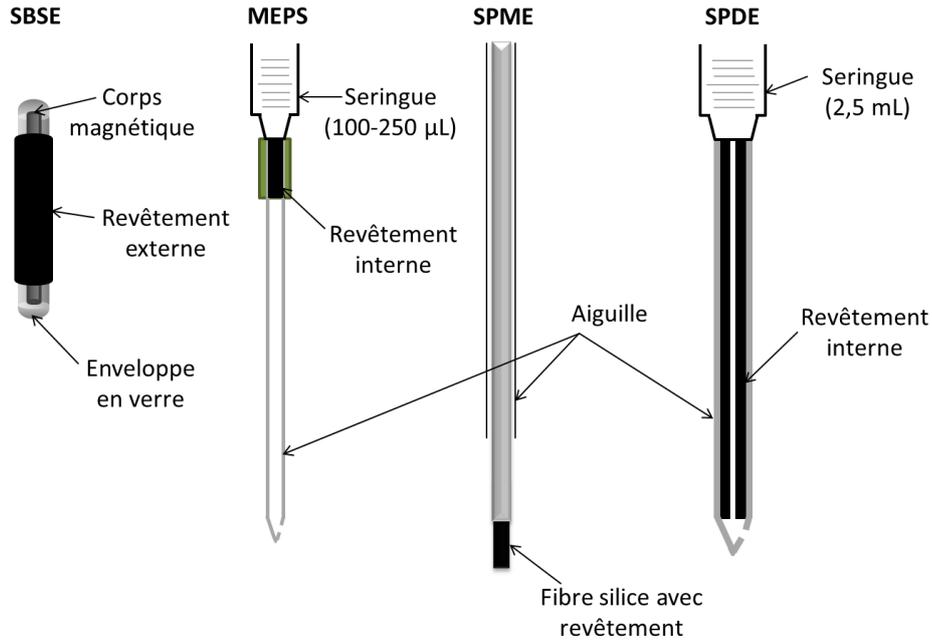


Figure 19 : Comparaison des supports d'extraction miniaturisés

SBSE : extraction par sorption sur barreau magnétique, MEPS : micro-extraction par solide compacté, SPME : micro-extraction en phase solide, SPDE : extraction dynamique en phase solide

1.6.1.4.1. Micro-extraction en phase solide (SPME)

La SPME a été développée par Arthur et Pawliszyn au début des années 1990. Cette technique est basée sur l'équilibre entre les analytes cibles contenus dans un échantillon et ceux adsorbés sur la phase stationnaire d'une fibre. La récupération des analytes cibles s'effectue par immersion directe de la fibre dans l'échantillon (DI-SPME) ou par exposition dans l'espace libre ou espace de tête au-dessus de l'échantillon (HS-SPME) (figure 20).

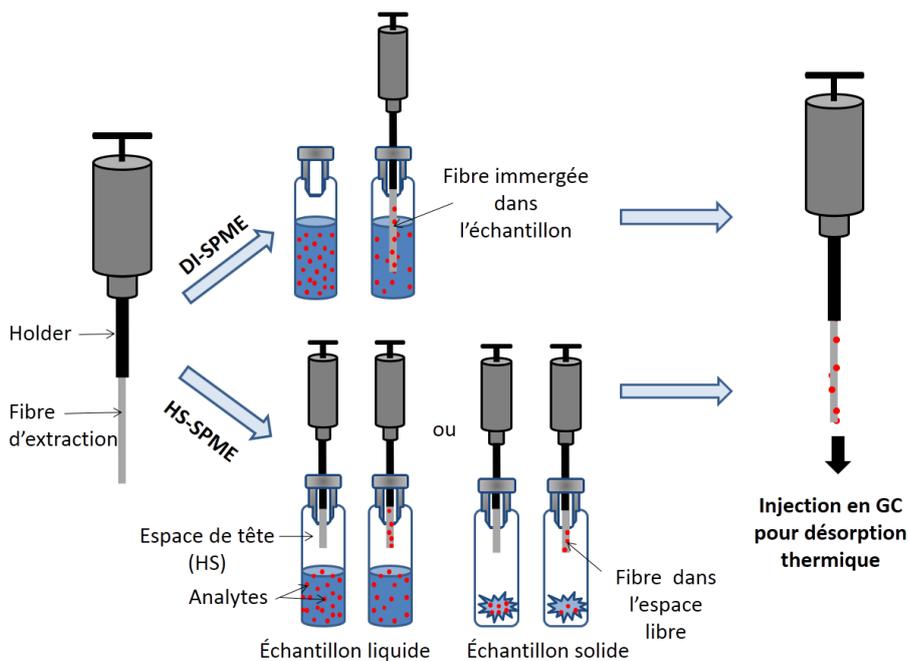


Figure 20 : Principe de la micro-extraction en phase solide (SPME)

DI : immersion directe, HS : extraction dans l'espace de tête

L'équilibre est généralement atteint plus rapidement en HS-SPME qu'en DI-SPME car les molécules ciblées se déplacent plus rapidement dans l'air que dans les matrices liquides ou solides. De plus, l'utilisation d'un espace d'extraction restreint en HS-SPME, permet d'augmenter la concentration des composés dans la phase gazeuse ce qui réduit le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre.

De nombreux paramètres sont susceptibles d'influer sur l'extraction des analytes comme la température, la salinité de l'échantillon, la nature des analytes et leur matrice ainsi que l'épaisseur et le type de revêtement de la fibre.

Choix de la phase stationnaire

La phase stationnaire de la fibre possède généralement un revêtement en silice de 1 à 2 cm de longueur dont l'épaisseur varie entre 7 et 100 μm . Les revêtements les plus fins sont adaptés à l'adsorption des analytes semi-volatils tandis que des revêtements plus épais sont généralement destinés à l'extraction des composés volatils (King, 2003 ; Kataoka, 2000).

Divers types de revêtements sont disponibles pour les fibres d'extraction, tels que le polyacrylate (PA), le divinylbenzène (DVB), le carboxen (CAR) ou le polydiméthylsiloxane (PDMS). Ces constituants peuvent être présents seuls comme le polyacrylate (PA) qui est un revêtement polaire indiqué pour l'extraction des analytes les plus polaires (alcools, phénols) ou en mélange ce qui permet d'augmenter la capacité de rétention des fibres comme avec l'association CAR/PDMS (Kataoka, 2000).

Agitation

L'agitation de l'échantillon permet de diminuer la durée d'extraction, en favorisant le déplacement des analytes vers la fibre, l'équilibre est atteint plus rapidement. Lors de l'extraction en immersion directe, l'épaisseur de la couche statique (limite de Prandtl) qui entoure la fibre est réduite par agitation ce qui permet la diminution de la durée d'extraction (King, 2003).

Choix de la température

La température optimale nécessaire pour assurer l'équilibre entre l'échantillon, l'espace de tête et l'adsorption des analytes sur la fibre doit être identifiée pour chaque type d'échantillon. L'augmentation de la température de l'échantillon peut permettre d'améliorer les rendements d'extraction. Cependant, étant donné la nature exothermique des interactions moléculaires nécessaires à l'adsorption des analytes, l'augmentation de la température peut aussi conduire à une réduction de la constante de distribution, aussi appelée constante de partage, entre le revêtement de la fibre et l'échantillon ou l'espace de tête (King, 2003 ; Peñalver, 1999).

Ajout de sel et modification du pH

L'ajout de sels et l'ajustement du pH peuvent modifier l'équilibre. L'ajout de sels augmente le rendement d'extraction pour certains analytes, en particulier pour les composés polaires et volatils. La réalisation de la procédure d'extraction dans des conditions acides ou alcalines permet le passage des espèces ioniques non volatiles sous forme neutres et favorise respectivement l'extraction des composés acides et basiques (King, 2003 ; Peñalver, 1999).

Récupération des analytes

Les analytes retenus sur la fibre peuvent ensuite être désorbés thermiquement dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse (GC) ou grâce à un solvant pour permettre des analyses en chromatographie liquide à hautes performances (HPLC) ou par électrophorèse.

Avantages et inconvénients de la méthode d'extraction

Les fibres utilisées pour l'extraction sont fragiles, ont une durée de vie limitée et un coût relativement élevé (Plaza-Bolaños, 2010 ; Zhao, 2009). De plus, la faible épaisseur du revêtement sur les fibres peut s'avérer être un facteur limitant pour l'extraction des analytes (Ridgway, 2007a). Néanmoins, la SPME est une technique d'extraction directe et rapide.

Applications

La SPME est une méthode appliquée à l'extraction de nombreux polluants comme les pesticides, les HAP, les PCB, les phénols, les amines aromatiques, les BTEX ou encore les phtalates provenant d'échantillons environnementaux (air, sol, eau), biologiques (sang, urine...) et alimentaires (jus, fruits, légumes, huiles...) aussi bien solides que liquides (Lambropoulou, 2007). Les analytes les plus étudiés par HS-SPME sont des composés volatils tels que les pesticides organophosphorés (OP) ou organochlorés (OC) mais aussi les HAP légers et les BTEX (Lambropoulou, 2007 ; Cavalcante, 2010).

Extraction des hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques étant des composés plutôt volatils leur extraction est généralement réalisée dans l'espace gazeux (tableau 11).

Choix du support d'extraction

Pour les HAP qui sont des composés plutôt apolaires les fibres les plus fréquemment choisies ont un revêtement apolaire (King, 2003). De nombreux types de fibre sont utilisés pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques mais la plupart utilisent le polydiméthylsiloxane (PDMS). Le revêtement PDMS seul est souvent sélectionné pour l'extraction des HAP lourds car même si les fibres Carboxen/polydiméthylsiloxane (CAR/PDMS) montrent de meilleurs rendements d'extraction, la répétabilité des résultats est moins bonne et l'équilibre est plus long à atteindre (Doong, 2000 ; Kataoka, 2000). La fibre de type CarbopackZ/PDMS permet l'extraction des HAP grâce à des interactions π - π (Purcaro, 2007). La fibre Carbowax/PDMS 65 μ m est particulièrement efficace pour l'extraction du Naphtalène mais l'est moins pour les HAP comprenant 4 cycles aromatiques ou plus (Doong, 2000).

Le revêtement divinylbenzène/carboxen/polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) est adapté à l'analyse des HAP ayant une masse moléculaire inférieure ou égale à 202 g/mol (Doong, 2000 ; Vichi, 2005).

Extraction des hydrocarbures aromatiques à partir des matrices environnementales

La comparaison des méthodes SPME (fibre PDMS 100 μm) en immersion directe et en utilisant l'espace de tête avec des échantillons d'eau montre que la HS-SPME permet d'obtenir des réponses 2 à 3 fois supérieures à celles observées en DI-SPME pour les HAP les plus volatils (naphtalène, acénaphthylène, acénaphène, fluorène, phénanthrène et anthracène) (Doong, 2000). La HS-SPME est également appliquée à l'extraction des BTEX à partir d'échantillon aqueux ou de sol grâce à des fibres CAR/PDMS (75 μm) ou PDMS (100 μm) (tableau 11, Ezquerro, 2004 ; Menéndez, 2000).

Extraction des hydrocarbures aromatiques à partir des matrices alimentaires

En ce qui concerne les aliments, la plupart des extractions sont réalisées par HS-SPME en raison de la complexité des matrices alimentaires. En immersion directe (DI-SPME), les composants de la matrice, présents en concentrations plus importantes que les analytes, peuvent entraîner des liaisons compétitives sur les fibres et induire des erreurs de quantification. En DI-SPME, les fibres peuvent être rendues inutilisables par l'adsorption irréversible de protéines (Ridgway, 2007a). Des résidus triglycérides peuvent également être adsorbés sur le revêtement des fibres lors d'extraction à partir de matrices grasses telles que l'huile (Purcaro, 2007 ; Purcaro, 2013).

La HS-SPME est notamment appliquée à la détermination des HAP légers (jusqu'à 202 g/mol) dans les légumes et les BTEX sont étudiés en utilisant l'espace de tête dans les olives (tableau 11, Gilbert-López, 2010 ; Lei, 2011). La HS-SPME s'est également révélée appropriée à l'extraction des BTEX à partir d'échantillons de pommes (Poinot, 2014).

Tableau 11 : Applications de la micro-extraction en phase solide (SPME) pour la récupération des hydrocarbures aromatiques dans des échantillons environnementaux et alimentaires

Référence	Matrice et analytes	Extraction-Purification	Séparation-Détection
Echantillons environnementaux			
Bianchin, 2012	eau (rivière, bouteille, robinet) HAP + BTEX (MM 78-278 g/mol)	25 mL d'échantillon Etude comparative : DI-SPME + HS-SPME (fibres : PDMS 100 µm, PDMS/DVB 65 µm et DVB/CAR/PDMS 50/30 µm, T°C 10–80 °C, temps d'extraction 30–120 min et chlorure de sodium 0–9 g)	GC-qMS (colonne Rtx-5MS, 30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm)
Doong, 2000	eau 16 HAP (MM 128-278 g/mol)	10 mL d'échantillon Etude comparative : DI-SPME et HS-SPME (fibres PDMS 100, 30 ou 7 µm, fibre PA 85 µm et fibre CAR/PDMS 65 µm, temps d'extraction 90 min, T°C 25 ou 60 °C)	GC-FID (colonne HP-5, 30m x 0,5 mm i.d. x 0,5 µm) GC-itMS (colonne Ultra Alloy-5, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)
Ezquerro, 2004	sol BTEX (MM 78-106 g/mol)	15-20 mg sol + 600 µL eau ultrapure (30 °C, agitation 400 rpm, 10 min), HS-SPME x 3 (fibre CAR/PDMS 75 µm, 20 min, désorption 10 min)	GC-FID (colonne CP-Select 624 CB, 30 m x 0,25 mm i.d. x 1,4 µm)
Gilbert-López, 2010	olives et huile d'olive BTEX (MM 78-106 g/mol)	12,5 g d'échantillon d'huile 5 g d'olive + 10 mL eau + 1,5 g KCl Prélèvement dans l'espace de tête (700 rpm, 30 min, 90 °C, couplé à la chromatographie)	GC-qMS (colonne, VF-5ms 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)
Menéndez, 2000	échantillons aqueux BTEX (MM 78-106 g/mol)	10 mL échantillon DI-SPME (10 min, 150 °C, fibre PDMS 100 µm) 11 mL d'échantillon HS-SPME (4 min, RT, fibre PDMS 100 µm)	GC-FID (colonne DB-5, 50 m x 0,53 mm i.d.)
Tankiewicz, 2013	eau (robinet, incendie) hydrocarbures aliphatiques (C6 à C20) + toluène et xylène	2 mL échantillon HS-SPME (fibre 100 µm PDMS, temps d'extraction 5-60 min, T°C 23-90 °C, ajout de sel 5-20% (w/v) chlorure de sodium, agitation 0 à 1000 rpm)	GC-FID (colonne ZB-5, 30 m × 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)

Aliments			
Lei, 2011	légumes 8 HAP (MM 128-202 g/mol)	1g de légume + 2 g eau + NaCl HS-SPME (comparaison de fibres : fibre 30 µm, 70 µm benzoxy-C[6]/OH-TSO, fibre 72 µm C[4]/OH-TSO et fibre PDMS 100 µm, 20-100 °C, 0-120 h, NaCl 0-240 mg/g, 0-600 rpm, addition de solvant 20 µL : méthanol, éthanol, DCM, ACN, hexane, acétone)	GC-FID (colonne SE-54, 30 m x 0.32 mm i.d. x 0,25 µm)
Poinot, 2014	pomme BTEX et HAP (MM 78-202 g/mol)	Etude comparative : - HS-SPME (fibres CAR/PDMS 75 µm, PDMS/DVB 65 µm, temps d'extraction 15, 30 et 45 min, températures 40, 60 et 80 °C, 20 g d'échantillon) – SPE (1 g d'échantillon + 5 mL cyclohexane, agitation 1 min, cartouche Envi Chrom-P, élution 12 mL cyclohexane/acétate d'éthyle 40/60, concentration N ₂) – soxhlet (5 g d'échantillon + 2,5 g sulfate de sodium anhydre, 250 mL cyclohexane/DCM 1/1, 6 h, concentration par évaporateur rotatif puis N ₂ , injection ou étape SPE avec 150 µL d'extrait) – UAE (1 g d'échantillon + 10 mL DCM, ultrasons 30 kHz, 30 °C, 10 min, centrifugation (3000 rpm, 10 min, 30 °C), filtration, récupération du résidu + 10 mL cyclohexane, ultrasons 30 kHz, 30 °C, 10 min, centrifugation (3000 rpm, 10 min, 30 °C), filtration, concentration par évaporateur rotatif des extraits DCM et cyclohexane, injection ou étape SPE)	GC-itMS (colonne DB5-MS, 60 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)
Vichi, 2005	huile BTEX et HAP (jusqu'à 4 cycles) (MM 91-202 g/mol)	HS-SPME (fibre DVB/Car/PDMS, 50/30 µm, 700rpm, T° 40-100 °C, temps d'exposition 15-60 min)	GC-qMS (colonnes Supelcowax-10 et HP-5MS, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)

Abbreviations : ACN : acétonitrile , Al₂O₃ : oxyde d'aluminium, ASE : extraction accélérée par solvant (ou PLE : extraction liquide pressurisée), CAR : Carboxen, DCM : dichlorométhane, DI-SPME : micro-extraction en phase solide en immersion directe, DVB : divinylbenzène, GC : chromatographie en phase gazeuse (FID : détecteur ionisation flamme, itMS : spectromètre de masse à trappe ionique, qMS : spectromètre de masse quadripolaire), HS-SPME : micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête, i.d.: diamètre interne, MM: masse moléculaire, PDMS : polydiméthylsiloxane, rpm : rotation par minute, RT : température ambiante

1.6.1.4.2. Extraction dynamique en phase solide (SPDE)

Des techniques utilisant des aiguilles dont les surfaces internes sont recouvertes d'un revêtement d'extraction ont commencé à apparaître dès la fin des années 1990. Puis, le premier dispositif commercial d'extraction dynamique en phase solide (SPDE) développé par Chromtech (Idstein, Allemagne) est apparu en 2000.

La SPDE met en œuvre une seringue étanche de 2,5 mL équipée d'une aiguille en acier inoxydable (8 cm) dont l'intérieur est revêtu d'un film d'épaisseur variable, généralement 50 μm d'un mélange de polydiméthylsiloxane (PDMS) et de 10% de charbon actif (figure 19).

L'échantillon liquide ou gazeux est aspiré dans la seringue et les analytes sont adsorbés sur la phase stationnaire. L'aspiration peut être renouvelée plusieurs fois afin de permettre d'augmenter la quantité d'analyte extraite. L'adsorption des composés d'intérêt réside dans l'équilibre de partage qui se crée entre l'échantillon et le support d'extraction. Suite au prélèvement, la seringue est dirigée grâce à un automate vers l'insert d'un chromatographe en phase gazeuse pour permettre la désorption et l'analyse des composés d'intérêt.

La SPDE est une procédure généralement automatisée et dont la seringue a une durée de vie d'environ 1500 injections.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

La SPDE dans l'espace de tête est notamment utilisée pour l'extraction des HAP à partir d'échantillons d'eau. Cette extraction est réalisée grâce à une seringue dont la surface interne est recouverte de polypyrrole. Le polypyrrole est un polymère particulièrement adapté à l'extraction des HAP en raison de sa structure poreuse offrant une large surface d'échange mais aussi pour ses propriétés hydrophobes mettant en œuvre des interactions π - π (Begheri, 2009). La SPDE dans l'espace de tête est également appliquée à l'extraction des BTEX dans des boissons grâce à des supports d'extraction composé de polydiméthylsiloxane (PDMS) seul ou associé à 10 % de charbon actif. Ces 2 supports se montrent efficaces pour l'extraction des BTEX avec des pourcentages de récupération supérieurs à 72 % (Ridgway, 2007b).

1.6.1.4.3. Extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE)

L'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE) a été développée par Baltussen *et al.* en 1999 (Baltussen, 1999). Elle est principalement destinée à l'extraction de composés d'intérêt dans une phase liquide. La SBSE est basée sur la sorption des analytes sur un film très épais de PDMS recouvrant un barreau d'agitation magnétique (figure 21). L'extraction des analytes s'effectue à l'équilibre entre la matrice et la phase stationnaire.

Les analytes adsorbés et concentrés sur le revêtement sont récupérés soit par désorption thermique puis directement transférés dans un chromatographe en phase gazeuse (GC) ou soit grâce à un solvant pour permettre l'analyse par chromatographie liquide à hautes performances (HPLC).

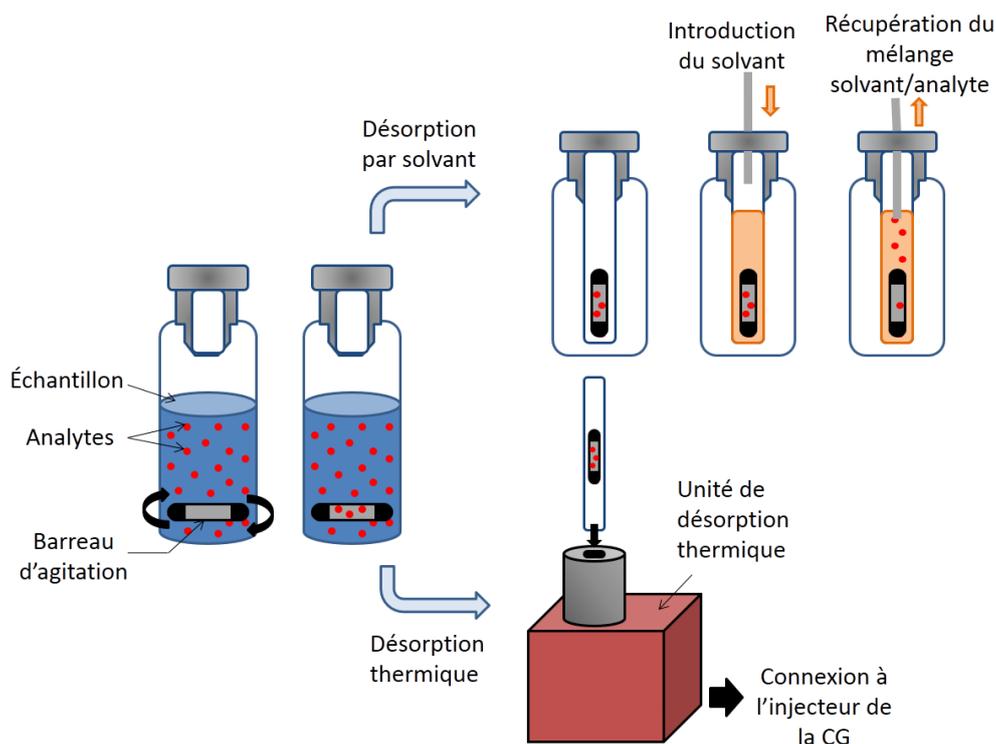


Figure 21 : Principe de l'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE)

En SBSE, le revêtement se limite le plus souvent au PDMS qui est un matériau inerte particulièrement adapté à l'adsorption des composés apolaires (Ridgway, 2007a). Néanmoins, du fait d'une plus grande quantité de polymère présente sur le barreau magnétique, la SBSE procure une capacité d'adsorption plus importante que la SPME. De plus, l'épaisseur importante du barreau magnétique permet de pallier au problème de fragilité rencontré avec les fibres SPME (Ridgway, 2007a ; Zuin, 2006).

Applications

La SBSE est généralement utilisée pour extraire des composés volatils et semi-volatils apolaires ou très faiblement polaires, tels que les pesticides ou les hydrocarbures aromatiques, dans des matrices non grasses (Ridgway, 2007a). Elle est notamment utilisée pour l'extraction du benzo(a)pyrène dans des échantillons de jus de canne à sucre ; l'extraction de cet HAP y est plus efficace et répétable qu'avec la MASE (Zuin, 2006). La SBSE est aussi appliquée à l'extraction des BTEX à partir d'échantillons d'eau. L'utilisation du support polypyrrole-dodécyl sulfate permet la rétention des BTEX par l'intermédiaire d'interactions π - π (Babanezhad, 2012).

La SBSE est aussi utilisée pour des matrices grasses puisqu'elle a permis l'extraction des BTEX à partir d'exsudats obtenus après cuisson d'échantillons de viande (Benet, 2015).

La SBSE est une procédure qui est largement appliquée aux échantillons liquides d'origine biologique (sang, urine), environnementale (eaux de rivières) et alimentaire (boissons, miel) mais également à des matrices gazeuses (Ridgway, 2007a ; Li, 2011). Lors d'expérimentations menées sur les HAP dans l'air intérieur, le barreau est utilisé comme capteur passif et est suspendu dans l'environnement à analyser (Li, 2011).

La SBSE est également mise en œuvre pour des matrices solides ayant subi une extraction liquide préalable. La SBSE est par exemple appliquée à l'extraction de HAP, tels que le phénanthrène ou le benzo(*ghi*)perylène, contenus dans un matériau de référence (SRM 1649a) suite à une étape de MAE (Yamaguchi, 2010).

1.6.1.4.4. Micro-extraction par solide compacté (MEPS)

La micro-extraction par solide compacté (MEPS) a été utilisée pour la première fois en 2004 par Abdel-Rehim *et al.* et consiste en une miniaturisation de la procédure d'extraction en phase solide (SPE) (Abdel-Rehim, 2004). Une seringue (100-250 μL) dans laquelle se trouve 1 à 4 mg de sorbant est utilisée pour prélever un échantillon, généralement sous forme liquide. L'extraction en MEPS peut comprendre de multiples cycles de prélèvements. Un même aliquot peut être extrait plusieurs fois en aspirant puis rejetant un volume défini d'échantillon dans un même flacon (va-et-vient) ou plusieurs aliquots d'échantillon peuvent être extraits, chaque aliquot est aspiré une fois puis est éliminé de la seringue MEPS (aspiration-élimination) (Abdel-Rehim 2010). Les analytes sont retenus par le support et doivent ensuite être récupérés par élution. Le solvant d'élution doit être un solvant organique capable d'éluer, avec un faible volume (20 à 50 μL), l'ensemble des analytes retenus par le support MEPS. Le passage d'un volume important d'échantillon à travers le support MEPS et l'utilisation d'une faible quantité de solvant pour l'élution permet d'augmenter la concentration de l'extrait en composés d'intérêt (Silva, 2014).

La MEPS est une méthode d'extraction rapide et facile à mettre en œuvre. La procédure peut être automatisée et couplée avec des systèmes d'analyse chromatographique. Néanmoins, l'aspiration de l'échantillon à travers la seringue MEPS doit être lente et régulière car une vitesse trop importante empêche l'adsorption des analytes sur le sorbant et induit une faible répétabilité des résultats (Wang, 2011).

La MEPS a pour avantage d'être plus rapide et moins consommatrice de solvant que la SPE. Les volumes d'échantillon passant à travers le support MEPS peuvent varier de 10 μL à environ 1 mL alors que la SPE nécessite plusieurs millilitres d'échantillon (Silva, 2014). De plus, le sorbant de la seringue MEPS peut être utilisé plus de 100 fois contrairement aux cartouches SPE qui sont souvent à usage unique.

Choix du support d'extraction

Les supports MEPS peuvent être de différentes natures et permettre des extractions en phase normale (extraction d'analytes polaires provenant de solvants organiques non polaires), en phase inverse (extraction d'analytes hydrophobes ou d'analytes organiques à partir de matrices aqueuses) ou en mode mixte avec échanges d'ions (extraction d'analytes chargés dans des échantillons organiques non polaire ou aqueux). Les supports disponibles en MEPS sont notamment de type C18, C8 ou C2 (extraction en phase inverse), mais il existe également des supports en silice (extraction en phase normale), HILIC (chromatographie liquide d'interaction hydrophile) ou en copolymère de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB).

Applications

La MEPS trouve de nombreuses applications pour la recherche de médicaments et de métabolites dans les fluides biologiques tels que l'urine, le plasma ou le sang (Abdel-Rehim, 2011).

Extraction des hydrocarbures aromatiques

La MEPS est une technique notamment adaptée à l'extraction des HAP dans des échantillons d'eau (tableau 12). La méthode MEPS développée par El-Beqqali *et al.* (El-Beqqali, 2006) pour l'extraction d'anthracène, de chrysène, de fluoranthène, de fluorène et de pyrène de l'eau consiste à prélever un échantillon de 50 μL 60 fois grâce à une seringue MEPS (250 μL) contenant 1 mg de sorbant silice-C8. L'élution des analytes est ensuite effectuée grâce à 30 μL de méthanol. La MEPS est également appliquée à l'extraction de 8 HAP (naphthalène, pyrène, anthracène, acénaphthylène, phénanthrène, fluoranthène, fluorène et acénaphthène) dans des échantillons d'eau provenant de lacs et de rivières. La procédure utilise une seringue de 100 μL possédant un sorbant C18 pour prélever 50 μL d'échantillon qui est aspiré puis évacué de la seringue 40 fois. Les analytes sont récupérés par élution avec 50 μL de méthanol (Fu, 2012). L'extraction par MEPS s'effectue généralement avec des sorbants de type C8 ou C18 pour la récupération des HAP dans les échantillons d'eau (El-Beqqali, 2006 ; Fu, 2012). Les HAP étant des composés hydrophobes, leur extraction en MEPS nécessite qu'ils soient contenus dans une matrice polaire (Silva, 2014).

Tableau 12 : Applications de la micro-extraction par solide compacté (MEPS) pour la récupération des hydrocarbures aromatiques dans des échantillons d'eau

Référence	Composés étudiés	Extraction	Séparation/détection	Performances																								
El-Beqqali, 2006	5 HAP (MM 166-228 g/mol)	MEPS (seringue 250 µL, 1 mg silice-C8) : conditionnement (50 µL méthanol et 50 µL eau), prélèvement 50 µL (aspiré et rejeté 60 fois), élution (30 µL méthanol)	GC-msdMS (colonne HP-50, 25 m x 0,25 mm i.d., 0,31 µm)	Linéarité 10-1000 ng/L R ² (n=6) 0,998-0,999 LOD 1-5 ng/L LOQ 5 ng/L Fidélité Intrajournalière (n=6) 5,6-14 % Interjournalière (n=18) 8,3-16 %																								
Fu, 2012	8 HAP (MM 128-202 g/mol)	Comparaison de méthode : MEPS (seringue 100 µL, support C18) : conditionnement (80 µL méthanol et 100 µL eau ultrapure), prélèvement 50 µL (aspiré et rejeté 40 fois), rinçage (100 µL eau ultrapure), séchage (10 cycles prélèvement d'air), élution (50 µL méthanol) SPE (cartouche C18, 1 g, 6 mL) : conditionnement (10 mL méthanol), rinçage (10 mL eau ultrapure), passage de 50 mL d'échantillon, rinçage (5 mL eau), séchage de la cartouche (N ₂ , 10 min), élution (10 mL méthanol), concentration (évaporateur rotatif), ajustement du volume d'échantillon à 1 mL (acétone)	GC-qMS (colonne capillaire silice Rxi-5ms, 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm)	<table border="0"> <tr> <th>MEPS</th> <th>SPE</th> </tr> <tr> <td>Linéarité 0,05-2 µg/L</td> <td>Linéarité 0,25-10 µg/L</td> </tr> <tr> <td>R² 0,9965-0,9997</td> <td>R² 0,9978-0,9998</td> </tr> <tr> <td>LOD 0,8-8,2 ng/L</td> <td>LOD 4,8-35,9 ng/L</td> </tr> <tr> <td>LOQ 2,5-27,5 ng/L</td> <td>LOQ 15,8-119,6 ng/L</td> </tr> <tr> <td>Répétabilité (n=5, eau ultrapure)</td> <td>Répétabilité (n=5, eau ultrapure)</td> </tr> <tr> <td>1,0-7,6 % (0,1 µg/L)</td> <td>1,5-7,8 % (0,5 µg/L)</td> </tr> <tr> <td>2,7-9,9 % (0,5 µg/L)</td> <td>0,8-8,2 % (2 µg/L)</td> </tr> <tr> <td>0,7-8,9 % (2 µg/L)</td> <td>3,3-9,5 % (10 µg/L)</td> </tr> <tr> <td>Répétabilité (n=5, échantillons environnementaux)</td> <td>Répétabilité (n=5, échantillons environnementaux)</td> </tr> <tr> <td>1,6-14,0 % (0,1, 0,5 et 1,5 µg/L)</td> <td>2,7-14,6 % (0,35, 4 et 8 µg/L)</td> </tr> <tr> <td>Récupération 70-117 %</td> <td>Récupération 72-134 %</td> </tr> </table>	MEPS	SPE	Linéarité 0,05-2 µg/L	Linéarité 0,25-10 µg/L	R ² 0,9965-0,9997	R ² 0,9978-0,9998	LOD 0,8-8,2 ng/L	LOD 4,8-35,9 ng/L	LOQ 2,5-27,5 ng/L	LOQ 15,8-119,6 ng/L	Répétabilité (n=5, eau ultrapure)	Répétabilité (n=5, eau ultrapure)	1,0-7,6 % (0,1 µg/L)	1,5-7,8 % (0,5 µg/L)	2,7-9,9 % (0,5 µg/L)	0,8-8,2 % (2 µg/L)	0,7-8,9 % (2 µg/L)	3,3-9,5 % (10 µg/L)	Répétabilité (n=5, échantillons environnementaux)	Répétabilité (n=5, échantillons environnementaux)	1,6-14,0 % (0,1, 0,5 et 1,5 µg/L)	2,7-14,6 % (0,35, 4 et 8 µg/L)	Récupération 70-117 %	Récupération 72-134 %
MEPS	SPE																											
Linéarité 0,05-2 µg/L	Linéarité 0,25-10 µg/L																											
R ² 0,9965-0,9997	R ² 0,9978-0,9998																											
LOD 0,8-8,2 ng/L	LOD 4,8-35,9 ng/L																											
LOQ 2,5-27,5 ng/L	LOQ 15,8-119,6 ng/L																											
Répétabilité (n=5, eau ultrapure)	Répétabilité (n=5, eau ultrapure)																											
1,0-7,6 % (0,1 µg/L)	1,5-7,8 % (0,5 µg/L)																											
2,7-9,9 % (0,5 µg/L)	0,8-8,2 % (2 µg/L)																											
0,7-8,9 % (2 µg/L)	3,3-9,5 % (10 µg/L)																											
Répétabilité (n=5, échantillons environnementaux)	Répétabilité (n=5, échantillons environnementaux)																											
1,6-14,0 % (0,1, 0,5 et 1,5 µg/L)	2,7-14,6 % (0,35, 4 et 8 µg/L)																											
Récupération 70-117 %	Récupération 72-134 %																											
Quinto, 2012	16 HAP (MM 128-278 g/mol)	MEPS (seringue 50 µL, support silice C8) : conditionnement (100 µL méthanol et 100 µL eau ultrapure), prélèvement (aspiré et rejeté 300 fois), élution (50 µL méthanol aspiré et rejeté 20 fois)	GC-MS (colonne BPX50, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)	Linéarité 10-1000 ng/L R 0,9963-0,9993 LOD 0,5-2 ng/L LOQ 1,6-6,2 ng/L Répétabilité (n=3) 0,5-14,2 % (50, 100 et 200 ng/L) Fidélité Intrajournalière (n=6) 5,8-10,1 % Interjournalière (n=24) 7,5-12 % Récupération 55,7-85,3 %																								

Abbreviations : CV : coefficient de variation, GC : chromatographie en phase gazeuse (qMS : spectromètre de masse quadripolaire, msdMS : détecteur sélectif de masse), i.d.: diamètre interne, LOD: Limite de détection, LOQ: Limite de quantification, MEPS : micro-extraction par solide compacté, MM: masse moléculaire, SPE : extraction en phase solide

Extractions à partir de matrices solides

Très peu d'exemples d'applications de la MEPS à des échantillons solides sont disponibles dans la littérature (Yang, 2017). La mélatonine et certains antioxydants sont notamment extraits par MEPS à partir d'échantillons de raisin broyés puis soumis à une étape de centrifugation afin de récupérer le surnageant (Mercolini, 2012). Dans cette étude, l'application de la MEPS au raisin a nécessité très peu de préparation pour l'échantillon. Néanmoins, pour la majorité des matrices solides, une étape d'extraction en milieu liquide doit être effectuée préalablement à la procédure MEPS (tableau 13). Une extraction liquide pressurisée (PLE) est par exemple réalisée avant une purification par MEPS afin de récupérer les bromodiphényl éthers d'échantillons de boues d'épuration (Martínez-Moral, 2014).

Tableau 13 : Applications de la micro-extraction par solide compacté (MEPS) pour la récupération d'analytes dans des matrices solides

Référence	Matrice	Composés étudiés	Extraction	Séparation/détection	Performances	Récupération
Du, 2014	porc	Clenbuterol	2 g broyat de porc + 4 mL ACN, UAE (5 min), centrifugation (8000 rpm, 10 min), évaporation du surnageant (N ₂), dissolution 1 mL eau ultrapure MEPS (seringue 1 mL, support 4 mg SMIPs) : conditionnement (2 mL méthanol et 2 mL eau), prélèvement (300 µL 25 fois), rinçage (300 µL ACN/eau 50:50 v:v), élution (500 L mélange méthanol/acide chlorhydrique 90:10 v/v), évaporation à sec (N ₂), dissolution 50 µL phase mobile	HPLC-UV (colonne VP-ODS, 250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm phase mobile méthanol/eau (30:70) 1 mL/min)	Linéarité 0,02-50 µg/kg R ² 0,9989 Répétabilité (n=5) 4,2-6,4 % (0,02, 1 et 50 µg/kg) Précision intermédiaire (n=3) 6,8-10,1 % (0,02, 1 et 50 µg/kg) LOD 0,009 µg/kg LOQ 0,02 µg/kg	86,5-91,2 %
Martínez-Moral, 2014	boues d'épuration	Diphényléthers bromés	PLE (ASE200) : échantillon lyophilisé + Florisil + sulfate de sodium, extraction hexane:DCM 50:50 (40 °C, 2min), évaporation, filtration (filtre nylon, 0,45 µm), dilution (volume final 5 mL), 100 µL d'extrait évaporé à sec, addition 250 µL acétone + 750 µL eau MEPS (seringue 100-250 µL, supports 1-2 mg C2, C8, C18, silice, MIPs) : conditionnement (3 x 250 µL méthanol et 250 µL eau), prélèvement échantillon (250 µL 10 fois), rinçage (250 µL eau), séchage (250 µL air 5 fois), élution (100 µL hexane)	GC-itMS/MS (colonne VF-5MS, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm)	R ² 0,9977-0,9997 Répétabilité (n=3) 4-7 % Fidélité intermédiaire (n=3) 7-14 % LOD instrument 0,4-6 pg/mL LOD méthode 0,01-0,04 µg/g	92±11-102±9 %
Mercolini, 2012	raisin et produits dérivés	Mélatonine et antioxydants	Echantillon liquide : centrifugation (5 min, 1400 x g), filtration surnageant x 2 (filtre 0,45 µm), congélation (-20 °C, 1h) Raisin : 10 grains (50-80 g) broyés, centrifugation (5 min, 1400 x g), surnageant congelé (-20 °C, 1h) Décongélation des échantillons, centrifugation (5 min, 1400 x g) MEPS (seringue 250 µL, support C8) : conditionnement (100 µL méthanol 3 fois et 100 µL eau ultrapure 3 fois), prélèvement : mélange 100 µL surnageant + 10 µL solution étalon interne (10 fois), rinçage (x2, 100 µL eau), élution (250 µL méthanol 3 fois), évaporation de l'éluat (évaporateur rotatif), dissolution 100 µL phase mobile	HPLC-FLD (colonne Microsorb MV-Rainin C8, 250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm, pré-colonne C8, phase mobile ACN/tampon phosphate, 0,8 mL/min)	R ² 0,9992-0,9997 Répétabilité (n=6) 2,5-4,8 % Fidélité intermédiaire (n=6) 2,8-5,5 % LOD 0,02-10 ng/g LOQ 0,05-25 ng/g	91-96 %
Mercolini, 2016	feuille d'argan	Composés phénoliques	Séchage échantillon (40 °C) Extraction x 3 : sous agitation (25 g de broyat + 250 mL éthanol 70 %, 24 h), filtration (Büchner), séchage (faible pression) Solubilisation de l'extrait 50 mL eau + 50 mL de chloroforme x 3 Evaporation (évaporateur rotatif) des phases aqueuse et organique Dissolution des extraits dans méthanol, centrifugation, filtration du surnageant (filtre nylon 0,45 µm) MEPS (seringue 100 µL, support C8+SCX) : conditionnement (200 µL méthanol et 200 µL eau ultrapure), prélèvement (10 fois) mélange 100 µL échantillon dilué + 100 µL eau ultrapure + 5 µL solution étalon interne, rinçage (100 µL eau et 100 µL eau/méthanol, 90:10, v:v), élution (500 µL méthanol), éluat séché sous vide, dissolution 100 µL méthanol	LC-DAD-qMS/MS (colonne Waters XTerra MS C18, 100 mm x 2,1 mm i.d. x 3,5 µm, gradient phase mobile : 0 min acide formique/ACN 98:2, augmentation 5 min jusqu'à acide formique/ACN 75:25, maintenu 5 min, diminution 1 min jusqu'à acide formique/ACN 98:2, maintenu 2 min, 0,3 mL/min)	Linéarité 0,3-100 ng/mL R ² > 0,9991 Répétabilité (n=6) 3,6-4,7 % Fidélité intermédiaire (n=6) 4,4-5,4 % LOD 0,1 ng/mL LOQ 0,3 ng/mL	91-95 %

Miyaguchi, 2009	cheveu	Amphétamine et méthamphétamine	Echantillon 1 mg pour la quantification et 5 mg pour l'identification Extraction micro-pulvérisation: 20 µL 3-amino-1-phénylbutane + 230 µL eau, homogénéisation (5 min, pulvérisateur automatique 1500 coup/min), centrifugation, addition de sorbant (Oasis MAX), vortex (1 min), centrifugation, filtration (filtre microporeux Poly(fluorure de vinylidène) 0,45 µm) acétylation (12,5 µL Na ₂ CO ₃ + 5 µL anhydride acétique) MEPS (seringue 100 µL, support octadécylsilice) : conditionnement (100 µL méthanol et 50 µL eau), échantillon 80 µL (15 fois), rinçage (50 µL, 20 % méthanol), élution (50 µL méthanol)	GC-MS (colonne DB-17ms, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm) Extraction micro-pulvérisation-LC/MS/MS (colonne Capcell Pak CR, 150 mm x 2 mm i.d. x 5 µm, phase mobile ACN-acétate d'ammonium 7:3, 0,3 mL/min)	Déterminations intrajournalières (n=5) 3,6-7,0 % (0,2, 5 et 50 ng/mg) interjournalières (n=5) 2,6-10,6 % (0,2, 5 et 50 ng/mg) LOQ 0,2 ng/mg	61,1-74,2 %
Paredes, 2014	sol	Chlorophénols	2,5 g échantillon + 6 mL bicarbonate de potassium + 120 µL anhydride acétique, vortex (5 min), centrifugation (4500 rpm, 5 min), filtration (filtre PTFE 0,45 µm) QuEChERS : 2,5 mL acétate d'éthyle, homogénéisation (1,5 min), addition 1 g MgSO ₄ + 0,25 g NaCl, homogénéisation (1 min), filtration de la phase organique (filtre PTFE 0,45 µm) MEPS (support C18) : conditionnement (100 µL acétate d'éthyle et 100 µL eau ultrapure), prélèvement 1 mL (10 x 100 µL), rinçage x 2 (100 µL), séchage (10 x 100 µL air), élution (10 µL acétate d'éthyle)	GC-qMS (colonne DB-VRX, 20 m x 0,18 mm x 1 µm)	Linéarité 1-12 µg/kg R ² 0,9861-0,9966 Répétabilité (n=10, 5 µg/kg) 6,6-9,4 % Reproductibilité (n=8x3, 5 µg/kg) 7,1-11 % LOD 0,118-0,894 µg/kg LOQ 0,353-2,683 µg/kg	13-23 %
Sánchez, 2014	textile	Amines aromatiques	Echantillon 0,2 g + 4,25 mL tampon citrate + 0,75 mL dithionite de sodium, vortex (3000 rpm, 1 min), UAE (70 °C, 30 min), retour RT, MEPS (seringue 500 µL, supports C18, PGC, PEP) : conditionnement (500 µL 1-propanol et 500 µL eau ultrapure), échantillon vortexé (3000 rpm, 1 min), filtré (filtre PTFE 0,45 µm) : 3 mL (6 x 500 µL), lavage (250 µL eau ultrapure), séchage (10 x 500 µL air), élution (60 µL 1-propanol) SALLE : élimination du solvant, addition 750 µL acétate d'éthyle, mélange (3000 rpm, 1 min), centrifugation (4000 rpm, 5 min), filtration (filtre PTFE 0,45 µm)	GC-qMS (colonne DB-VRX, 20 m x 0,18 mm i.d. x 1 µm)	MEPS R ² 0,9972-1,0000 Répétabilité (n=8) 2-14 % Reproductibilité (n=24) 6-22 % LOD 0,04-42 µg/L LOQ 0,13-139 µg/L SALLE R ² 0,9971-0,9998 Répétabilité (n=8) 3-11 % Reproductibilité (n=24) 5-18 % LOD 0,1-3,7 µg/L LOQ 0,35-12 µg/L	MEPS 1-96 % SALLE 26-99 %

Abbreviations : ACN : acétonitrile, ASE : extraction accélérée par solvant (ou PLE : extraction liquide pressurisée), DCM : dichlorométhane, GC : chromatographie en phase gazeuse (qMS : spectromètre de masse quadripolaire, itMS : spectromètre de masse à trappe ionique), HPLC : chromatographie liquide à hautes performances (DAD : détecteur de diode, FLD : détecteur à fluorescence, UV : détecteur ultraviolet-visible), i.d. : diamètre interne, LOD : Limite de détection, LOQ : Limite de quantification, MEPS : micro-extraction par solide compacté, MIPs : polymères à empreinte moléculaire, PGC : carbone graphite poreux, PEP : polar enhanced polymer, PTFE : polytetrafluoroéthylène, QuEChERS : Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, SALLE : extraction liquide-liquide assistée par salage, SMIPs : surface de polymères à empreinte moléculaire, UAE : extraction assistée par les ultrasons

Les méthodes utilisant un support pour la récupération des hydrocarbures aromatiques permettent une extraction sélective des composés d'intérêt. Ces procédures ont pour avantage d'être rapide et ne nécessitent pas l'utilisation d'une étape supplémentaire de concentration.

De plus, les techniques SBSE, SPME et SPDE permettent la désorption directe des analytes dans l'injecteur d'un système de séparation chromatographique.

1.6.2. Séparation et détection analytique des hydrocarbures aromatiques

Suite à l'extraction, la détermination des faibles quantités d'hydrocarbures aromatiques nécessite l'utilisation de systèmes de séparation et de détection sensibles et résolutifs. Les techniques chromatographiques en phase liquide (HPLC) et gazeuse (GC) se montrent suffisamment efficaces pour permettre la séparation des hydrocarbures aromatiques.

Suite à la séparation par chromatographie liquide, les détecteurs les plus communément rencontrés pour la détection hydrocarbures aromatiques sont le détecteur ultraviolet-visible (UV), le détecteur à barrette de diodes (DAD), le détecteur de fluorescence (FLD) et le spectromètre de masse (MS). La séparation par chromatographie gazeuse est quand-à-elle généralement couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) ou à un spectromètre de masse (MS).

1.6.2.1. Séparation par chromatographie liquide à hautes performances (HPLC)

La chromatographie liquide à hautes performances (HPLC) est une méthode séparative d'adsorption, de partage, d'échange d'ion ou d'exclusion stérique. Cette technique utilise une phase mobile liquide, de force ionique variable, généralement constituée d'un mélange de solvants. La phase mobile traverse la colonne contenant une phase stationnaire qui est constituée de matériaux monolithiques poreux ou de micro-particules sphériques ayant un diamètre compris entre 2 et 10 μm . La chromatographie liquide à ultra performances (UPLC) et la chromatographie liquide à hautes températures (HTLC) utilisent le principe de l'HPLC avec respectivement des diamètres de particules inférieurs à 2 μm et des températures élevées (généralement 50-150 $^{\circ}\text{C}$).

L'HPLC couvre une grande partie du domaine d'application de la chromatographie en phase gazeuse et est, de plus, particulièrement adaptée à l'analyse des composés thermosensibles, polaires et de masses moléculaires élevées.

Choix du mode de séparation

En HPLC, la séparation peut s'effectuer en phase normale ou en phase inverse. En phase normale, la phase stationnaire est constituée de gel de silice, très polaire et la phase mobile utilisée est apolaire. La phase normale permet ainsi la rétention des composés polaires. Néanmoins, la phase normale est aussi appliquée à la séparation des hydrocarbures aromatiques par Wilson *et al.* (2017) avec une phase stationnaire aminopropyl et une phase mobile composée de 98 % de n-hexane et de 2 % de dichlorométhane (Wilson, 2017). D'autres phases stationnaires avec des groupements fonctionnels cyano-, phenyl-, pentabromobenzyl-, nitrophenyl- et amino- sont également utilisées pour la séparation des

hydrocarbures aromatiques en phase normale en association avec des mélanges hexane et de méthyl tert-butyl éther pour la phase mobile (Olsson, 2014).

Les phases stationnaires composées de silice greffée avec des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18) sont utilisées en phase inverse. Le greffage du support en silice conduit à une diminution de sa polarité, ce qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile polaire. La phase inverse est particulièrement adaptée à la rétention des composés apolaires, tels que les hydrocarbures. Le caractère hydrophobe des hydrocarbures aromatiques permet à ces composés d'être retenus par des colonnes de type phase inverse.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

Les colonnes apolaires de type C18 ou Supercosil® ayant une longueur comprise entre 100 et 250 mm et un diamètre interne de 3,0 à 4,6 mm avec des diamètres de particules de 3 à 5 µm, sont principalement utilisées pour la séparation des hydrocarbures aromatiques. Ces colonnes sont aussi bien utilisées dans le cas d'échantillons environnementaux (sol, bois) que d'échantillons alimentaires (viandes fumées, fruits et légumes) (Bishnoi 2006 ; Hollender 2003 ; Moret 2007 ; Purcaro 2009 ; Tuteja 2011).

La séparation des hydrocarbures aromatiques en phase inverse est la plus répandue et utilise pour la phase mobile des mélanges de solvants ayant des polarités différentes, tels que l'eau, l'acétonitrile et le méthanol (tableaux 11 et 13). La création d'un gradient d'éluion au cours de la séparation, grâce aux variations de polarité de la phase mobile, permet de modifier la rétention des composés. Pour une phase mobile constituée d'un mélange d'eau et d'acétonitrile, l'augmentation de la concentration en acétonitrile au cours de l'éluion permet de diminuer la polarité de la phase et donc l'éluion des composés plus hydrophobes.

1.6.2.2. Détection après séparation en chromatographie liquide

Les détecteurs les plus souvent associés à l'HPLC pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques sont le détecteur ultraviolet-visible (UV) et le détecteur de fluorescence (FLD), le détecteur à barrette de diodes (DAD) et le spectromètre de masse (MS).

1.6.2.2.1. Détecteur de fluorescence (FLD)

Le détecteur de fluorescence (FLD) implique l'utilisation d'un rayonnement de longueur d'onde dans l'ultraviolet ou le visible, qui va exciter les groupements fonctionnels de certains composés. Ces derniers vont alors émettre un rayonnement de longueur d'onde plus élevée appelé fluorescence. Le principe du FLD est basé sur la détection de cette fluorescence. Environ 15% des composés possèdent une fluorescence naturelle. La présence d'électrons π conjugués, comme pour les composés aromatiques, engendre une importante activité de fluorescence. L'intensité de fluorescence semble, de plus, augmenter avec le nombre de cycle aromatique.

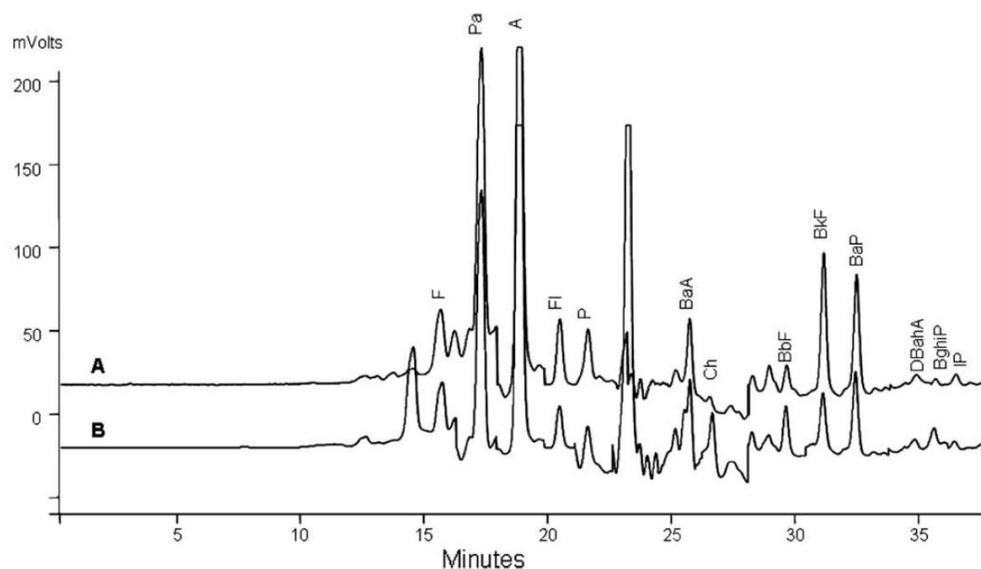
Applications aux hydrocarbures aromatiques

Le détecteur de fluorescence (FLD) utilise des longueurs d'ondes spécifiques pour détecter de manière sélective les analytes. Par exemple, le benzo(*j*)fluoranthène et le benzo(*b*)fluoranthène peuvent être spécifiquement détectés par un FLD alors qu'ils ne peuvent

pas être différenciés avec un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les longueurs d'ondes d'excitation utilisées pour les HAP, sont généralement comprises entre 250 et 290 nm et celles d'émission varient entre 330 et 500 nm (Galinaro, 2007 ; Purcaro 2009). En figure 22 extraite des travaux de Purcaro *et al.* (2009), visant à déterminer les HAP dans des échantillons de viandes fumées, sont présentés des chromatogrammes obtenus en HPLC-FLD pour différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission.

Le couplage de la chromatographie liquide avec le FLD est fréquemment utilisé pour la détection des HAP. La sensibilité de la détection par fluorescence est 10 à 1000 fois supérieure à celle en UV. La détection des HAP dans le sol en FLD est jusqu'à 40 fois plus sensible que la détection UV, avec des LOD variant entre 0,3 et 2 µg/kg en HPLC-FLD et de 2 à 40 µg/kg pour l'HPLC-UV (Criado, 2004). Néanmoins, les limites de détection avec ces deux détecteurs (FLD et UV) peuvent être de même ordre de grandeur pour des composés particuliers. Par exemple, la LOD obtenue pour le dibenzo(*ah*)anthracène en HPLC-FLD est de 0,17 µg/kg w.w. (Camargo, 2003) et la même valeur est retrouvée par Ashraf *et al.* (2012) en HPLC-UV. La sensibilité de la détection peut être améliorée par une concentration plus importante ou une meilleure purification des échantillons avant la séparation. De même, l'optimisation des débits conduit à une meilleure efficacité chromatographique.

Le couplage de la chromatographie liquide avec le FLD pour la détermination des HAP est notamment préconisé par la norme ISO 22959 : 2009. Cette norme recommande une analyse des HAP contenus dans les graisses et les huiles d'origine animale et végétale, par chromatographie complexe (donneur-accepteur d'électron) en ligne associée à une chromatographie liquide à hautes performances (HPLC) avec détection par fluorescence (FLD). Cependant, ces méthodes indiquées pour les graisses et les huiles (ISO 15753 : 2006 et ISO 22959 : 2009) ne permettent pas de quantifier les composés les plus volatils, tels que le naphthalène, l'acénaphthène et le fluorène, et ne peuvent pas être utilisées pour les huiles de palme et de grignons d'olive en raison d'interférences avec la matrice.



	Conditions A		Conditions B	
	λ excitation	λ émission	λ excitation	λ émission
Na, Ac, F	250	350	276	330
Pa	250	350	250	366
A	250	390	250	402
Fl	270	460	270	470
P	270	390	240	386
BaA, Ch	290	404	270	390
BbF	290	410	260	430
BkF, BaP	290	410	256	410
DBahA	290	390	290	410
BghiP	290	470	290	410
IP	290	470	290	484

λ : longueur d'onde en nm

Figure 22 : Chromatogrammes obtenus par Purcaro *et al.* (2009) en HPLC-FLD pour des échantillons de viandes fumées contenant des HAP (conditions d'excitation et d'émission présentées dans le tableau)

Na : naphthalène, Ac : acénaphène, F : fluorène, Pa : phénanthrène, A : anthracène, FL : fluoranthène, P : pyrène, BaA : benzo(a)anthracène, Ch : chrysène, BbF : benzo(b)fluoranthène, BkF : benzo(k)fluoranthène, BaP : benzo(a)pyrène, DBahA : dibenzo(ah)anthracène, BghiP : benzo(ghi)perylène, IP : indéno(1,2,3-cd)pyrène

1.6.2.2.2. Détecteur ultraviolet-visible (UV)

Le détecteur ultraviolet-visible (UV) est un détecteur spectrophotométrique basé sur l'absorption dans le domaine de longueurs d'onde appartenant à l'UV et au visible. Le principe de cette méthode réside sur la capacité des composés à absorber la lumière émise à une longueur d'onde fixe. La détection est basée sur la loi de Beer-Lambert. Le détecteur donne pour chaque composé une valeur d'absorbance qui est proportionnelle à la concentration. L'intensité de l'absorption est dépendante du coefficient d'absorption molaire de chaque composé. La détection UV concerne donc principalement les composés ayant un coefficient d'absorption molaire et une constante diélectrique élevés.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

Bien que la détection UV soit moins sensible que celle par FLD, elle reste nécessaire à la détection de certains HAP non fluorescents, comme le cyclopenta(*cd*)pyrène (CPcdP) (Plaza-Bolaños, 2010 ; Simon, 2008 ; Purcaro, 2013).

La détection UV couplée à la HPLC est, par exemple, utilisée pour la détection de 16 HAP en concentrations inférieures à 200 µg/kg d.w. dans des échantillons de fruits et de légumes (Bishnoi, 2006 ; Tuteja, 2011).

1.6.2.2.3. Détecteur à barrettes de diodes (DAD)

Le détecteur à barrettes de diodes (DAD) est également un détecteur d'absorption spectrophotométrique basé sur le même principe que le détecteur UV et permet d'accéder à l'ensemble du spectre UV-visible. La source polychromatique est généralement constituée d'une lampe au deutérium pour le proche UV (190-350 nm) et une lampe tungstène pour le visible (400-700nm). La détection s'effectue à plusieurs longueurs d'onde et permet de connaître l'absorbance moyenne sur un intervalle de longueurs d'onde.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

Le DAD est utilisé pour l'analyse qualitative et quantitative des HAP dans de nombreux échantillons tels que le sol, l'eau, les boues d'épuration ou encore les compléments alimentaires. Le DAD est, par exemple, utilisé en série avec un FLD pour permettre la détection des HAP dans des échantillons de sols (Hollender, 2003).

La détection des HAP avec le DAD reste moins sensible qu'avec la FLD ou la MS en particulier pour l'acénaphthylène, l'acénaphthène, l'anthracène, le pyrène, le benzo(*a*)anthracène, le benzo(*k*)fluoranthène, le benzo(*a*)pyrène, le benzo(*ghi*)perylène, l'indéno(1,2,3-*cd*)pyrène et le dibenzo(*ah*)anthracène (González-Piñuela, 2006).

1.6.2.2.4. Spectromètre de masse (MS)

Le premier spectromètre de masse (appelé spectrographe de parabole) a été élaboré par JJ Thomson au cours de la première décennie du 20^{ème} siècle. Cet instrument a permis de générer des ions qui traversent des champs électrique et magnétique (analyseur à secteur magnétique simple focalisation) avec une trajectoire plus ou moins courbée en fonction de leur rapport masse sur charge. La détection des ions est ensuite réalisée sur un écran fluorescent ou une plaque photographique.

La spectrométrie de masse est donc une technique permettant de détecter et d'identifier une molécule ou une association de molécules par mesure de masse. Le principe de la spectrométrie de masse réside dans la détection de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Le spectromètre de masse (MS) se divise en 3 parties : la source d'ion qui permet la production d'ions en phase gazeuse à partir d'échantillons solides, liquides ou gazeux ; l'analyseur de masse et le détecteur qui amplifie et enregistre le signal généré par les ions.

Cette technique peut être couplée avec les méthodes séparatives de chromatographie en phase liquide ou gazeuse et permet de réaliser des analyses qualitatives et quantitatives.

La LC-MS est largement utilisée pour l'analyse de composés polaires qui sont généralement non-volatils et thermolabils. Néanmoins, l'application de la LC-MS à l'analyse de composés apolaires tend à se développer. La LC-MS est notamment utile pour l'analyse de certains composés apolaires comme les HAP de masse moléculaire supérieure à 300 g/mol dont la détection est difficile en GC-MS en raison de leur faible volatilité (Hayen, 2003 ; Song, 2011).

Les principales sources d'ionisation utilisées en LC-MS sont des sources mettant en œuvre la désolvatation-nébulisation à pression atmosphérique (API). Ces sources sont l'électrospray (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI).

Lorsqu'elles sont sous forme ionisées, les molécules doivent encore être détectées. Les analyseurs de masse utilisés pour la détection des hydrocarbures aromatiques sous forme ionisée lors du couplage avec la HPLC sont l'analyseur de temps de vol (TOF), l'orbitrap, l'analyseur à secteur magnétique ou encore la résonance cyclotronique ionique par transformée de Fourier. La FT-ICR permet la détection des HAP à partir de matrices complexes grâce à sa capacité à différencier des ions multiples avec une même masse nominale (Rummel, 2010). Cette technologie coûteuse permet d'obtenir les meilleures résolutions en masse.

1.6.2.3. Séparation par chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est apparue en 1952 grâce aux travaux de Martin et Synge, en Angleterre, et de Berton, en France. Cette technique chromatographique consiste à séparer des composés volatils selon leur affinité avec une phase stationnaire. La phase mobile permettant d'entraîner les composés vers le détecteur est un gaz de faible viscosité, généralement de l'azote, de l'hydrogène ou de l'hélium.

1.6.2.3.1. Modes d'injection en chromatographie en phase gazeuse

En GC, le mode d'injection le plus répandu est l'injection split/splitless (avec ou sans division). Le mode split (division) permet que seule une faible fraction de l'échantillon injecté soit introduite dans la colonne. Le split correspond à un ratio entre la partie injectée dans la colonne et celle qui est évacuée de l'appareil. L'utilisation du diviseur de flux (split) permet l'injection de très faibles volumes afin d'éviter la saturation de la colonne.

Le mode splitless permet le passage de la totalité de l'échantillon injecté dans la colonne, il est donc souvent utilisé lors de l'analyse de traces.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques étant généralement présent en très faibles quantités dans les échantillons environnementaux et alimentaires, les injections en GC sont principalement réalisées en mode splitless (Doong, 2000 ; Gilbert-López, 2010 ; Góna-Binkul, 1996 ; Rozentale, 2017 ; Wu, 2016).

D'autres modes d'injection existent comme la vaporisation par température programmée (PTV), l'injection directe à froid dans la colonne (on-column), ou encore l'injection à large volume (LVI), qui reste rarement utilisée malgré l'amélioration de sensibilité qu'elle procure (Veyrand, 2007). Certains modes peuvent être combinés ; par exemple, l'utilisation de PTV et LVI permet d'augmenter la sensibilité, surtout pour les échantillons environnementaux et les aliments (Gómez-Ruiz, 2009a).

1.6.2.3.2. Colonnes et phases stationnaires en chromatographie en phase gazeuse

En GC, la séparation des analytes est quasi-exclusivement réalisée au moyen de colonnes capillaires.

Les colonnes capillaires sont généralement constituées de quartz fondu (silice très pure) et entourées d'une gaine de polymère souple. Elles mesurent entre 10 et 100 m de longueur et leur diamètre interne varie de 0,10 à 1 mm. La phase stationnaire, d'épaisseur comprise entre 0,05 et 5 μm est greffée sur les parois de la colonne.

Le type de greffage appliqué à la phase stationnaire est susceptible de modifier la polarité de la colonne. Les phases stationnaires peu polaires possèdent un squelette à base de polysiloxane. Les moins polaires d'entre elles sont constituées à 100 % de diméthylsiloxane ; elles sont retrouvées sous le nom de DB-1, OV101, SE-30 selon les fournisseurs. La séparation des analytes est globalement réalisée selon un ordre croissant des températures d'ébullition des analytes. L'apport de groupement phényle augmente sensiblement la polarité en modifiant les caractéristiques de rétention. Les plus courantes pour la séparation des hydrocarbures aromatiques sont de type 95 % méthyl – 5 % phényle polysiloxane (DB5, HP-5, ...). Le greffage au moyen de groupements cyanopropyle confère une polarité relativement importante à la phase stationnaire. Les phases de polarité importante sont généralement constituées de polyéthylène glycol (DB 20, Carbowax, ...), elles permettent des séparations d'analytes possédant de grandes différences de polarité mais sont aussi reconnues pour leur faible résistance aux températures élevées (250 °C).

Applications aux hydrocarbures aromatiques

La GC est particulièrement adaptée à la séparation des hydrocarbures aromatiques qui sont des composés volatils. La norme ISO11423-1:1997 propose notamment l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse du benzène, du toluène, des xylènes et de l'éthylbenzène dans des échantillons d'eau.

La GC offre une meilleure résolution, une plus grande sélectivité et sensibilité comparée à la HPLC, vis à vis des composés organiques volatils et semi-volatils présents sous forme de traces dans les échantillons environnementaux, biologiques et alimentaires (Gómez-Ruiz, 2009b). Cette technique permet notamment l'analyse de HAP non fluorescents comme le cyclopenta(*cd*)pyrène (CPcdP), ou d'autres ayant une faible fluorescence tels que le naphthalène (NPH), l'acénaphthylène (ACY), l'acénaphthène (ACP) et le fluorène (FLR) (Plaza-Bolaños, 2010 ; Purcaro, 2013). Néanmoins, l'HPLC reste plus adaptée à l'analyse des HAP les plus lourds, présentant une faible volatilité.

Choix de la phase stationnaire

Pour la séparation de contaminants organiques comme les HAP et d'autres résidus à l'état de traces, les colonnes les plus fréquemment utilisées contiennent une phase stationnaire avec 5% phényl-95% méthylpolysiloxane (type DB-5, HP-5, ...) (Plaza-Bolaños, 2010). La faible polarité de cette phase stationnaire permet une séparation appropriée des HAP qui possèdent une large gamme de température de vaporisation. De plus, les colonnes dont les phases stationnaires sont composées de polysiloxane engendrent un bruit de fond faible même lors de l'utilisation de températures élevées (> 300 °C) ou de détecteurs peu sélectifs tels que le détecteur à ionisation de flamme (FID). Néanmoins, des temps d'analyses longs sont souvent nécessaires pour obtenir une séparation des HAP ayant des masses moléculaires élevées. L'interaction forte de ces composés très hydrophobes, tels que le dibenzopyrène, avec la phase stationnaire apolaire provoque l'élargissement des pics et donc des problèmes de sensibilité.

Selon le choix de la colonne, par exemple avec une colonne 5% phényl-95% méthylpolysiloxane (type DB-5, HP-5, ...), la séparation de certains HAP isomères de HAP lourds peut s'avérer difficile, car les pics se chevauchent et ne peuvent pas être résolus par spectrométrie de masse (Gómez-Ruiz, 2009b ; Purcaro, 2013).

Cinq groupes de HAP présentent ces problèmes de résolutions, ce sont (Plaza-Bolaños, 2010 ; Purcaro, 2013) :

- le dibenzo(*ah*)anthracène (DBahA) et l'indéno(1,2,3-*cd*)pyrène (IP)
- le benzo(*b*)fluoranthène (BbFA), le benzo(*j*)fluoranthène (BjFA) et le benzo(*k*)fluoranthène (BkFA)
- le cyclopenta(*cd*)pyrène (CPcdP), le benzo(*a*)anthracène (BaA) et le chrysène (CHR)
- le chrysène (CHR) et le triphénylène
- le dibenzo(*ac*)anthracène et le dibenzo(*ah*)anthracène (DBahA)

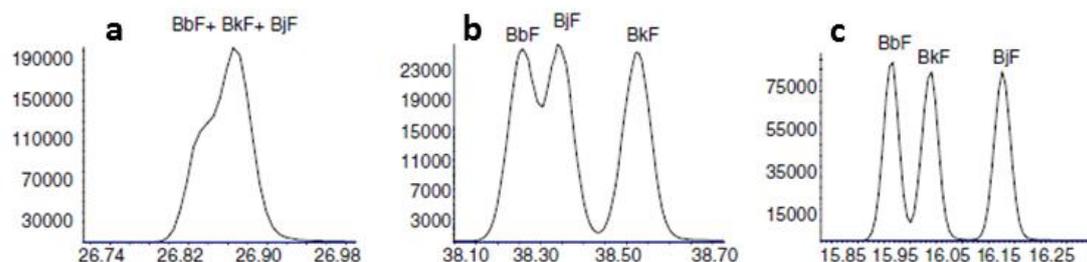


Figure 23 : Chromatogramme obtenus par chromatographie en phase gazeuse présentant la séparation du benzo(*b*)fluoranthène (BbF), du benzo(*j*)fluoranthène (BjF) et du benzo(*k*)fluoranthène (BkF) avec trois phases stationnaires différentes : (a) Colonne Optima® δ -6 (longueur 30 m, 0,25 mm i.d., épaisseur de film 0,25 μ m), (b) colonne DB-5MS (60 m, 0,25 mm i.d., 0,25 μ m), (c) colonne DB-17MS (60 m, 0,25 mm i.d., 0,25 μ m) (Gómez-Ruiz, 2009b)

L'utilisation d'une colonne 50% phenyl-50% methylpolysiloxane (de type DB-17, HP-17, ...) plus polaire que la phase stationnaire 5% phényl-95% méthylpolysiloxane permet de résoudre quelques problèmes de co-élution pour les trois premiers groupes précédemment cités (figure 23). Le chrysène et le triphénylène peuvent être séparés aussi grâce à une phase stationnaire de type DB-XLB, non polaire, mais ce type de colonne n'est pas adapté à la quantification de l'ensemble des HAP. Les problèmes de co-élution peuvent également être résolus par chromatographie gazeuse bidimensionnelle (GCxGC) par l'utilisation de deux colonnes de polarités différentes. L'association d'une phase stationnaire de type DB-5 et d'une autre de polarité moyenne (type DB-17, HP-17, ...) a été utilisée pour l'analyse des HAP dans les sédiments et a permis de séparer certains composés co-élus sur la première phase stationnaire, excepté pour ceux du quatrième groupe (Pena-Abaurrea, 2012).

1.6.2.4. Détection après séparation par chromatographie en phase gazeuse

Suite à la séparation en GC, les hydrocarbures aromatiques vont pouvoir être détectés. Les deux principaux détecteurs couplés à la GC sont, dans ce cas, le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le spectromètre de masse.

1.6.2.4.1. Détecteur à ionisation de flamme (FID)

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) utilise une flamme hydrogène-air pour brûler les effluents à la sortie de la colonne. Les ions produits par la combustion des composés organiques sont ensuite collectés par une électrode. Les gaz et les composés inorganiques, tels que H₂O ou NH₃ ne sont pas détectés par FID.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

Le FID peut être utilisé pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques, il est notamment appliqué à la détection de HAP dans des échantillons environnementaux et alimentaires. Le FID permet d'obtenir des limites de détection (LOD) comprises entre 0,04 et 2,32 μ g/kg pour des radis et entre 0,06 et 0,50 μ g/L pour des échantillons aqueux (Coelho, 2008 ; Lei, 2011). La GC-FID est également utilisée pour la détermination des BTEX à partir d'échantillons de sols avec des LOD inférieures à 1 ng (Ezquerro, 2004).

1.6.2.4.2. Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse a été couplée pour la première fois à la chromatographie en phase gazeuse en 1950 grâce aux travaux de Roland Gohlke et Fred McLafferty. Différents modes d'ionisation et détecteurs, présentés ci-après, peuvent être utilisés lors du couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec le spectromètre de masse.

La détection en masse donne des résultats plus sélectifs et généralement plus sensibles qu'avec une détection par ionisation de flamme (FID). Dans les échantillons d'eau, la sensibilité de la détection du chrysène est multipliée par 8 en GC-MS (0,03 ng/mL) par rapport à celle observée en GC-FID (0,24 ng/mL) (Doong *et al.* 2000). Néanmoins, l'extraction HS-SPME des HAP jusqu'à 202 g/mol permet d'obtenir en GC-FID de faibles LOD (0,11 µg/kg w.w.) qui ne sont pas significativement différentes de celles rencontrées pour des études utilisant la GC-MS (Lei, 2011). Des résultats similaires sont observés pour les HAP légers dans des échantillons d'eau. Les LOD obtenues pour le naphthalène, l'acénaphthylène, l'acénaphthène et le fluorène avec le FID (0,08-0,21 ng/mL) ne sont pas significativement différentes de celles trouvées avec la MS (0,07-0,27 ng/mL) ce qui est probablement dû à l'extraction sélective réalisée en amont par HS-SPME (Doong *et al.* 2000). Néanmoins, la sensibilité de la détection en masse peut être améliorée par l'utilisation du mode de sélection d'ion (SIM : single ion monitoring) de l'analyseur de masse. En mode SIM la détection est limitée à des ratios masse/charge préalablement sélectionnés et non à une détection de l'ensemble des spectres de masse, ce qui permet d'améliorer la sensibilité de la détection. Les études menées en GC-MS sur les hydrocarbures aromatiques met en œuvre, pour la plupart, le mode SIM (Camargo, 2003 ; Górná-Binkul, 1996 ; Norlock, 2002).

1.6.2.4.2.1. Modes d'ionisation lors du couplage avec la chromatographie en phase gazeuse

Les principales sources d'ionisation utilisées en GC-MS sont des sources mettant en œuvre l'ionisation électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI).

1.6.2.4.2.1.1. Ionisation électronique (EI)

L'ionisation électronique (EI) a été inventée par Dempster en 1918 et a été la première source d'ions utilisée en spectrométrie de masse. L'ionisation des molécules s'effectue dans une chambre maintenue sous vide d'air. Un filament (rhénium ou tungstène) émet des électrons qui sont ensuite mis en mouvement vers une anode par l'application d'une différence de potentiel (5 à 100 V). Cette différence de potentiel est fixée pour la plupart des sources d'ionisation électronique à 70 V (énergie des électrons à 70 eV) afin de produire des fragmentations en masse reproductibles.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

L'ionisation par impact électronique (EI) est la méthode la plus répandue pour les hydrocarbures aromatiques. L'EI est notamment appliquée à l'ionisation des HAP et des BTEX dans des matrices environnementales et alimentaires (Gilbert-López, 2010 ; Norlock, 2002 ; Rodil, 2007).

1.6.2.4.2.1.2. Ionisation chimique (CI)

L'ionisation chimique (CI) a été observée pour la première fois par Thomson en 1913 mais la source d'ions par ionisation chimique n'a été développée qu'à partir de 1966 par Field. L'ionisation chimique utilise un impact électronique pour ioniser un gaz réactif tel que le méthane, le butane, l'ammoniac ou un liquide réactif tel que le méthanol, l'acétonitrile ou le dichlorométhane. Les molécules ainsi ionisées vont ensuite pouvoir échanger des charges avec les analytes présents dans la source. L'ionisation chimique est une méthode d'ionisation douce qui génère principalement des cations pseudo-moléculaire.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

L'ionisation chimique peut s'appliquer aux hydrocarbures aromatiques avec des ions positifs ou négatifs. Le mode positif de l'ionisation chimique est utilisé pour les HAP dans des échantillons de poisson fumé avec l'ammoniac comme gaz réactif. Cependant, cette méthode ne permet pas de discerner le benzo(*b*)fluoranthène du benzo(*k*)fluoranthène (Yurchenko, 2005). Le mode négatif de l'ionisation chimique utilisant le méthane comme gaz réactif est appliqué aux HAP dans des extraits de cendres. La différenciation d'isomères tels que le benzo(*a*)pyrène et le benzo(*e*)pyrène ou le fluoranthène et le pyrène est impossible au moyen de cette méthode (Low, 1986).

1.6.2.4.2.2. Analyseurs de masse mis en œuvre lors du couplage avec la chromatographie en phase gazeuse

Les analyseurs de masse les plus utilisés lors du couplage avec la GC sont le quadripôle (Q), le triple quadripôle (QqQ) et la trappe ionique (IT).

1.6.2.4.2.2.1. Quadripôle

Le principe du quadripôle a été présenté pour la première fois par Paul et Steinwedel dans les années 1950. L'analyseur quadripolaire est constitué de quatre électrodes soumises à un potentiel afin de créer une différence de potentiel entre les 2 paires d'électrodes. Seuls les ions ayant une trajectoire stable dans le champ électrostatique quadripolaire peuvent progresser jusqu'à l'analyseur et être détectés. Le principe du quadripôle est également utilisé dans le cas des analyseurs de masse de type triple quadripôle et trappe ionique.

Applications aux hydrocarbures aromatiques

Le quadripôle (Q) est un analyseur très utilisé pour l'analyse des HAP et BTEX dans diverses matrices alimentaires et environnementales (Benet, 2015 ; Burkhardt, 2005 ; Camargo, 2003 ; Górna-Binkul, 1996).

1.6.2.4.2.2.2. Triple quadripôle et trappe ionique

Les analyseurs de type triple quadripôle (QqQ) et trappe ionique (IT) utilisent le même principe que le quadripôle (Q). De plus, une étude bibliographique indique qu'aucune différence significative entre les performances des analyseurs Q, QqQ et IT n'a pu être montrée pour les HAP, avec des limites de détections généralement inférieures au ppb (Plaza-Bolaños, 2010).

1.6.3. Bilan sur les méthodes d'extraction et d'analyse des hydrocarbures aromatiques pour les fruits et les légumes

En raison des différences de volatilité et de solubilité entre hydrocarbures aromatiques, des procédures différenciées d'extraction sont généralement mises en œuvre pour pouvoir déterminer d'un côté les hydrocarbures aromatiques les plus légers et d'un autre côté les hydrocarbures aromatiques les moins volatils.

Pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques polycycliques (semi-volatils), la méthode la plus répandue pour les fruits et les légumes est le soxhlet. Néanmoins, les techniques d'extraction par solvant assistées par les ultrasons (UAE), la pression (PLE) ou les micro-ondes (MAE) sont également très utilisées. Une étape de purification par extraction sur phase solide (SPE) ou par chromatographie d'exclusion est souvent appliquée suite à ces techniques d'extraction par solvant afin d'en améliorer la sélectivité. Les volumes de solvant des extraits sont ensuite généralement réduits par évaporation grâce à un flux d'azote ou par l'utilisation d'un évaporateur rotatif, afin de gagner en sensibilité. Cette étape, permettant de concentrer l'extrait en composés d'intérêt, est fréquemment appliquée dans le cas des fruits et des légumes en raison de la faible présence en hydrocarbures aromatiques dans ces matrices. Les procédures d'extraction par solvants sont donc susceptibles de comprendre de nombreuses étapes et les conditions mises en jeu lors de l'évaporation des solvants sont peu favorables aux composés tels que les BTEX dont la volatilité est supérieure à celles des composés polycycliques.

L'extraction des hydrocarbures aromatiques monocycliques met généralement en œuvre un support d'extraction miniaturisé pour lequel les procédures d'extraction sont directes voire automatisables et ne nécessitent pas ou très peu de solvant et de préparation d'échantillon. La plupart de ces procédures appliquées à l'extraction des hydrocarbures aromatiques monocycliques utilisent l'espace de tête (HS) de l'échantillon. La micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME) semble être la méthode la plus fréquemment appliquée pour la récupération des hydrocarbures aromatiques monocycliques même si très peu d'exemples d'extraction de ces composés à partir de fruits et de légumes sont disponibles dans la littérature.

L'analyse de faibles quantités d'hydrocarbures aromatiques requiert, en aval de la procédure d'extraction, des systèmes de séparation et de détection sensibles et résolutifs. Les techniques séparatives les plus fréquemment utilisées pour une séparation efficace des hydrocarbures aromatiques sont les chromatographies en phase liquide (HPLC) et gazeuse (GC). Le couplage de la chromatographie liquide à hautes performances avec le détecteur de fluorescence (HPLC-FLD) ou le détecteur ultraviolet visible (HPLC-UV) et celui de la chromatographie en phase gazeuse avec le spectromètre de masse (GC-MS) sont principalement appliqués pour la détermination des hydrocarbures aromatiques extraits à partir d'échantillons de fruits et de légumes.

Chapitre 2 : Contexte et Objectifs de l'étude

Chapitre 2 : Contexte et Objectifs de l'étude

Les hydrocarbures aromatiques sont des composés ubiquitaires pouvant pénétrer dans l'organisme par l'ensemble des voies d'exposition : cutanée, respiratoire et alimentaire. Les effets néfastes de ces composés sur la santé humaine *via* leur inhalation sont bien reconnus. Néanmoins, chez l'Homme, il existe peu d'information sur leur impact par voie alimentaire. Pourtant, pour les non-fumeurs, la principale source d'exposition aux hydrocarbures aromatiques est l'alimentation (figure 24).

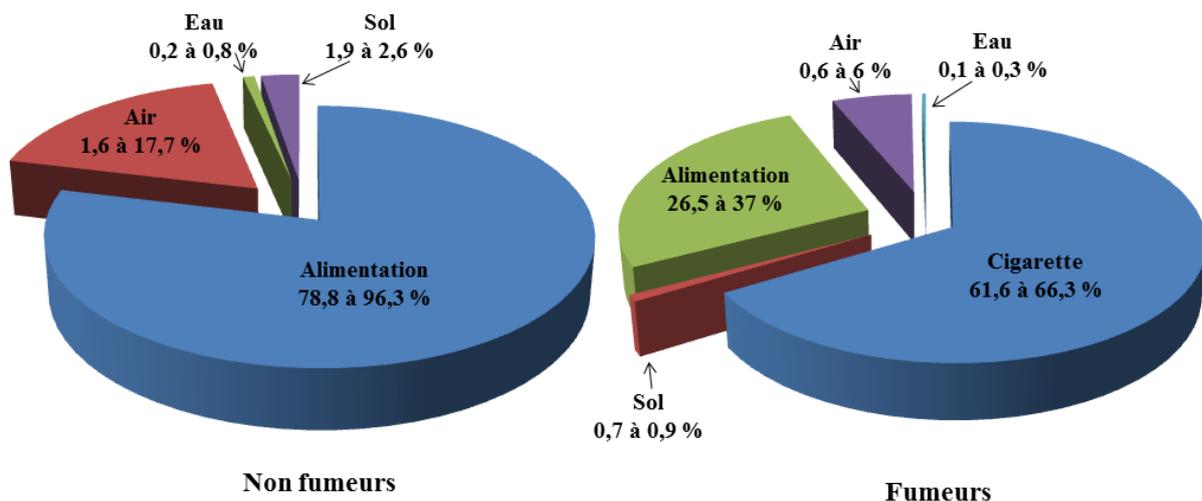


Figure 24 : Diagrammes représentant les principales sources de contamination aux HAP (benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, indéno(1,2,3-cd)pyrène, dibenzo(ah)anthracène, benzo(ghi)perylène) chez l'Homme (Menzie, 1992)

Pour ce travail de thèse, la pomme a été sélectionnée comme aliment d'étude. La première partie de ce chapitre 2 a pour but d'expliquer ce choix à travers la présentation de cette matrice. L'environnement des vergers normands est ensuite décrit. Enfin, la troisième partie de définir les objectifs de l'étude.

2.1. La pomme : Présentation et intérêts agricole et économique

La pomme est l'un des fruits les plus consommés dans le monde, après les agrumes et la banane (Jánská, 2006 ; Planestoscope 2012). La récolte mondiale de pommes s'élève à environ 64 millions de tonnes chaque année, dont 1,7 millions en France où plus de 400 variétés sont représentées (Planestoscope 2012). La consommation d'un foyer français est estimée à 18 kg par an soit 20,3% de part de marché en volume, contre 14,6 % pour les bananes et 12,4 % pour les oranges (lapomme.org). Malgré la diminution de la surface des vergers de pommiers (figure 25), qui est passée de 61 000 hectares en 1992 à moins de 44 000 en 2012, avec environ 8000 exploitations de pomiculture, la France reste le troisième producteur européen de pommes, derrière la Pologne et l'Italie (lapomme.org).

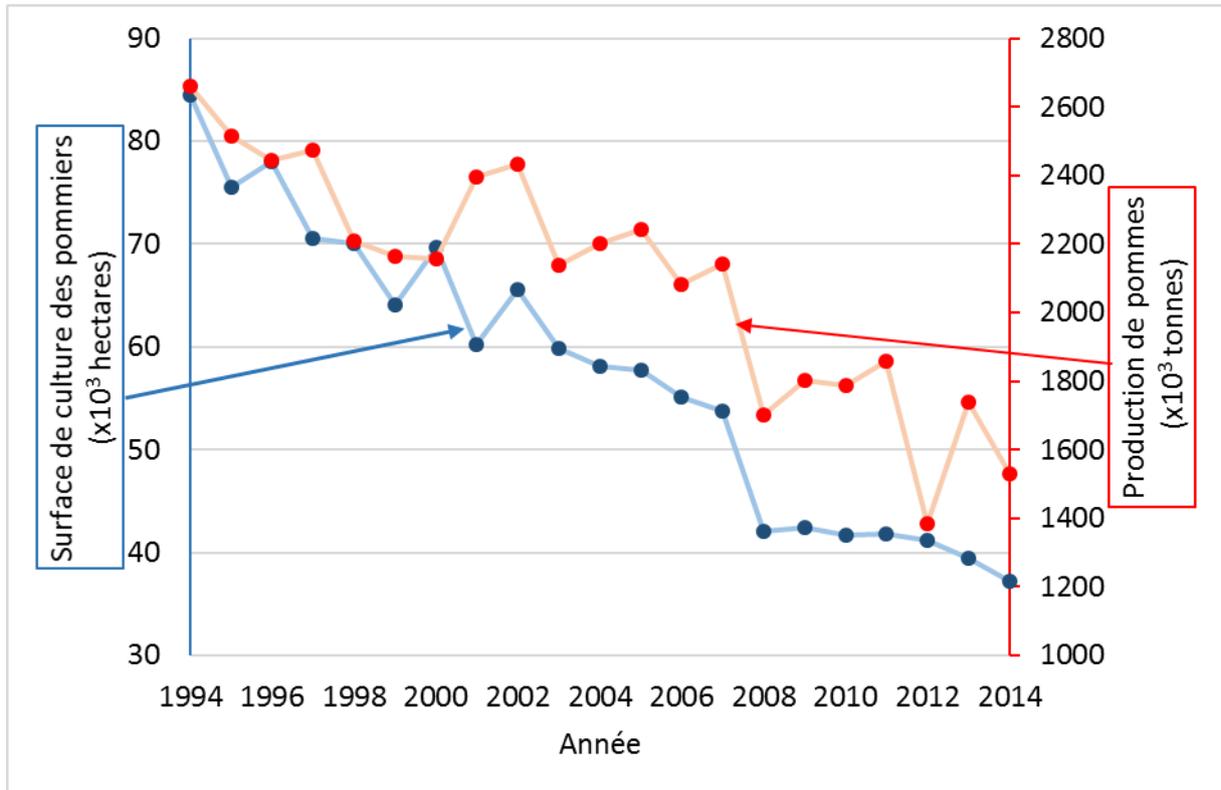


Figure 25 : Evolution de la surface dédiée aux vergers de pommiers et de la quantité de pommes produites en France entre 1994 et 2014 (source Food and Agriculture Organization of the United Nations)

Les pommes notamment destinées à une consommation directe sont appelées pommes à couteau, pomme de table ou pommes de bouche. Les principales régions productrices de ce type de pommes sont présentées en figure 26 sur laquelle est également indiqué le tonnage récolté par région. La région Provence-Alpes-Côte d’Azur (PACA) est la première région productrice de pomme de table en France avec 390,2 milliers de tonnes en 2014.

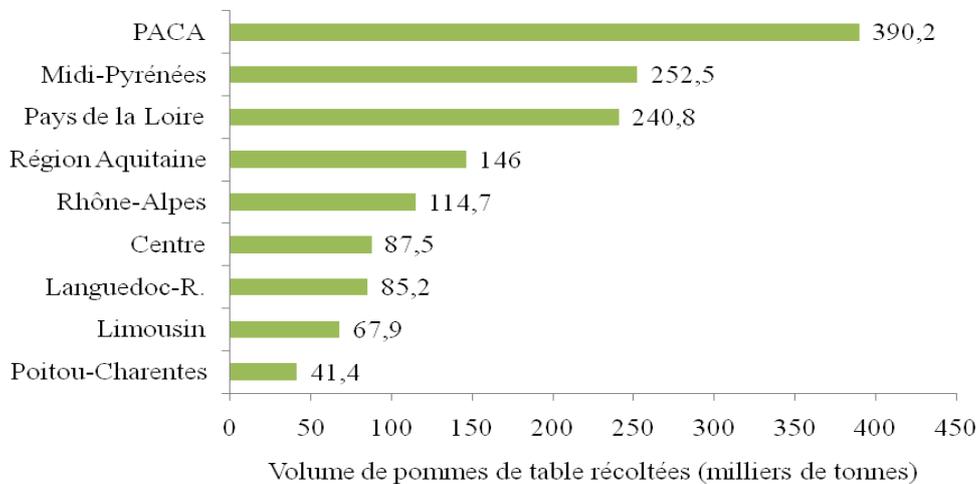


Figure 26 : Quantité de pommes de table (en milliers de tonnes) récoltée par les principales régions productrices française en 2014 (Source Agreste, France AgriMer)

Grâce aux différents types de climats, de nombreuses variétés de pommes de table sont cultivées en France. La variété la plus répandue en France est la pomme Golden avec 474 milliers de tonnes de fruits récoltés en 2015 (tableau 14, lapomme.org, congrès Prognosfruit 2016).

Tableau 14 : Quantité de pommes de bouche récoltées par variétés en France en 2015

Variétés	Récolte 2015 (nombre de fruits en tonnes)
Ariane	21 000
Belchard	54 000
Boskoop	16 000
Braeburn	87 000
Caméo	1 000
Canada	48 000
Chouquette	4 000
Elstar	27 000
Fuji	69 000
Gala	322 000
Golden	474 000
Goldrush Delisdor	7 000
Granny	162 000
Honey Crunch	16 000
Idared	6 000
Jazz	19 000
Jonagold	44 000
Joya	6 000
Pink Lady	144 000
Reine des Reinettes	18 000
Rouges	55 000
RubINETTE	5 000
Tentation	6 000
Autres	63 000
TOTAL	1 674 000

Source : lapomme.org (congrès Prognosfruit 2016)

La France est le premier pays producteur au monde de pommes destinées à la production de cidre (Planestoscope 2012). La production de pommes à cidre en France équivaut chaque année à un tonnage de l'ordre de 700 à 800 000 tonnes de fruits (environ 1/3 de la production française de pommes) La majorité des pommes à cidre françaises provient de l'ex-Basse-Normandie qui en produit entre 300 et 350 000 tonnes chaque année. En 2014, l'ex-Basse-Normandie était la première région productrice de pomme à cidre (39 %) devant la Bretagne (19 %) et les Pays de Loire (17 %) (source la pomme à cidre).

2.1.1. La pomme : Un produit agricole local

Le territoire normand est largement valorisé par l'agriculture. Les productions maraîchères y sont particulièrement développées puisque la Manche était en 2006 le deuxième département français producteur de poireaux et la troisième en ce qui concerne les carottes (Agreste 2006). L'ex-Basse-Normandie est également la première région, en France, pour la production de pommes cidricoles. Les vergers bas-normands représentaient, en 2010, environ 40 % de la surface dédiée aux pommiers à cidre à basse tige, en France (Agreste, 2014). En Normandie, les vergers de pommiers sont implantés sur 7 400 hectares et la majorité est dédiée aux produits cidricoles (recensement agricole 2010). Le Calvados et l'Orne comptent pour plus de la moitié des vergers cidricoles normands (Agreste, 2014).

Deux types de pommiers à cidre sont représentés dans les vergers : les pommiers à haute tige et les pommiers à basse tige. Les plantations de pommiers à basse-tige tendent à se développer. En 2010, dans l'ex-Basse-Normandie, les vergers basse tige étaient implantés sur 5240 hectares répartis en 1287 exploitations (Agreste, 2014). Les pommiers basse tige donnent 30 à 80 kg de pommes à cidre chacun ; 122 000 tonnes de fruits à cidre provenant de vergers basse-tige ont été produits en 2015 en Normandie, ce qui représente environ 50% de leur production en France (Chambre d'agriculture Normandie, 2017).

Les variétés de pommes à cidre implantées en Normandie sont nombreuses. Un arrêté datant du 16 Juin 1958 fixe les variétés de pommes recommandées pour les productions cidricoles en Normandie, en Bretagne et en Maine. Les variétés recommandées dans le Calvados, la Manche et l'Orne sont reprises dans le tableau 15. Certaines de ces variétés sont recommandées pour l'obtention de l'appellation d'origine « Cidre Cotentin », dont le cahier des charges (arrêté du 14 octobre 2016) établit que les variétés principales du verger (au minimum 60 % de la surface) soient les variétés Belle fille de la Manche, Binet Rouge, Bois Jingant, Cartigny, Closette, Feuillard, Gros amer, Marin Onfroy, Peau de Chien, Petit amer, Rouge de Cantepie, Sans Pareille, Tapin, Tête de Brebis et Taureau (arrêté du 14 octobre 2016 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Cidre Cotentin » / « Cotentin », Bulletin officiel du Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt n° 44-2016).

Plusieurs variétés sont cultivées en fonction du type de cidre souhaité. Par exemple, un cidre acidulé nécessite 0 à 10 % de pommes amères, 30 % de pommes douce-amères, 30 à 40 % de pommes douces et 30 % de pommes acidulées (CIDREF).

Tableau 15 : Variétés de pommiers à cidre recommandées dans le Calvados, la Manche et l'Orne par l'arrêté du 16 juin 1958 du Ministère de l'Agriculture

Variétés	Saveur	Calvados	Manche	Orne
<i>Première saison de maturité</i>				
Belle fille de la Manche	Douce		×	
Blanc Mollet	Douce-amère		×	
<i>Deuxième saison de maturité</i>				
Binet rouge	Douce	×		×
Bramtôt	Douce-amère	×		

Cartigny	Douce	×	×	
Clozette	Douce		×	
Crollon	Douce-amère		×	
Domaines	Douce-amère			×
Doux au gober	Douce		×	
Doux Lozon	Douce		×	
Doux Verêt de Carrouges	Douce	×		×
Gros Bois	Douce-amère		×	
Meriennet	Amère	×		
Tesnières	Acidulée		×	
<i>Troisième saison de maturité</i>				
Argile rouge	Douce-amère		×	
Bedan	Douce	×	×	×
Binet blanc	Douce			×
Binet rouge	Douce	×		
Binet violet	Douce			×
Bisquet	Douce	×		×
Cimetière de Blangy	Douce-amère	×		
Damelot petit	Douce-amère			×
Doux Normandie	Douce			×
Egyptia	Douce-amère	×		
Feuillard	Douce	×		
Frequin rouge petit	Douce		×	
Gagnevin	Douce	×	×	
Germaine	Douce	×		
Groin d'âne	Douce	×		×
Gros bois	Douce-amère	×		
Jaune de Vitré	Aigre	×	×	
Jeannetonne	Douce			×
Moulin à vent du Calvados	Douce-amère	×		×
Noël des champs	Douce	×		×
Petite sorte du parc dufour	Douce	×		×
René-Martin	Aigre	×		
Rouge Duret	Douce	×		
Rouge de Trèves	Aigre	×	×	
Rousse de la Sarthe	Douce			×
Saint-Martin	Douce-amère	×		
Saint-Philbert ou Joly	Douce-amère	×		
Solage à Gouet	Douce-amère			×
Tardive de la Sarthe	Douce-amère			×
Tête de brebis	Douce		×	

Première saison de maturité : brassage mi-novembre, deuxième saison de maturité : brassage au 1^{er} décembre, troisième saison de maturité : brassage mi-décembre

Arrêté du 16 juin 1958. Variétés recommandées de pommiers à cidre, pour les départements de Normandie, de Bretagne, et du Maine et Perche / par Ministère de l'agriculture. Comité des fruits à cidre et des productions cidricoles.

L'ex-Basse-Normandie dénombrait, en 2011, 56 entreprises dédiées à la fabrication de cidre, ce qui représente environ 280 emplois. De plus, en 2010, 159 exploitants de vergers ont réalisé des ventes directes de leurs produits cidricoles à la ferme (Agreste, 2014). En France, 537 milliers d'hectolitres de cidre ont été vendus en grandes surfaces en 2012 (France AgriMer, 2013).

Les pommes à cidre sont destinées à la production de cidre mais également de Pommeau et de Calvados. En 2015, 16 230 hl de Calvados ont été commercialisées, dont un peu plus de la moitié à l'étranger (Chambre d'agriculture Normandie, 2017).

La pomme, largement consommée mondialement, est produite localement et elle est ainsi facilement accessible. De plus, l'importance de la pomme, à la base de la production cidricole normande, fait de ce fruit un produit agricole de fort intérêt économique régional.

La disponibilité, l'importante consommation et l'intérêt économique régional sont des aspects qui ont influencé le choix de la pomme comme aliment d'étude. D'autres caractéristiques propres à la pomme ont également contribué à sa sélection et vont être détaillées à travers la présentation de cette matrice.

2.1.2. Composition de la matrice pomme

La pomme, dont le schéma général est présenté en figure 27, est un fruit aérien provenant des arbres angiospermes du genre *Malus*.

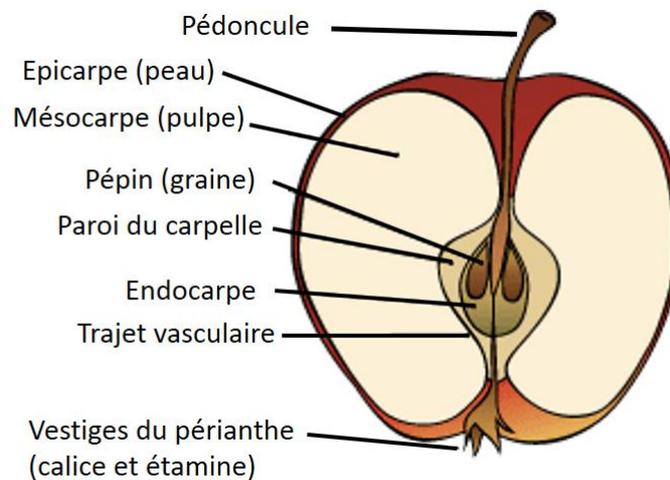


Figure 27 : Schéma général d'une pomme (source Formation en Biologie Végétale)

La pomme est principalement composée d'eau, entre 80 et 90 %, comme l'indique le tableau 16 qui liste les constituants majoritairement retrouvés pour 100 g de pomme.

Tableau 16 : Principaux constituants de la pomme (données pour 100 g de fruit)

Constituants	Quantités indicatives*
eau	80,4-90 g
Protéines	0,17-0,57 g
Lipides	0,05-0,7 g
Acides gras saturés	0,02-0,13 g
Sucre	8,77-12,9 g
Acides organiques	0,46 g
Polyphénols	
Flavonoïdes	37,34 mg
Acides phénoliques	19,01 mg
Polyphénols totaux	56,35 mg
Minéraux et oligo-éléments	
Calcium	2,6-10,7 mg
Cuivre	0,005-0,16 mg
Fer	0,06-0,85 mg
Iode	0,006-2 µg
Magnésium	2,8-9,2 mg
Manganèse	0,02-0,1 mg
Phosphore	7-25,1 mg
Potassium	58-343 mg
Sélénium	0,25-6 µg
Sodium	1-20 mg
Zinc	0,01-0,82 mg

* ordres de grandeur susceptibles de varier selon la variété, la saison, le degré de maturité et les conditions de culture (source Aprifel : Agence pour la Recherche et l'Information en Fruits et Légumes)

Comme pour tous les organes aériens des plantes, la surface externe de l'épiderme des pommes (épicarpe) est recouverte d'un film étanche d'épaisseur variable, appelé cuticule (Nultsch, 1998 ; Ju, 2001 ; Veraverbeke, 2001). La cuticule (figure 28) est principalement constituée d'un dépôt successif de cires (cires cuticulaires) et d'un polymère de lipides à 16 ou 18 carbones (polyester) appelé cutine.

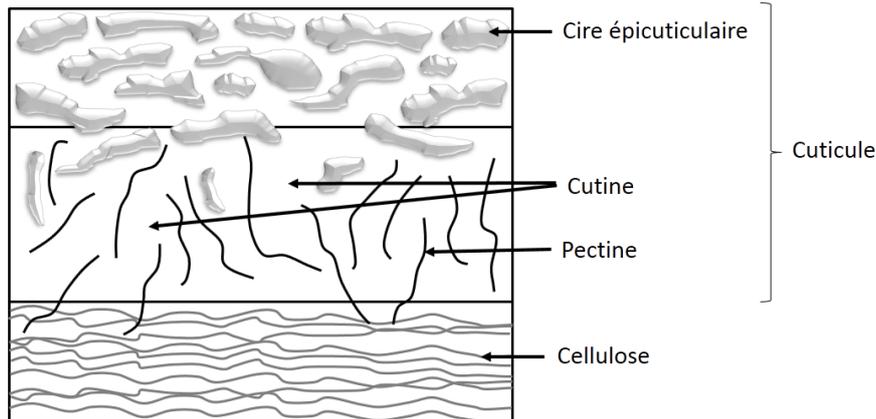


Figure 28 : Structure de la cuticule (Murtic, 2012)

La cuticule des pommes est composée de 44,7 % de lipides extractibles, de 34,6 % de cutine, de 13,2 % de sucres et de 7,5 % de cutane (Chen, 2008). Les cires cuticulaires sont, quant à elles, principalement composées d'hydrocarbures, d'esters, d'acides gras, d'alcools, d'estolides polaires et de diols (Ju, 2001).

Les cires cuticulaires des pommes ont une composition chimique et une épaisseur qui varient selon la variété. Une épaisseur de cire de 2,6 μm a été trouvée pour les pommes de variété Jonagold, contre 4,1 μm pour les pommes Elstar (Veraverbeke, 2001). La masse de cire de la pomme de variété Oregon spur est de 1038 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ contre 366 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour la pomme Liberty (Belding, 1998). La composition des cires épicuticulaires peut permettre de différencier certaines variétés de pommes (Bringe, 2006 ; Belding, 1998). C'est notamment le cas de la variété Golden delicious, à laquelle appartient la pomme Royal Gala, qui se distingue des autres par le faible pourcentage d'alcools secondaires (entre 1,1 et 3,3%) présents dans la cire épicuticulaire. Le principal alcool secondaire permettant de distinguer les Golden delicious des autres variétés de pommes est le nonacosan-10-ol. Dans de nombreuses autres variétés comme les pommes Delicious ou Rome les alcools secondaires représentent environ 20% de la masse de cire totale (Belding, 1998 ; Veraverbeke, 2001).

La composition et la quantité de cire dépendent de la variété de pomme, mais également de son stade de développement et de ses conditions de stockage après la récolte (Ju, 2001). Entre 60 et 30 jours avant la récolte, la masse de cire épicuticulaire des variétés Golden delicious et Red delicious augmente puis elle diminue pendant les 30 derniers jours de développement (Belding, 1998). Entre 60 jours avant la récolte et la maturité des fruits, les composés les plus présents dans la cire épicuticulaire sont les triterpènes, principalement l'acide ursolique (figure 29, plus de 36,6 %), et les alcanes (plus de 19,6 %) majoritairement représentés par le nonacosane (Belding, 1998).

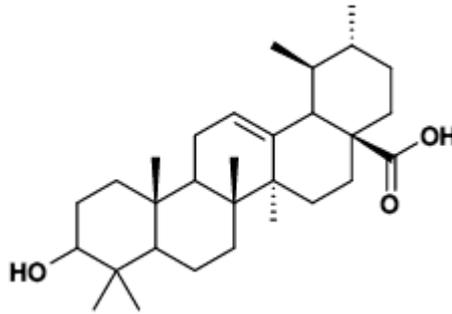


Figure 29 : Structure chimique de l'acide ursolique

Le suivi des alcools primaires montre une augmentation de leur pourcentage au cours du développement pour l'ensemble des pommes Golden delicious et Red delicious (Belding, 1998). Pendant leur développement, les pommes Delicious accumulent plus de cutine que de cire puis, à maturité leurs quantités deviennent équivalentes puisque la cuticule des fruits se compose de 36 % de cire et 34 % de cutine (Ju, 2001). Après 6 semaines de stockage à 20 °C, la cutine des pommes Delicious reste constante mais la cire cuticulaire augmente de 52 % (Ju, 2001). Pour la pomme Elstar, les changements subis par les cires pendant le stockage (1 °C, 8 mois) induisent une perte d'eau importante par rapport aux variétés Jonagold et Jonagored (Veraverbeke, 2001 ; Belding, 1998).

Les cires des pommes se trouvent modifiées par des stress environnementaux tels que la pluie, les UV-B, le vent ou les variations de température (Veraverbeke, 2001). De même, la cuticule se trouve altérée par le moindre contact physique provoquant une modification de ses capacités de rétention d'eau et de composés chimiques au niveau de la zone endommagée des fruits (Belding, 1998).

Plus de 300 composés organiques volatils composent le profil aromatique de la pomme. Ces composés volatils endogènes sont majoritairement des alcools, des esters, des aldéhydes, des cétones et des terpènes (Nieuwebhuizen, 2013 ; Ting, 2012). Certains composés volatils lipophiles peuvent être capturés par la cuticule. C'est notamment le cas pour les métabolites de l' α -farnésène (figure 30) qui est un hydrocarbure (sesquiterpène) endogène dont les produits d'oxydation sont suspectés de l'apparition de tâches sur la peau des pommes (Ju, 2001).

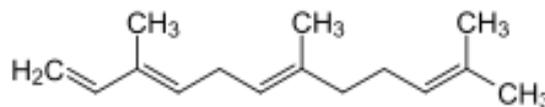


Figure 30 : Structure chimique de l' α -farnésène

La cuticule est une membrane polymérique lipophile qui constitue une barrière de protection mais aussi une interface d'échange entre le fruit et l'environnement. La cuticule est susceptible d'adsorber des composés organiques exogènes, polluants de l'environnement, tels

que les hydrocarbures aromatiques. Les mécanismes de sorption des composés organiques par la cuticule et leur transport vers le fruit restent peu connus. Néanmoins, la cutine semble être le principal responsable de la sorption de ces composés. Pour la pomme, la contribution de la cutine dans la sorption du naphthalène se situe entre 48,1 et 60,7 % alors qu'elle est de 33,7 à 36,3 % pour les cires et de 0,9 à 1,4 % pour les sucres (Chen, 2008). Comparée à la cuticule de la tomate et du raisin ou au périoderme de la pomme de terre, la cuticule de la pomme a une capacité de sorption du phénanthrène plus importante. Par rapport à ces mêmes végétaux, la cuticule de la pomme possède le plus fort pourcentage de cire (44,7 %) et le plus faible pourcentage de polysaccharides (13,2 %) dont la présence semble être défavorable à la sorption d'hydrocarbures aromatiques en raison de leur faible affinité avec les composés organiques hydrophobes (Li, 2009).

La cuticule se trouvant modifiée selon la variété, le stade de développement, les stress environnementaux ainsi que les techniques de prélèvements ou de stockages, ces paramètres sont donc également susceptibles d'affecter la sorption des hydrocarbures aromatiques au niveau de la cuticule des pommes.

Les échanges aériens sont les principaux responsables de la contamination des végétaux par les hydrocarbures aromatiques (Tuteja, 2011). La pomme est un fruit aérien dont l'épaisse couche de cire en surface est favorable à la sorption des hydrocarbures aromatiques qui sont des composés hydrophobes. Ces aspects, associés à une large consommation mondiale et à une importante production locale, font de la pomme un bon modèle pour l'étude de la contamination des fruits par les hydrocarbures aromatiques.

Les pommes des vergers normands sont plus ou moins susceptibles d'être contaminées par les hydrocarbures aromatiques en fonction de la qualité de leur environnement. Les niveaux de pollution et les principales activités émettrices d'hydrocarbures aromatiques en Normandie vont donc être maintenant abordés.

2.2. L'environnement des vergers normands

En France, les vergers peuvent être implantés en bordure (2 mètres) des voies communales (Article 5.3 du décret n°64-262 du 14 mars 1964), des routes départementales (Article 6.4 de l'arrêté du 30 mars 1967) et du réseau public routier national (Article 6.5 circulaire n°79-99 du 16 octobre 1979). Leurs fruits peuvent donc potentiellement être contaminés par les hydrocarbures aromatiques émis par le trafic routier.

Les pommes des vergers situés en zones rurales sont également susceptibles d'être contaminées par les hydrocarbures aromatiques. En milieu rural, le brûlage des déchets vert et l'utilisation du bois comme énergie de chauffage sont des pratiques courantes, fortement productrices d'hydrocarbures aromatiques. Le bois est une énergie de chauffage très utilisée en raison de son coût raisonnable subissant peu de variation contrairement aux énergies fossiles ; c'est de plus, une source d'énergie renouvelable (Sawerysyn, 2012). La combustion du bois est souvent incomplète, en raison d'une température et d'une teneur en oxygène insuffisantes, ce qui engendre d'importantes émissions de particules et de HAP (Sawerysyn, 2012 ; ADEME, 2009). Selon les données de 2011 du rapport CITEPA d'avril 2013, la combustion du bois engendre l'émission de deux fois plus de HAP que la combustion du

gazole et cinquante fois plus que celle de l'essence. Des différences de profil des composés aromatiques émis sont aussi observées entre ces combustibles. Pour le bois qui brûle à de faibles températures, ce sont les HAP de faibles masses moléculaires qui se forment principalement alors que les HAP ayant une masse moléculaire plus élevée sont émis pour de plus fortes températures de combustion comme c'est le cas avec les combustibles moteurs (Tobiszewski, 2012).

Le brûlage des déchets verts entraîne également la formation de HAP. Ces polluants (fluoranthène, benzo(*a*)anthracène, benzo(*b*)fluoranthène, benzo(*k*)fluoranthène, benzo(*a*)pyrène, dibenzo(*ah*)anthracène, indeno(1,2,3-*cd*)pyrène, benzo(*ghi*)perylène) sont retrouvés dans les fumées de brûlage de branches et de feuilles à des concentrations respectivement égales à 3480 et 6312 µg/kg de biomasse brute (Circulaire du 18 novembre 2011 relative à l'interdiction du brûlage à l'air libre des déchets verts ; INERIS, 2011). Malgré la circulaire du 18 novembre 2011 interdisant le brûlage à l'air libre des déchets verts, chaque année en France, près d'un million de tonnes de ces déchets sont brûlés engendrant ainsi d'importantes émissions de polluants car ces fumées ne peuvent pas être dépolluées contrairement à celles provenant des véhicules (Circulaire du 18 novembre 2011 relative à l'interdiction du brûlage à l'air libre des déchets verts ; ADEME, Que faire de ses déchets de jardin ?).

Les sources d'émission des hydrocarbures aromatiques sont donc multiples et majoritairement anthropiques. Pour les départements du Calvados, de la Manche et de l'Orne, les émissions de composés organiques volatils non méthaniques (COV NM qui comprennent les hydrocarbures aromatiques) mesurées dans l'air pour tous les secteurs d'activités (agricole, industriel, résidentiel, tertiaire, transports, incinération des déchets...) s'élevaient à 42 984 600 kg pour l'année 2010 soit 2444 kg/km² (figure 31). A titre de comparaison, en 2015, les émissions de COV NM s'élevaient à 162 kt pour la région PACA, première région productrice de pomme de bouche en France, ce qui correspond à 5159 kg/km² (Air PACA).

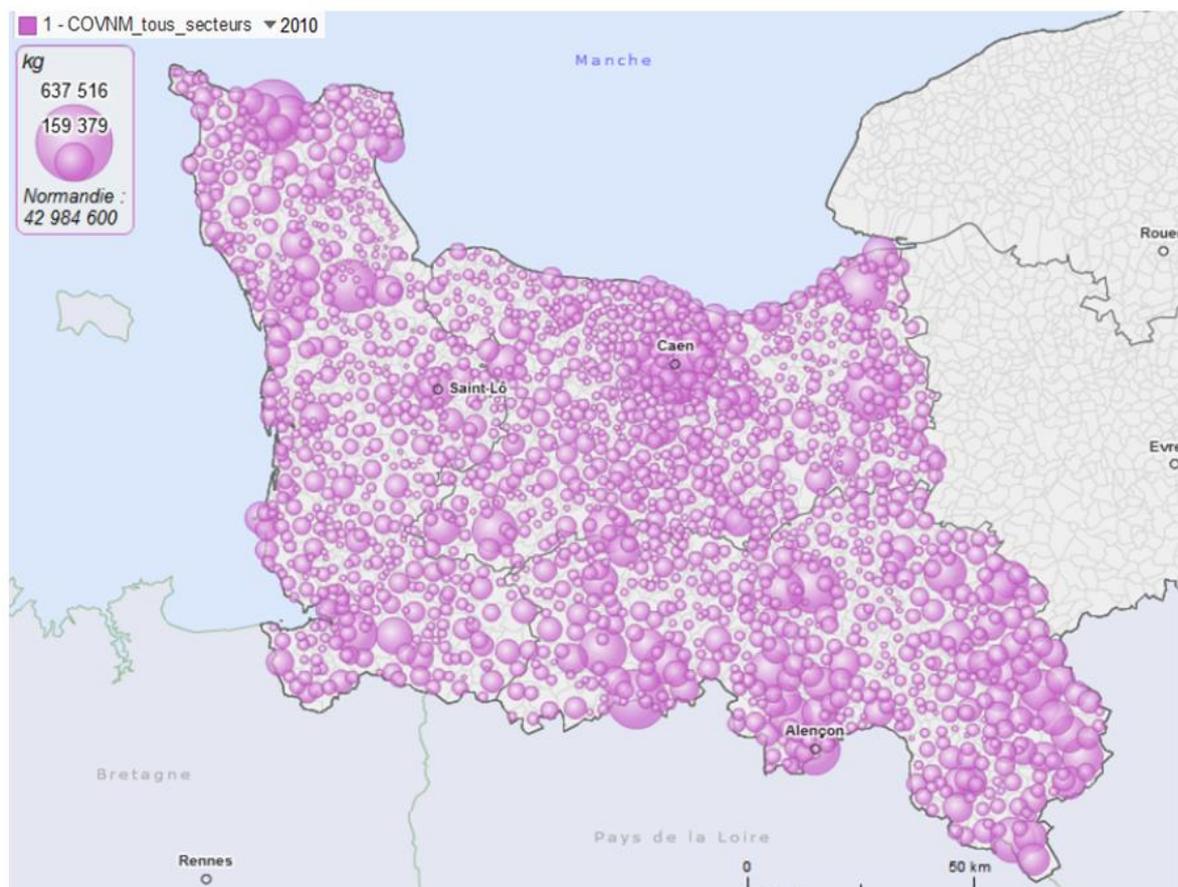


Figure 31 : Répartition des émissions de COV NM (en kg) par commune en 2010 (Données SISTER, 2010)

Dans l'ex-Basse-Normandie, les deux villes les plus émettrices sont Caen (106 538 habitants en 2014, Insee) et Cherbourg-Octeville (80 959 habitants en 2014, Insee) avec respectivement 637 516 et 533 958 kg de COV NM produits en 2010 (tableau 17). Pour ces deux villes, le secteur industriel est le principal émetteur de COV NM ; il représente environ 49% des COV NM émis à Caen et 75 % à Cherbourg. Pour Caen, le secteur résidentiel et tertiaire représente également un important contributeur à l'émission de ces polluants (environ 38 %).

Tableau 17 : Distribution des composés organiques volatils non méthaniques émis en Normandie selon les secteurs d'activité (Données SISTER, 2010)

Distribution COV NM (kg)	Normandie	Calvados	Manche	Orne	Caen	Cherbourg
Agricole	9 142 640	3 176 840	2 709 360	3 256 440	819	30
Biogénique	13 712 400	3 138 820	2 266 390	8 307 160	0	3 063
Déchets et incinération	41 637	32 232	4 259	5 147	104	nd
Industrielle	8 609 880	3 282 550	3 132 400	2 194 920	310 518	403 305
Résidentielle	8 971 860	3 529 880	3 388 860	2 053 110	240 781	101 024
Transport	2 257 535	1 043 070	836 648	377 816	64 770	21 094
Tertiaire	248 646	135 811	74 067	38 768	20 525	5 441
Total tous secteurs	42 984 600	14 339 200	12 412 000	16 233 400	637 516	533 958

nd : résultat non disponible

Les COV NM incluent les hydrocarbures aromatiques. Parmi ceux-ci, des données d'émission du benzène et du benzo(a)pyrène sont disponibles pour les villes de Caen et Cherbourg (tableau 18).

Tableau 18 : Emission de benzène et de benzo(a)pyrène à Caen et à Cherbourg en 2008 et pourcentage de répartition en fonction des activités productrices (données 2008, ATMO Normandie)

	Caen				Cherbourg			
	émission		répartition		émission		répartition	
	Industries	0,4%	Résidentiel Tertiaire	Transport	Industries	1,4%	Résidentiel Tertiaire	Transport
Benzène	11,2 t			99,6%	2,6 t			100%
BaP	6,3 kg		68,9 %	30,3 %	2,7 kg		81,6%	16,3 %

Les émissions sont plus importantes à Caen avec 11,2 tonnes pour le benzène et 6,3 kg pour le BaP qu'à Cherbourg avec respectivement 2,6 tonnes et 2,7 kg. Le benzène est susceptible d'être issu en totalité ou quasi-totalité des transports tandis que le secteur résidentiel et tertiaire auquel appartient le chauffage domestique est majoritairement responsable des émissions de BaP dans les deux villes (tableau 18, données 2008, ATMO Normandie).

Les hydrocarbures aromatiques peuvent facilement être transportés dans l'environnement, notamment grâce aux vents, ce qui les rend ubiquitaires. L'ensemble des vergers en milieu rural, urbain ou à proximité d'infrastructures routières sont donc susceptibles d'être contaminés par ces composés.

2.3. Objectifs de la thèse

Le travail de thèse, réalisé au laboratoire ABTE (Aliments, Bioprocédés, Toxicologie, Environnements) s'intègre à l'une des thématiques abordées par l'équipe QAIEA (Qualité des Aliments et des Environnements Aquatiques) puis EcoTEA (Ecoprocédés, Transferts vers l'Environnement et les Aliments) qui vise à étudier le transfert de polluants organiques de l'environnement vers la chaîne alimentaire.

Ce travail s'intègre également dans la dynamique agricole et écologique de la région Basse-Normandie engagée vers un développement durable. La politique de santé publique a pour objectif de réduire la présence de composés toxiques dans l'environnement et notamment dans l'air et le sol. Parmi les polluants surveillés, une attention particulière est accordée aux contaminants provenant des émissions liées aux transports ou à la combustion de biomasse qui contiennent des molécules toxiques telles que les hydrocarbures aromatiques. Ces polluants organiques peuvent potentiellement être adsorbés voire absorbés par les plantes et s'y accumuler pour finalement entrer dans la chaîne alimentaire humaine. Une importante part du territoire normand étant valorisée par l'agriculture, l'évaluation des niveaux de ces contaminants dans les produits agricoles est une préoccupation majeure afin de connaître leur impact sur la qualité sanitaire des aliments et leurs possibles effets sur la santé. Le projet cible plus particulièrement un produit agricole de fort intérêt régional, la pomme, qui est la base de la production cidricole normande. L'utilisation d'un fruit produit localement a pour avantage d'apporter une large disponibilité. De plus, la longue durée de maturation des

pommes sur l'arbre ainsi que leur épaisse cire sont favorables à une sorption potentiellement importante d'hydrocarbures aromatiques. La pomme est également un fruit largement consommé à l'échelle mondiale, elle est donc un bon modèle d'étude.

Très peu de travaux disponibles dans la littérature traitent de la présence des hydrocarbures aromatiques dans les fruits. L'objectif vise donc à développer les connaissances sur le niveau de contamination des HAP et des BTEX dans des pommes provenant de vergers, de pommiers situés en zone urbaine ou dans des jardins privés qui sont soumis à l'impact de l'air environnant.

Ce projet implique une première phase, essentielle, de développement méthodologique dont l'objectif est d'optimiser des techniques d'extraction et d'analyse spécifiques aux différents hydrocarbures aromatiques. Le défi analytique de ce projet réside dans la complexité de la matrice fruitière et dans les très faibles quantités d'hydrocarbures aromatiques retrouvés dans les fruits. Les méthodologies développées devront donc être sensibles et sélectives afin de parvenir à mesurer quelques microgrammes d'hydrocarbures aromatiques par kilogramme de fruit frais.

Les hydrocarbures aromatiques monocycliques (BTEX) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) se distinguent par leur propriété physico-chimique et notamment par leur différence de volatilité. Leur extraction nécessite donc l'établissement et la validation de méthodes distinctes qui seront abordées séparément. Tout d'abord, une méthode rapide et particulièrement adaptée à l'extraction des composés hautement volatils est proposée pour l'extraction des BTEX et des HAP légers. En effet, la HS-SPME utilise une fibre placée dans l'espace gazeux au-dessus de l'échantillon, ce qui permet d'éviter le contact avec la matrice. Deux revêtements d'extraction différents permettant l'adsorption spécifique des hydrocarbures aromatiques sur cette phase stationnaire sont testés : un revêtement PDMS d'épaisseurs 30 et 100 μm et un revêtement mixte CAR/PDMS d'épaisseur 75 μm .

Concernant les HAP lourds, une méthode d'extraction liquide assistée par les ultrasons suivie d'une purification à travers des cartouches SPE est dans un premier temps utilisée. Dans un deuxième temps, une technique de purification innovante, la MEPS, a été mise en place pour faire suite à une procédure d'extraction en UAE. Cette méthode trouve très peu d'applications dans la littérature et n'a jamais été décrite pour les matrices fruitières. Elle a de plus pour avantage d'être rapide et d'utiliser une faible quantité de solvant.

Les mises au point méthodologiques (développement et optimisation) réalisées avec la pomme comme matrice ont pour objectif d'aboutir à une extraction sensible et répétable des hydrocarbures aromatiques présents à l'état de trace.

Certaines méthodologies établies ont ensuite été confrontées à d'autres matrices fruitières ayant des caractéristiques différentes. L'adaptabilité des méthodes est validée par la vérification de la sensibilité, de la répétabilité et de la linéarité des analyses.

Les hydrocarbures aromatiques sont déterminés dans 4 modèles de fruits (pomme, poire, prune et raisin) contaminés par des gaz d'échappement provenant d'une motorisation diesel.

Le modèle pomme a également été exposé à des émissions de combustion de végétaux. Les analyses séparées de la peau et de la chair permettent d'identifier et quantifier les hydrocarbures aromatiques présents, mais aussi d'étudier leur transfert de l'épiderme vers le mésocarpe du fruit.

Enfin, des prélèvements réalisés sur 13 sites, dont 9 situés en zone urbaine ou aux alentours d'une agglomération, 2 à proximité d'une route nationale et 2 en zone rurale, visent à déterminer le degré de contamination des pommes provenant de cultures régionales.

Chapitre 3 : Matériels et Méthodes

Chapitre 3 : Matériels et Méthodes

3.1. Echantillons

Fruits provenant du supermarché

Des pommes Belle de Boskoop et Gala, sont utilisées, selon la disponibilité saisonnière, pour l'optimisation et la validation des différentes méthodes d'extraction. Des poires William, des prunes rouge Black Amber et du raisin blanc Italia ont permis de vérifier l'adaptabilité des méthodes à d'autres matrices fruitières. L'ensemble de ces fruits, provenant d'un supermarché (Carrefour, Caen Côte de Nacre), sont sélectionnées à maturité sur la base de l'uniformité et l'absence de dommages ou imperfections de la peau.

Fruits récoltés en Normandie

Au cours des mois de septembre et octobre 2016, des pommes (3 à 8 pommes par arbre selon la masse des fruits), situées à une hauteur inférieure à 2 m, sont aussi directement récoltées dans des pommiers normands à l'aide de gants nitrile (à l'exception des pommes de Verson et Venoix (figure 32) qui sont récoltées sans gants puis placées dans un sac plastique). Jusqu'à l'extraction, les fruits sont placés et conservés au maximum 2 jours dans des bocaux en verre (Le Parfait) hermétiquement clos. La localisation des 13 sites étudiés est indiquée en figure 32 et quelques sites de prélèvement sont illustrés en figure 33.



Figure 32 : Localisation des sites de prélèvements (points rouges) des pommes en Normandie

Les prélèvements réalisés sont au nombre de :

4 à Caen (plus de 100 000 habitants) :

- dans l'enceinte du rectorat, (coordonnées GPS 49.177893, -0.381215) prélèvement le 10 octobre 2016, le temps alternant entre nuages et éclaircies (la dernière averse datant du matin du 9 octobre), masse des pommes entre 50,6 et 100,2 g (noté Rectorat)
- derrière le parc des expositions, (coordonnées GPS 49.1696552, -0.3823228), prélèvement le 29 septembre 2016 par temps nuageux (la dernière averse datant de la nuit du 27 au 28 septembre), masse des pommes entre 39,6 et 65,9 g (noté Parc expo)
- dans l'enceinte de l'IUT, (coordonnées GPS 49.211642, -0.366276) prélèvement le 12 septembre 2016 par temps couvert (la dernière averse datant du 10 septembre), masse des pommes entre 53,8 et 67,0 g (noté IUT 1.1), prélèvement le 13 octobre 2016, le temps alternant entre nuages et éclaircies (la dernière averse datant du matin du 9 octobre), masse des pommes entre 47,4 et 59,4 g (noté IUT 1.2)
- dans le quartier de Venoux à proximité du stade d'Ornano (coordonnées GPS 49.179561, -0.399024) prélèvement le 26 septembre, le temps alternant entre nuages et éclaircies (la dernière averse datant du matin du 25 septembre). Ces pommes ont des masses comprises entre 68,3 et 93,3 g (noté Venoux)

3 dans la proche agglomération caennaise :

- en bordure du périphérique sud à Bretteville-sur-Odon (coordonnées GPS 49.165148, -0.427633), prélèvement le 25 octobre 2016 par temps nuageux (la dernière averse datant de l'après midi du 23 octobre), masse des pommes entre 97,2 et 130,5 g (noté Bretteville)
- en bordure de route départementale D7 (reliant Caen à Luc-sur-Mer) à Epron, (coordonnées GPS 49.225052, -0.369110) prélèvement le 26 septembre 2016 sur 2 arbres distants d'une dizaine de mètres, le temps alternant entre nuages et éclaircies (la dernière averse datant du matin du 25 septembre), masse des pommes entre 46,0 et 57,0 g pour le prélèvement noté Epron 1 et entre 70,7 et 96,1 g pour le prélèvement noté Epron 2.
- à Verson (coordonnées GPS 49.155865, -0.476148) prélèvement le 27 septembre par temps nuageux (la dernière averse datant du matin du 25 septembre). Ces pommes ont des masses comprises entre 41,9 et 69 g (noté Verson)

2 dans des villes de taille moyenne (moins de 20 000 habitants) :

- Saint-Lô dans la Manche (coordonnées GPS 49.107064, -1.080949), prélèvement le 11 octobre 2016, le temps alternant entre nuages et éclaircies (la dernière averse datant du matin du 9 octobre), masse des pommes entre 41,5 et 84,9 g (noté Saint-Lô)
- Vire dans le Calvados (coordonnées GPS 48.833175, -0.893382), prélèvement le 10 octobre 2016, le temps alternant entre nuages et éclaircies (la dernière averse datant du matin du 9 octobre), masse des pommes entre 41,5 et 87,3 g (noté Vire)

2 à proximité de la route nationale RN13 :

- à Isigny-sur-Mer, (coordonnées GPS 49.315514, -1.101054) prélèvement le 23 octobre 2016, le temps alternant entre nuages et éclaircies (la dernière pluie datant du 21 octobre), masse des pommes entre 59,9 et 122,0 g (noté Isigny)
- à la ferme de Romilly (Coordonnées GPS 49.342930, -1.028996), prélèvement le 23 octobre 2016, le temps alternant entre nuages et éclaircies (la dernière pluie datant du 21 octobre), masse des pommes entre 55,1 et 80,0 g (noté Romilly)

2 en zone rurale

- Agy, (coordonnées GPS 49.240817, -0.766727) prélèvement le 15 septembre 2016 par temps pluvieux, masse des pommes (type Canada grise) entre 74,2 et 77,3 g (noté Agy)
- Livry (coordonnées GPS 49.126091, -0.761871), prélèvement le 13 septembre 2016 par temps couvert (la dernière averse datant du 10 septembre), masse des pommes entre 95,2 et 106,3 g (noté Livry)



Figure 33 : Photographies de quelques sites de prélèvement dans des pommiers normands

(a) un pommier situé sur le site de l'IUT à proximité du parking du bâtiment Mesures Physiques et de l'arrêt de tramway Maréchal Juin, (b) un pommier situé à Bretteville-sur-Odon, sur un terre-plein à la sortie 9 (Porte de Bretagne) du périphérique sud de Caen permettant de rejoindre l'autoroute A84, (c) des pommiers (sur la droite de la photographie) situés à Epron en bordure de route départementale (D7) reliant Caen à Luc-sur-Mer, et (d) un pommier localisé à l'entrée de l'enceinte du Rectorat de l'académie de Caen

Fruits exposés aux gaz d'échappement d'un moteur diesel

Des pommes (Belle de Boskoop), des poires (William), des prunes rouge (Black Amber) et du raisin blanc (Italia) sont intentionnellement exposés aux gaz d'échappement d'un moteur diesel. Le véhicule utilisé, mis en circulation en 2005, possède un filtre à particules. Chaque matin, après que le véhicule ait parcouru un trajet quotidien de 30 min, l'un des fruits est exposé aux gaz d'échappement. Chaque variété de fruit est introduite, pendant 30 min, dans un conduit, de 1,60 mètre ayant un diamètre externe de 10,5 cm et un diamètre interne de 8 cm, directement relié au pot d'échappement comme le montre la figure 34. La localisation des fruits, à 15-20 cm de l'extrémité du conduit, est indiquée par la flèche rouge.



Figure 34 : Montage utilisé pour l'exposition intentionnelle des fruits (30 min) aux gaz d'échappement diesel
La flèche rouge indique la localisation des fruits

L'étude de l'ensemble de ces fruits, provenant du commerce ou récoltés localement, porte sur les fruits entiers (peau et pulpe), ils ne sont donc ni pelés ni lavés mais seulement débarrassés du trognon et des pépins (ou noyau pour les prunes) avant broyage à l'aide d'un mixeur de cuisine. Le broyat est ensuite conservé sous atmosphère azoté dans un bocal hermétique en verre, placé à 4 °C. Pour chaque échantillon, l'extraction est répétée trois fois afin de réduire la variabilité due à la matrice.

Fruits exposés aux fumées de combustion de biomasse

Des pommes de variété Boskoop sont délibérément exposées à des fumées issues de brulages de végétaux. Des braises, réalisées à partir de bois de noyer sec, sont introduites dans un barbecue sur la grille duquel sont placées des pommes. Puis des brindilles de tilleul humide sont régulièrement ajoutées sur les braises pour créer de la fumée. Les pommes sont exposées aux fumées (à environ 25 cm au-dessus des braises) par tranches de 15 min pendant 1 à 2 h. Des temps de pause, au cours desquels la grille est sortie du barbecue, sont respectés entre chaque tranche d'exposition, afin d'éviter la cuisson des fruits par la chaleur dégagée par les braises.

La peau, d'une épaisseur inférieure à 2 mm, et la chair des pommes, débarrassée du trognon et des pépins, sont récupérées et broyées séparément pour permettre des analyses indépendantes. Pour chaque partie de la pomme (peau et chair), l'extraction est renouvelée trois fois.

Produits commerciaux industriels à base de pomme

Différents produits industriels à base de pomme, présentés par la figure 35, sont également testés. Des pommes sous forme de pâte de fruit (N.A !), des chips de pommes (Crousti Pom, Vico) et de la compote de pomme avec morceaux (ANDROS) sont achetés au supermarché Carrefour, Caen Côte de Nacre.



Figure 35 : Produits industriels à base de pomme

(a) pomme sous forme de pâte de fruit N.A.!, (b) chips de pomme Crousti Pom de Vico et (c) compote de pommes avec morceaux (ANDROS)

3.2. Solvants et standards

Les premiers solvants utilisés sont de grade GC pour analyse : dichlorométhane (99,9%, Sigma–Aldrich, Steinheim, Allemagne), cyclohexane (99,5%, Sigma–Aldrich) et acétate d'éthyle (99,8%, Carlo Erba, Val de Reuil, France).

Ces solvants sont, ensuite, remplacés par d'autres mieux adaptés à l'analyse de résidus : dichlorométhane PESTINORM® (99,8%, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), acétate d'éthyle PESTINORM® (99,8%, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), cyclohexane PESTINORM® (99,5%, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France).

D'autres solvants également utilisés sont l'éthanol absolu HiPerSolv CHROMANORM® (>99,7%, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), le méthanol grade GC ($\geq 99,8\%$, Sigma–Aldrich), l'heptane (99 % ACROS Organics).

L'hélium Alphagaz (99,999 %), utilisé comme gaz vecteur lors des analyses, est obtenu auprès d'Air Liquide (Paris, France).

L'Extran® MA 01, nettoyant alcalin universel (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) est utilisé comme produit de nettoyage pour l'ensemble de la verrerie qui est ensuite rincée avec de l'eau ultrapure produite par le système de purification Milli-Q® Reference A+.

La solution certifiée de 16 HAP (Supelco, Bellefonte, PA, USA) est composée de naphthalène (99,9%), acénaphthylène (99,9%), 2-bromonaphthalène (99,9%), acénaphthène (99,9%), fluorène (99,1%), anthracène (99,5%), phénanthrène (99,0%), fluoranthène (99,5%), pyrène (97,5%), benzo(a)anthracène (99,9%), chrysène (98,9%), benzo(b)fluoranthène (98,1%), benzo(a)pyrène (99,9%), indéno(1,2,3-*cd*)pyrène (99,9%), dibenzo(*ah*)anthracène (99,9%), benzo(*ghi*)perylène (99,6%), chacun en solution à 2 mg/mL dans le dichlorométhane. La solution certifiée de BTEX (certified reference material 47505, ISO/IEC 17025 and ISO

Guide 34, Supelco) contient du benzène (99,9%), du toluène (99,9%), de l'éthylbenzène (99,9%), du *p*-xylène (99,9%), du *m*-xylène (99,8%) et du *o*-xylène (99,6%) chacun en solution à 2 mg/mL dans le méthanol.

Les standards, utilisés comme étalons internes, sont le *n*-nonadécane (99,9%, Supelco, Bellefonte, PA, USA), le nonane (Supelco, Bellefonte, PA, USA), l'éthylbenzène-d10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) en solution à 2000 µg/mL dans le méthanol, l'acénaphthène-d10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) en solution à 2000 µg/mL dans le dichlorométhane et le benzo(*a*)anthracène-d12 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) en solution à 2000 µg/mL dans le dichlorométhane.

Plusieurs solutions de travail sont préparées, à partir des produits commerciaux d'étalons internes et des mélanges certifiés de HAP et BTEX.

Solutions d'étalons interne

Le nonane et *n*-nonadécane sont utilisés, dans un premier temps, comme étalons interne. Une solution de *n*-nonadécane à 2 mg/mL est préparée en introduisant 10 mg du produit commercial dans une fiole jaugée de 5 mL complétée avec du dichlorométhane. Une solution de nonane à 2 mg/mL est réalisée avec 14 µL du produit pur (densité 718 g/L) prélevés avec une seringue de 50 µL et placés dans une fiole jaugée de 5 mL complétée avec du dichlorométhane. Des volumes équivalents des deux solutions à 2 mg/mL sont mélangés pour obtenir une solution de travail contenant du nonane et du *n*-nonadécane, chacun en concentration à 1 mg/mL dans le dichlorométhane. Cette solution de travail, appelée solution étalon interne 1 (nonane/*n*-nonadécane 1 mg/mL), est conservée au congélateur à environ -20 °C pendant au maximum 1 mois.

Dans un deuxième temps, les composés deutérés (éthylbenzène-d10, acénaphthène-d10 et benzo(*a*)anthracène-d12) ont servi d'étalons internes. Le benzo(*a*)anthracène-d12 est tout d'abord utilisé seul. Une solution intermédiaire (10 mg/L) de benzo(*a*)anthracène-d12 est préparée avec 50 µL de la solution commerciale à 2000 µg/mL prélevés avec une seringue en verre de 250 µL (SGE Analytical Science) et placés dans une fiole de 10 mL complétée avec du dichlorométhane. Cette solution est par la suite diluée au 1/100^{ème}, en introduisant 100 µL, prélevés avec une seringue en verre de 250 µL (SGE Analytical Science), dans une fiole de 10 mL complétée avec du dichlorométhane, permettant ainsi d'obtenir la solution de travail de benzo(*a*)anthracène-d12 à 0,1 mg/L, nommée solution étalon interne 2.

Le benzo(*a*)anthracène-d12 est ensuite utilisé en association avec l'acénaphthène-d10. 10 µL de chacune des deux solutions commerciales à 2000 µg/mL, prélevés avec une seringue en verre de 50 µL (SGE Analytical Science), sont introduits dans une fiole de 10 mL complétée avec du dichlorométhane. Ce mélange permet d'obtenir une solution de travail contenant du benzo(*a*)anthracène-d12 et de l'acénaphthène-d10 à 2 mg/L : cette solution est appelée solution étalon interne 3.

Enfin, l'acénaphthène-d10 est utilisé en association avec l'éthylbenzène-d10. 20 µL de chaque solution commerciale d'éthylbenzène-d10 et d'acénaphthène-d10 à 2000 µg/mL, prélevés avec une seringue de 50 µL, sont placés dans une fiole de 20 mL complétée avec du dichlorométhane. La solution de travail (solution étalon interne 4) ainsi réalisée contient de l'éthylbenzène-d10 et de l'acénaphthène-d10 à 2 mg/L.

Les solutions d'étalons internes 2, 3 et 4 sont conservées au maximum 2 semaines au réfrigérateur entre 4 et 6 °C.

Solutions de HAP et BTEX

Les HAP et les BTEX sont toujours utilisés en mélange dans des proportions égales. La première solution de HAP et BTEX correspond à une dilution au 1/1000 des solutions commerciales certifiées à 2000 µg/mL dans du dichlorométhane. La solution de travail ainsi obtenue (solution HAP/BTEX 1) contient des HAP et des BTEX à 2 mg/L.

Une seconde solution de HAP et BTEX est préparée grâce à une dilution des solutions commerciales certifiées au 1/200 dans du dichlorométhane. Cette solution intermédiaire à 10 mg/L est ensuite diluée au 1/100 dans du dichlorométhane pour obtenir une solution contenant des HAP et des BTEX à 0,1 mg/L (solution HAP/BTEX 2).

Une dernière solution de HAP et de BTEX est obtenue en mélangeant 20 µL de chacune des solutions commerciales certifiées, prélevés avec une seringue de 50 µL, dans une fiole jaugée de 5 mL complétée avec du dichlorométhane. Cette solution est ensuite diluée au 1/20 en plaçant 250 µL, prélevés avec une seringue de 250 µL, dans une fiole jaugée de 5 mL complétée avec du dichlorométhane. La solution de travail obtenue contient des HAP et des BTEX à 0,4 mg/L (solution HAP/BTEX 3).

Les solutions de HAP/BTEX sont conservées au réfrigérateur entre 4 et 6 °C (la conservation au congélateur à -20 °C s'étant révélée moins appropriée, en raison du plus important écart de température existant pour atteindre une température ambiante, la décongélation entraîne l'évaporation des composés les plus volatils).

3.3.Extractions

3.3.1. Matériels d'extraction

Trois types de fibres HS-SPME, associées à un support manuel (Manual holder, Supelco, Bellefonte, PA, USA), sont utilisés pour l'extraction de BTEX et des HAP légers. Chaque aiguille de 5,7 cm de longueur renferme une fibre en silice de 24 Ga (soit environ 0,5 mm) d'épaisseur avec sur une longueur de 1 cm un revêtement mixte CAR/PDMS (carboxen/polydiméthylsiloxane) de 75 µm d'épaisseur ou un revêtement PDMS (polydiméthylsiloxane) d'épaisseurs 30 ou 100 µm.

L'extraction assistée par les ultrasons utilise un bain à ultrasons thermostaté T 700/H Elma de hauteur 30 cm, longueur 25,5 cm et largeur 15 cm (Singen, Allemagne). Les extraits sont ensuite centrifugés grâce à une centrifugeuse Heraeus (Biofuge Primo R). La filtration des échantillons est réalisée grâce à des filtres plissés standards en cellulose, de porosité 6 à 10 µm et de diamètre 150 mm (Servilab/LAB-ONLINE®, référence 0601P00024).

Un montage Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco) à 12 ports avec des capillaires en polytétrafluoroéthylène (PTFE) (de diamètre externe de 3 mm, de diamètre interne de 1 mm et de longueur 3,1 cm) permet la purification simultanée de plusieurs échantillons à travers les cartouches SPE. Les cartouches utilisées ont un volume de 6 mL, une hauteur de 6,5 cm et un diamètre interne de 1,2 cm. Elles contiennent 250 mg de résine copolymère Styène/DivinylBenzène (SupelcleanTMENVITM-Chrom P, particules 80–160 µm, pores 20–300 Å, Supelco, Bellefonte, PA, USA), ce qui représente une hauteur de 1,2 cm.

La purification par MEPS utilise une seringue de 250 μL avec une aiguille MEPS HyperSep Retain Polar Enhanced Polymer (PEP, Thermo Scientific - SGE Analytical Science). Le solide compacté de type PEP (polar enhanced polymer) est un copolymère styrène divinylbenzène (PS/DVB) modifié avec des groupes fonctionnels d'urée. Une purification par MEPS avec un support C18 (Thermo Scientific - SGE Analytical Science) est également testée.

3.3.2. Procédures d'extraction

L'ensemble des extractions est réalisé en triplicat. Des échantillons de fruits seuls sont utilisés comme blancs afin de vérifier l'absence de contamination de la matrice et des équipements.

3.3.2.1. Extraction des composés volatils et semi-volatils : BTEX et HAP légers

L'extraction des BTEX et des HAP légers est réalisée par micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME). Les fibres neuves subissent un conditionnement d'une heure dans l'insert d'un chromatographe à 300 $^{\circ}\text{C}$ avant leur première utilisation.

La procédure HS-SPME tout d'abord appliquée correspond à celle mise au point au laboratoire, concernant la détection de BTEX et de HAP pour des concentrations de l'ordre du ppm et valorisée au travers d'un article publié dans « Journal of Food Composition and Analysis » (Poinot, 2014). Une masse de 20 g de broyat de pomme est placée dans un flacon en verre ambré de 125 mL contenant un barreau aimanté. Le broyat est additionné de 20 μL d'un mélange de HAP et de BTEX à 1 g/L, prélevés avec une seringue de 50 μL , afin d'obtenir des concentrations ajoutées de 1 mg/kg dans la pomme. Le flacon est ensuite à demi-immersé dans un bain marie d'eau distillée à 60 $^{\circ}\text{C}$ (figure 36).

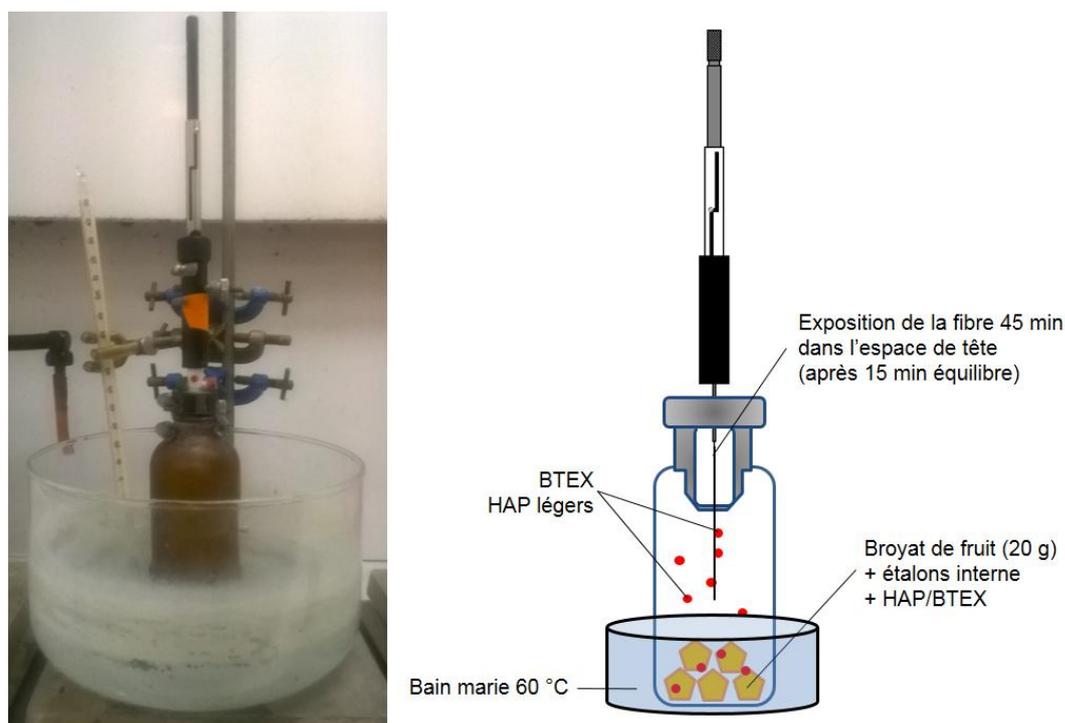


Figure 36 : Schéma de la procédure d'extraction par micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME)

Une agitation constante (750 tours par minute, 50% de la vitesse maximum de l'agitateur) est maintenue tout au long de l'extraction. Après 15 min d'équilibre, une fibre, possédant un revêtement mixte CAR/PDMS (carboxen/polydiméthylsiloxane) de 75 μm , est exposée 45 min à environ 5 cm au-dessus de l'échantillon dans l'espace gazeux dont le volume est estimé à environ 75 cm^3 . La fibre est placée manuellement dans l'insert de la GC-MS pour désorption.

Ce protocole a ensuite été modifié afin d'être optimisé.

Méthode HS-SPME 1

Dans un premier temps, un étalon interne (le nonane) est ajouté et des concentrations en BTEX de l'ordre du ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) sont testées. Ces concentrations sont 100 à 1000 fois inférieures à celles testées auparavant au laboratoire (Poinot, 2014). Pour la réalisation de la gamme d'étalonnage, les 20 g de broyat sont additionnés de 10 μL de la solution étalon interne 1 (prélevés avec une seringue de 50 μL) et de 0 à 100 μL de la solution HAP/BTEX 1 (les volumes à partir de 50 μL sont prélevés avec une seringue de 250 μL et une seringue de 50 μL est utilisée pour les volumes inférieurs). Les ajouts ainsi effectués correspondent à des teneurs ajoutées aux broyat comprises entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Le volume total introduit dans l'échantillon est maintenu constant à 110 μL en complétant si nécessaire par un ajout de dichlorométhane. Dans le cas où le broyat n'est pas enrichi en HAP et BTEX, comme pour le point à 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la gamme d'étalonnage, 10 μL de la solution étalon interne 1 et 100 μL de dichlorométhane sont additionnés à l'échantillon. Cette première méthode modifiée est appelée méthode HS-SPME 1.

Méthode HS-SPME 2

Dans un deuxième temps, l'éthylbenzène-d10 et l'acénaphthène-d10 sont utilisés comme étalons internes. La méthode est appliquée à plusieurs fruits (pomme, poire, prune et raisin) achetés en supermarché puis additionnés de HAP et de BTEX ou exposés à des gaz d'échappement. Pour la réalisation de la gamme d'étalonnage, le broyat (20 g) est additionné de 100 μL de la solution étalon interne 4 (prélevés avec une seringue de 250 μL) et de 0 à 100 μL de la solution HAP/BTEX 1 (les volumes à partir de 50 μL sont prélevés avec une seringue de 250 μL et une seringue de 50 μL est utilisée pour les volumes inférieurs). Les ajouts ainsi effectués correspondent à des teneurs ajoutées aux fruits comprises entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Le volume total introduit dans l'échantillon est maintenu constant à 200 μL en complétant si nécessaire par un ajout de dichlorométhane. Dans le cas où le broyat n'est pas enrichi en HAP et BTEX un ajout de 100 μL de dichlorométhane est réalisé en plus des 100 μL de la solution étalon interne 4 (tous deux prélevés avec une seringue de 250 μL), comme pour le point à 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la gamme d'étalonnage ou pour l'analyse des fruits pollués par les gaz d'échappement. Cette méthode est nommée méthode HS-SPME 2.

Méthode HS-SPME 3

Dans un troisième temps, des fibres possédant un revêtement PDMS (polydiméthylsiloxane) de 75 et 100 μm sont comparées. La fibre PDMS de 100 μm est finalement sélectionnée pour sa meilleure capacité d'extraction des BTEX et HAP. La gamme d'étalonnage, permettant d'obtenir des pommes additionnées de teneurs comprises entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ utilise un ajout

de 100 μL de la solution étalon interne 4 et de 0 à 100 μL de la solution HAP/BTEX 1 au broyat. Des points de gamme supplémentaires, entre 0,2 et 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sont réalisés grâce à l'utilisation de 10 à 100 μL de la solution HAP/BTEX 3 (les volumes à partir de 50 μL sont prélevés avec une seringue de 250 μL et une seringue de 50 μL est utilisée pour les volumes inférieurs). Cette méthode, appelée méthode HS-SPME 3, est appliquée à des pommes provenant d'un supermarché puis additionnées de HAP et de BTEX ou exposées à des fumées de brulage de végétaux, mais aussi à des pommes récoltées en Normandie.

3.3.2.2. Extraction des hydrocarbures aromatiques les plus lourds

3.3.2.2.1. Extraction assistée par les ultrasons couplée à une extraction sur phase solide (UAE/SPE)

Procédure d'extraction assistée par les ultrasons

La méthode UAE/SPE initialement utilisée reprend le protocole décrit dans la publication de P. Poinot (2014) dans lequel un gramme de broyat de pomme (provenant d'un supermarché) est pesé dans un tube à essai en verre de 20 mL ayant une hauteur de 160 mm et un diamètre externe de 15 mm. Le broyat est additionné de quantités égales de chaque HAP à 2 mg/kg puis de 10 mL de dichlorométhane. Le tube fermé avec du film plastique (Parafilm®) est placé 10 min à 30 °C dans un bain à ultrasons où la fréquence est fixée à 30 kHz (dimensions du bain à ultrasons hauteur 30 cm, longueur 25,5 cm et largeur 15 cm) (figure 37).



Figure 37 : Bain à ultrasons thermostaté à 30 °C utilisé pour l'extraction assistée par les ultrasons (UAE)

La totalité du contenu du tube est ensuite transféré dans un tube à centrifuger en plastique. Après centrifugation à 3000 rpm (environ 1200 g) à 30 °C pendant 10 min, le broyat et l'extrait au dichlorométhane sont séparés par filtration sur filtre plissé standard en cellulose, de porosité 6 à 10 μm et de diamètre 150 mm (Servilab/LAB-ONLINE®, référence 0601P00024). Le résidu de fruit est récupéré dans un tube à essai en verre de 20 mL contenant 10 mL de cyclohexane. Le tube à essai est fermé avec du film plastique (Parafilm®) et le mélange est de nouveau soumis aux ultrasons, centrifugé et filtré en suivant la même procédure et les mêmes conditions que précédemment. L'extrait au cyclohexane (≈ 10 mL) est associé à celui au dichlorométhane (≈ 10 mL). Le mélange (de volume ≈ 20 mL), placé dans un ballon de 100 mL, est concentré jusqu'à environ 1 mL avec un évaporateur rotatif à

60 °C, il est ensuite repris avec 1 mL de mélange cyclohexane/dichlorométhane (50/50, v/v) et 5 mL de cyclohexane (soit un volume d'extrait d'environ 7 mL).

Procédure de purification par extraction en phase solide

L'extrait obtenu après UAE puis concentré soumis à une purification par SPE (figure 38) au moyen de cartouches Envi Chrom-P™. Le montage Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifold permet d'utiliser plusieurs cartouches et d'effectuer simultanément l'extraction de plusieurs échantillons. La phase stationnaire de la cartouche est conditionnée avec 15 mL d'acétate d'éthyle puis 10 mL de cyclohexane. L'extrait à purifier est introduit dans la colonne et subit un passage lent sous faible vide à travers la phase stationnaire contenue dans la cartouche.

Le ballon ayant contenu l'échantillon lors de l'évaporation est rincé deux fois avec 3 mL de cyclohexane/éthanol (70/30, v/v) et le liquide de rinçage est introduit dans la colonne. La cartouche est ensuite rincée avec 3 mL de cyclohexane/éthanol (70/30, v/v). Les HAP retenus sur la cartouche sont alors élués avec 12 mL de cyclohexane/acétate d'éthyle (40/60, v/v). L'extrait collecté dans des flacons de 15 mL est conservé au maximum pendant 1 semaine au réfrigérateur (entre 4 et 6 °C). Juste avant l'analyse l'extrait est concentré sous flux d'azote jusqu'à environ 1 mL puis transféré dans des micro-tubes de 1,5 mL pour permettre une concentration jusqu'à 200 µL.

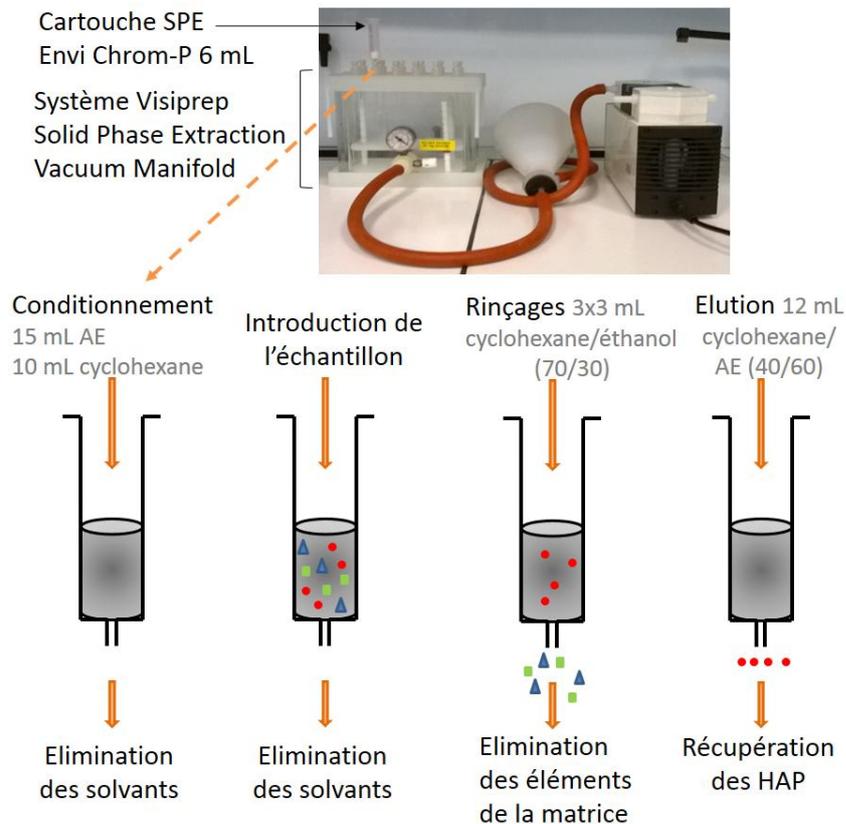


Figure 38 : Schéma de la procédure de purification par extraction sur phase solide (SPE)

AE : Acétate d'éthyle

La méthodologie précédente (Poinot, 2014), adaptée pour la détermination de teneurs de l'ordre du ppm (2 mg/kg) a dû être modifiée pour permettre une détermination de teneurs de l'ordre du ppb. Une gamme entre 0 et 10 µg/kg est réalisée. L'extrait collecté dans un flacon de 15 mL après l'élution en SPE est concentré de 12 mL à environ 150 µL sous flux d'azote. Puis, l'extrait est transféré dans des micro-tubes en verre de 1,5 mL contenant des micro-inserts en verre de 200 µL (figure 39) pour y être réduit à 50 µL sous flux d'azote. 1 µL de l'extrait est prélevé (méthode des doubles bulles), directement après concentration sous flux d'azote, avec une seringue de 10 µL (Hamilton Company, Reno Nevada) et injecté manuellement en GC-MS. Des tubes à centrifuger en verre de 35 mL (Kimble Chase) remplacent ceux en plastique, et un étalon interne (le *n*-nonadécane) est ajouté au début de l'extraction.

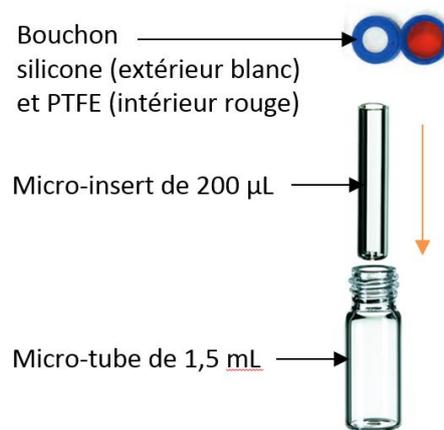


Figure 39 : Schéma représentant un micro-tube en verre de 1,5 mL dans lequel est introduit un micro-insert en verre de 200 µL

Le micro-tube est fermé avec un bouchon composé de silicone pour la partie extérieure (blanche) et de polytétrafluoroéthylène (PTFE) pour la partie intérieure (rouge)

Méthode UAE/SPE 1

Dans un premier temps, 2 µL de la solution étalon interne 1 (prélevés avec une seringue de 10 µL) contenant notamment le *n*-nonadécane et entre 0 et 5 µL de la solution HAP/BTEX 1 (prélevés avec une seringue en verre de 10 µL) sont ajoutés au broyat de pomme (1 g) pour réaliser une gamme d'étalonnage entre 0 et 10 µg/kg. Le volume total introduit dans l'échantillon est maintenu constant à 7 µL en complétant si nécessaire par un ajout de dichlorométhane. Dans le cas où le broyat n'est pas enrichi en HAP et BTEX, comme pour le point à 0 µg/kg de la gamme d'étalonnage, 5 µL de dichlorométhane sont additionnés à l'échantillon en plus des 2 µL de solution étalon interne 1. Cette première version modifiée est appelée méthode UAE/SPE 1.

Méthode UAE/SPE 2

Dans un deuxième temps, le benzo(*a*)anthracène-d12 est utilisé comme étalon interne. Dans la méthode UAE/SPE 2, le broyat de fruit (1 g) est additionné de 100 µL de solution étalon interne 2 (prélevés avec une seringue de 250 µL). 0 à 100 µL de la solution HAP/BTEX 2 (prélevés avec une seringue en verre de 250 µL pour les volumes à partir de 50 µL et avec une seringue en verre de 50 µL pour les volumes inférieurs) permettent d'ajouter entre 0 et 10 µg/kg de chaque hydrocarbure aromatique aux fruits pour la réalisation de la gamme

d'étalonnage. Le volume total introduit dans l'échantillon est maintenu constant à 200 μL en complétant si nécessaire par un ajout de dichlorométhane. Dans le cas où le broyat n'est pas enrichi en HAP et BTEX, 100 μL de solution étalon interne 2 et 100 μL de dichlorométhane sont additionnés à l'échantillon. La méthode UAE/SPE 2 est appliquée à différents fruits (pomme, poire, prune et raisin) achetés en supermarché puis additionnées de HAP et BTEX, ou exposés à des gaz d'échappement.

3.3.2.2.2. Extraction assistée par les ultrasons couplée à une micro-extraction par solide compacté (UAE/MEPS)

Préparation de l'échantillon : méthode UAE/MEPS

La procédure utilise 20 g de pomme broyée additionnés de 100 μL de solution étalon interne 3 (contenant 0,2 μg d'acénaphthène-d10 et 0,2 μg de benzo(a)anthracène-d12 soit 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour chacun) et (i) entre 0 et 100 μL de la solution HAP/BTEX 2 pour réaliser une gamme d'ajouts entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et (ii) entre 10 et 100 μL de la solution HAP/BTEX 3 pour des points de gamme entre 0,2 et 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (les volumes à partir de 50 μL sont prélevés avec une seringue de 250 μL et une seringue de 50 μL est utilisée pour les volumes inférieurs). Le volume total introduit dans l'échantillon est maintenu à 200 μL en complétant si nécessaire par un ajout de dichlorométhane. Dans le cas où le broyat n'est pas enrichi par les HAP et BTEX un ajout de 100 μL de dichlorométhane est réalisé en plus des 100 μL de la solution étalon interne 3.

Procédure de l'extraction assistée par les ultrasons : méthode UAE/MEPS

Le broyat est mélangé à 25 mL d'éthanol puis le flacon en verre blanc de 125 mL (hauteur 10 cm et diamètre 4,5 cm) contenant ce mélange est à demi-immersé dans le bain à ultrasons (figure 37) à 30 kHz pendant 15 min. Deux températures sont testées pour le bain à ultrason, 0 et 30 °C, et la température de 30 °C est finalement sélectionnée. De même, une comparaison d'extractions assistées par ultrasons (UAE) suivies ou non par une étape de centrifugation est effectuée ; la procédure de centrifugation est conservée.

L'étape de centrifugation consiste à transférer l'échantillon dans des tubes à centrifuger en verre de 35 mL pour être centrifugé à 3000 rpm (environ 1200 g) pendant 10 min à température ambiante. L'extrait est récupéré après une étape de filtration, sur filtre plissé standard en cellulose, de porosité 6 à 10 μm et de diamètre 150 mm (Servilab/LAB-ONLINE®, référence 0601P00024). Cet extrait est conservé au maximum pendant 1 semaine au réfrigérateur (entre 4 et 6 °C).

Procédure de purification par micro-extraction par solide compacté

- Optimisation de la procédure de purification par micro-extraction par solide compacté

La purification de l'échantillon est réalisée avec une seringue MEPS de 250 μL . Deux supports d'extraction sont testés l'un possède un solide compacté de type C18 (phase inverse) et l'autre de type PEP (polar enhanced polymer, copolymère styrène divinylbenzène (PS-DVB) modifié avec des groupements fonctionnels urée). D'après la comparaison de ces deux supports, celui retenu pour réaliser l'étape de purification par MEPS est le PEP.

Des essais consistant à observer l'évolution du signal détecté en fonction d'un volume prélevé en MEPS, compris entre 2x200 et 6x200 μL d'extrait après UAE. Ces essais conduisent à sélectionner le prélèvement de 6x200 μL comme condition optimale d'extraction.

Après avoir chargé l'échantillon sur le support MEPS, plusieurs volumes et solvants sont testés pour réaliser l'élution des analytes. Le dichlorométhane est préféré à l'heptane et au diéthyléther et un volume d'élution de 50 μL est privilégié par rapport à 75 μL pour la récupération des analytes.

1 et 2 μL d'éluat MEPS sont ensuite injectés pour l'analyse en GC-MS ; le volume de 1 μL est finalement retenu pour l'injection.

- Description de la procédure de purification par MEPS dans les conditions optimales

La purification de l'échantillon est réalisée avec une seringue MEPS de 250 μL possédant un solide compacté de type PEP (polar enhanced polymer). La phase stationnaire contenue dans la seringue MEPS est conditionnée en aspirant et en évacuant 200 μL puis 100 μL de dichlorométhane et 200 μL puis 100 μL d'éthanol. Ensuite, 6x200 μL de l'extrait sont aspirés avec la seringue et jetés.

L'élution des HAP est effectuée par aspiration de 50 μL de dichlorométhane qui sont ensuite récupérés dans un micro-insert en verre de 200 μL contenu dans un micro-tube en verre de 1,5 mL. 1 μL de cet éluat est prélevé (méthode des doubles bulles), directement après la purification par MEPS, avec une seringue de 10 μL et injecté manuellement en GC-MS. Enfin, la seringue MEPS est rincée en aspirant et en évacuant 200 μL puis 100 μL de dichlorométhane et 200 μL puis 100 μL d'éthanol (figure 40).

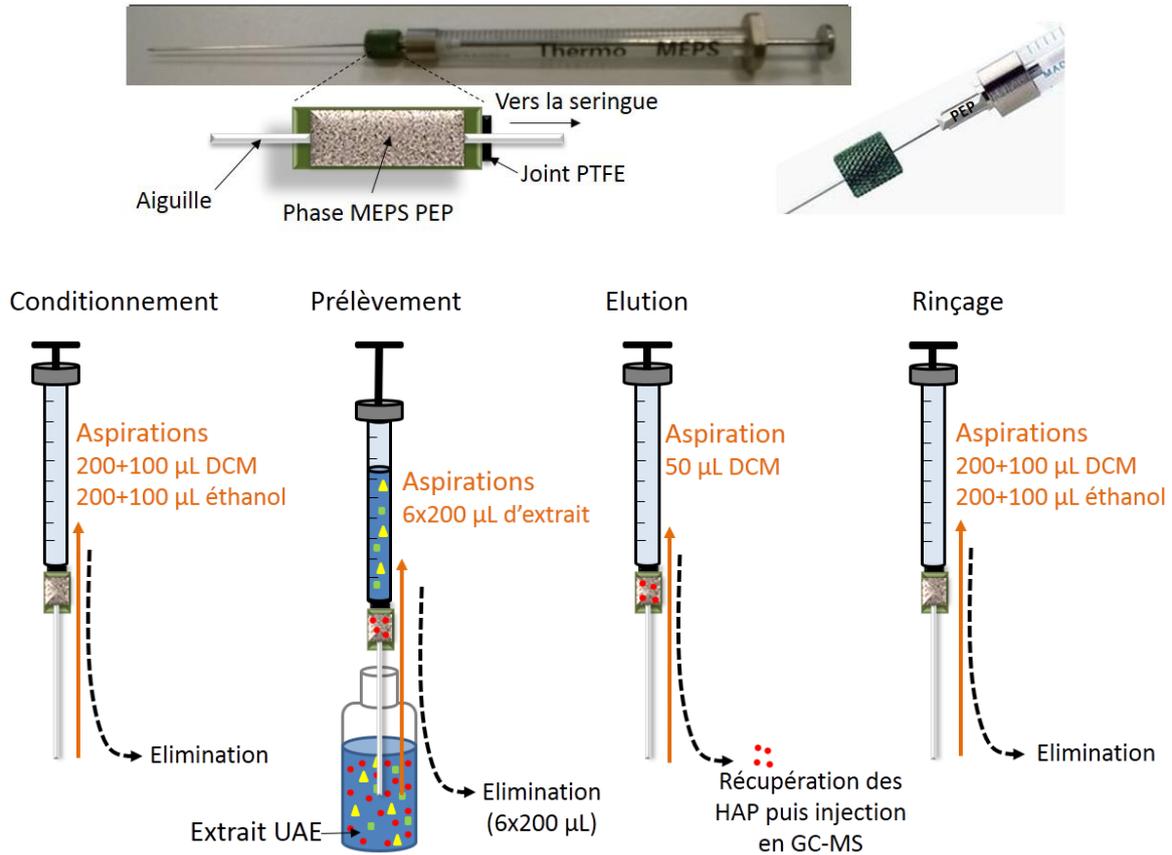


Figure 40 : Schéma de la procédure de purification de l'extrait obtenu après extraction assistée par les ultrasons (UAE) par micro-extraction par solide compacté (MEPS) constitué d'un polymère PEP
DCM : Dichlorométhane

La méthode UAE/MEPS est utilisée pour la détermination des HAP présents dans :

- (i) des pommes (Gala) provenant du supermarché puis additionnées de HAP
- (ii) l'analyse séparée de la peau et de la chair des pommes (Belle de Boskoop) exposées à des fumées issues du brûlage de végétaux (pommes Boskoop)
- (iii) des pommes récoltées en Normandie

3.4. Procédures de décontamination du matériel d'extraction et de la verrerie

3.4.1. Nettoyage de la verrerie

L'ensemble de la verrerie est rincé avec du dichlorométhane puis du méthanol. Ensuite, un nettoyage avec du liquide pour plonge manuelle (ELCO PHARMA) et un rinçage à l'eau du robinet sont effectués. La verrerie est lavée avec un mélange d'Extran® et d'eau du robinet (environ 25 mL d'Extran® pour 5L d'eau) puis rincée à l'eau du robinet. Un bain d'Extran® et d'eau du robinet (environ 25 mL d'Extran® pour 5L d'eau) est réalisé et la verrerie y est placée pour une nuit. Le lendemain, le matériel est rincé à l'eau du robinet puis à l'eau ultrapure.

3.4.2. Nettoyage des capillaires du montage Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifold

Les capillaires et les valves (figure 41) du montage Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco) sont rincés par passage d'environ 2x3 mL de dichlorométhane puis de 2x3 mL de méthanol. Ils sont ensuite retirés du montage et nettoyés avec du liquide pour plonge manuelle (ELCO PHARMA) et rincés à l'eau du robinet. Ils sont nettoyés avec un mélange d'Extran® et d'eau du robinet (environ 25 mL d'Extran® pour 5 L d'eau) puis une nouvelle fois rincés à l'eau du robinet. Les capillaires et les valves sont placés une nuit dans un bain d'Extran® et d'eau du robinet (environ 25 mL d'Extran® pour 5 L d'eau). Le lendemain, ils sont introduits dans un tube à essai contenant de l'Extran® et de l'eau du robinet (environ 25 mL d'Extran® pour 5 L d'eau) qui est placé 10 min dans un bain à ultrasons à température ambiante. Ils sont ensuite rincés à l'eau ultrapure et subissent deux passages de 10 min dans un tube à essai contenant de l'eau ultrapure placé dans un bain à ultrasons. Enfin, ils sont séchés sous flux d'azote.



Figure 41 : Photographie de la partie supérieure du montage Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco) présentant les valves de contrôle du flux ainsi que les capillaires en polytétrafluoroéthylène (PTFE)

3.5. Analyses par GC-MS

3.5.1. Matériel d'analyse (GC-MS)

Les séparations chromatographiques sont réalisées avec un chromatographe en phase gazeuse Shimadzu GC-2010 Plus version GCMS solution 2.72 couplé à un spectromètre de masse quadripolaire QP 2010 (figure 42).



Figure 42 : Chromatographe en phase gazeuse (GC) et spectromètre de masse quadripolaire (qMS) utilisés pour l'analyse des extraits contenant des HAP et des BTEX

L'appareil est équipé d'une colonne capillaire DB5-MS (60 m, 0,25 mm i.d., 0,25 μ m épaisseur de film de phase stationnaire 5%-phényl 95%-méthylpolysiloxane) obtenue auprès de J&W Scientific (Folsom, USA). L'hélium (99,999 %) est utilisé comme gaz vecteur. La détection s'effectue grâce à un spectromètre de masse QP 2010 (Shimadzu Scientific Instruments) utilisant une source d'ionisation électronique (EI) associée à un analyseur quadripolaire.

La température de l'interface entre la GC et le spectromètre de masse (qMS) est maintenue à 300 °C et la température de la source d'ions est à 250 °C.

Une analyse par balayage total des rapports m/z (full scan) est tout d'abord effectuée dans le but d'identifier les HAP et les BTEX grâce à leurs spectres de masses complets. Une détection spécifique d'ion est ensuite réalisée pour chaque composé grâce au mode d'isolement d'ions SIM (single ion monitoring) de l'analyseur de masse.

3.5.2. Procédures analytiques de séparation et de détection en GC-MS

3.5.2.1. Analyse des BTEX et HAP légers

La méthode d'analyse s'inspire de celle décrite par Poinot *et al.* (2014) ; elle était initialement réalisée avec un chromatographe en phase gazeuse Varian 3800 et un spectromètre de masse à trappe ionique Saturn 2000 (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Les extraits sont analysés à présent au moyen du GC-MS Shimadzu décrit en section précédente. Pour les extraits HS-SPME, le flux du gaz vecteur (hélium) est de 1 mL/min. La température de l'injecteur est fixée à 250 °C et les injections sont réalisées sans division (mode splitless) avec un temps d'échantillonnage et de désorption de 5 min. Après cette durée, le rapport de division (split) est fixé à 1/200^{ème}.

Le programme de température du four du chromatographe est présenté en figure 43.

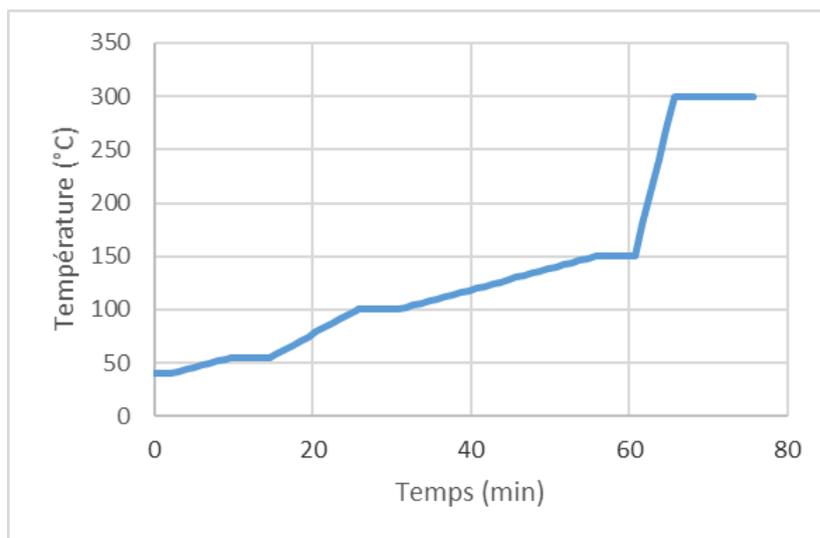


Figure 43 : Programme de température initialement utilisé pour l'analyse des extraits obtenus avec la **méthode HS-SPME 1** en GC-MS

La température initiale du four de 40 °C est maintenue 2 min. La température est ensuite augmentée de 2 °C/min jusqu'à 55 °C, puis de 4 °C/min jusqu'à 100 °C, de 2 °C/min jusqu'à 150 °C et chacune des températures est maintenue pendant 5 min. Enfin la température est augmentée de 30 °C/min jusqu'à 300 °C et cette température finale est conservée 10 min. La durée totale du programme est de 75,75 min. La détection des composés s'effectue par isolement d'ions (mode SIM). Les rapports m/z des ions isolés sont précisés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Rapports m/z des ions isolés en mode SIM pour la détection des BTEX et HAP

Composés	Abbréviation	MM	Rapports m/z des ions isolés (SIM)
Nonane*	No	128	<u>43</u> -57-71-85
Benzène	B	78	<u>78</u> -51
Toluène	T	92	<u>91</u> -92
Ethylbenzène	E	106	<u>91</u> -92-105-106
Ethylbenzène-d10*	E-d10	166	<u>116</u>
<i>m/p</i> -Xylène	<i>m/p</i> -X	106	<u>91</u> -92-105-106
<i>o</i> -Xylène	<i>o</i> -X	106	<u>91</u> -92-105-106
<i>n</i> -Nonadécane*	<i>n</i> -Nd	268	43- <u>57</u> -71-85
Naphtalène	NPH	128	<u>128</u> -102-64-51
Acénaphthylène	ACY	152	51-76- <u>152</u> -153
Acénaphène	ACP	154	51-76-152- <u>153</u>
Acénaphène-d10*	A-d10	164	<u>164</u>
Fluorène	FLR	166	<u>166</u> -165
Phénanthrène	PHN	178	<u>178</u> -176
Anthracène	ANT	178	<u>178</u> -176
Fluoranthène	FA	202	101-200- <u>202</u> -203
Pyrène	PYR	202	101-200- <u>202</u> -203
2-Bromonaphtalène	2-BrN	207	207-44

Benzo(<i>a</i>)anthracène	BaA	228	101-113-114-226- <u>228</u>
Benzo(<i>a</i>)anthracène-d12*	BaA-d12	240	120-236- <u>240</u>
Chrysène	CHR	228	101-113-114-226- <u>228</u>
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	BbFA	252	113-126- <u>252</u>
Benzo(<i>a</i>)pyrène	BaP	252	113-126- <u>252</u>
Indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	IP	276	124-138- <u>276</u>
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	DBahA	278	139- <u>278</u>
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	BghiP	276	124-138- <u>276</u>

* étalon interne

Les rapport m/z sont sélectionnées parmi les ions représentatifs du composé sur le spectre de masse (disponible dans le WebBook de Chimie NIST) obtenu après ionisation électronique. Pour les composés deutérés, les ions sont choisis après une analyse de l'ensemble des ions (mode full SCAN avec balayage des rapports m/z compris entre 35 et 400) du composé pur. Les valeurs soulignées sont celles utilisées pour intégrer l'aire du pic du composé en mode SIM.

L'analyse se divise en 5 segments comme présenté en tableau 20. Pour chaque segment, la durée d'acquisition des ions est de 0,3 seconde.

Tableau 20 : Programme initial des rapports m/z balayés lors de l'analyse des extraits obtenus avec la méthode HS-SPME 1

Segments d'analyse	Rapports m/z des ions sélectionnés	Composés recherchés
0-10 min	Pas d'acquisition en masse	
10-16,5 min	<u>51-78</u>	Benzène
16,5-24 min	<u>91-92</u>	Toluène
24-35 min	<u>91-105-106</u> <u>43-57-71-85</u>	Ethylbenzène, xylènes Nonane
48-55 min	<u>51-64-102-128</u>	Naphtalène
55-75,75 min	<u>152</u> <u>153</u> <u>166</u> <u>178</u> <u>202</u> 44-207	Acénaphthylène Acénaphène Fluorène Phénanthrène, anthracène Fluoranthène, pyrène 2-Bromonaphthalène

Les rapports m/z soulignés sont utilisés pour mesurer l'aire du pic du composé. L'acénaphthylène, l'acénaphène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène et le 2-bromonaphthalène sont recherchés mais ne sont pas détectés avec la méthode HS-SPME 1.

Ces conditions d'analyse sont seulement utilisées pour les extraits obtenus au moyen de la méthode HS-SPME 1. Des modifications ont ensuite été apportées à la méthode en diminuant la température de l'injecteur à 200 °C et en appliquant des temps d'échantillonnage et de désorption d'une minute. Le flux du gaz vecteur (hélium) de 1 mL/min est conservé ainsi que le mode splitless pour les injections.

Le nouveau programme de température du four de la GC est présenté en figure 44.

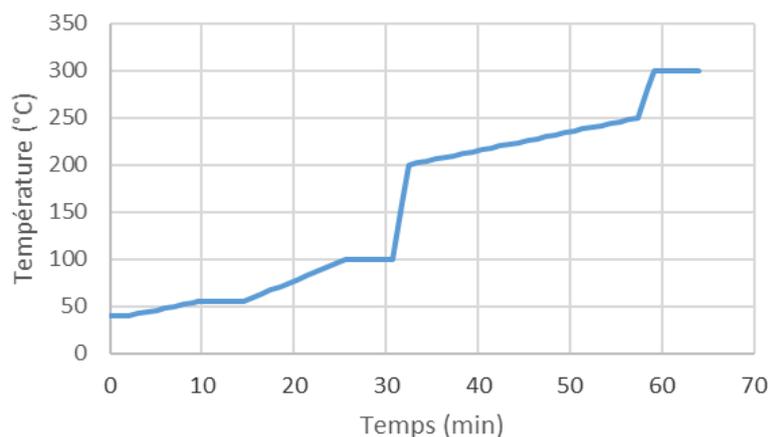


Figure 44 : Programme de température du four de la GC pour l'analyse des extraits obtenus avec les méthodes HS-SPME 1, 2 et 3

La température initiale du four de 40 °C est maintenue 2 min. La température est augmentée de 2 °C/min jusqu'à 55 °C, température qui est conservée 5 min, puis de 4 °C/min jusqu'à 100 °C, température qui est également maintenue pendant 5 min. La température est ensuite augmentée de 60 °C/min jusqu'à 200 °C, de 2 °C/min jusqu'à 250 °C et enfin de 30 °C/min jusqu'à 300 °C. La température finale de 300 °C est maintenue pendant 5 min. La durée totale du programme est 64,08 min. Le filament permettant l'ionisation, et donc la détection, est actionné 11 min après l'injection. La détection des composés s'effectue en mode SIM au moyen des rapports m/z précisés dans le tableau 1.

L'analyse est réalisée en 4 segments. Pour chaque segment, le balayage des rapports m/z , présenté en tableau 21, s'effectue toutes les 0,3 secondes.

Tableau 21 : Programme des rapports m/z balayés lors de l'analyse des extraits obtenus avec les méthodes HS-SPME 1, 2 et 3

Segments d'analyse	Rapports m/z des ions sélectionnés	Composés recherchés
0-11 min	Pas d'acquisition en masse	
11-16,5 min	<u>51-78</u>	Benzène
16,5-22 min	<u>91-92</u>	Toluène
22-32 min	<u>91-105-106</u> <u>43-57-71-85</u>	Ethylbenzène, xylènes Nonane
32-64 min	<u>116</u>	Ethylbenzène-d10
	<u>128</u>	Naphtalène
	<u>152</u>	Acénaphthylène
	<u>153</u>	Acénaphthène
	<u>164</u>	Acénaphthène-d10
	<u>166</u>	Fluorène
	<u>178</u>	Phénanthrène, anthracène
	<u>202</u>	Fluoranthène, pyrène
	<u>228</u>	Benzo(a)anthracène, chrysène
	<u>252</u>	Benzo(b)fluoranthène, benzo(a)pyrène
	<u>276</u>	Indéno(1,2,3-cd)pyrène, benzo(ghi)perylène
<u>278</u>	Dibenzo(ah)anthracène	

Les rapports m/z soulignés sont utilisés pour mesurer l'aire du pic du composé. Le nonane est utilisé comme étalon interne avec la méthode HS-SPME 1. Les composés de masses moléculaires supérieures ou égales à 152 g/mol sont recherchés mais ne sont pas détectés avec la méthode HS-SPME 1. Les valeurs en gras correspondent à l'éthylbenzène-d10 ($m/z = 116$) et l'acénaphthène-d10 ($m/z = 164$), étalons interne qui sont ajoutés lors de l'utilisation des méthodes HS-SPME 2 et 3. Les composés de masses moléculaires supérieures ou égales à 202 g/mol sont recherchés mais ne sont pas détectés avec les méthodes HS-SPME 2 et 3.

Cette méthode d'analyse modifiée est utilisée pour l'ensemble des extraits obtenus avec les méthodes HS-SPME 1, 2, et 3.

3.5.2.2. Procédure de désorption complémentaire pour le conditionnement des fibres avant extraction

Le temps de désorption ayant été réduit de 5 min à 1 min, une procédure de désorption supplémentaire pour le conditionnement des fibres est mise en place. Le but est d'éliminer totalement d'éventuels composés présents sur les fibres avant de procéder à une nouvelle extraction. La fibre HS-SPME, qui a subi une désorption d'une minute (temps de désorption = 1 min) dans l'insert de la GC-MS QP 2010, est ensuite introduite dans l'insert d'un chromatographe en phase gazeuse Varian 3800 (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Pour ce chromatographe, utilisé comme outil de désorption complémentaire, un flux d'azote de 1 mL/min est appliqué sur la fibre placée pour conditionnement dans l'injecteur à 250 °C pendant 30 min.

Avant une première utilisation dans une journée, la fibre est placée dans l'injecteur à 250 °C pendant 10 min, ou 30 min si la fibre a connu plusieurs jours d'inactivité.

3.5.2.3. Analyse des HAP lourds

La méthode d'analyse initialement utilisée est inspirée de celle décrite par Poinot *et al.* (2014) pour les HAP de poids moléculaire moyens et élevés avec un chromatographe en phase gazeuse Varian 3800 et un spectromètre de masse à trappe ionique Saturn 2000 (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Elle est appliquée ici pour des analyses au moyen du GC-MS Shimadzu QP 2010 décrit en section 3.5.1.

L'hélium est utilisé en flux constant de 1,5 mL.min⁻¹ et la température de l'injecteur est fixée à 300 °C. Initialement, 5 µL d'extrait UAE/SPE sont injectés en mode splitless. Ce volume a ensuite été réduit à 1 µL. Le programme de température appliqué à la GC est présenté en figure 45.

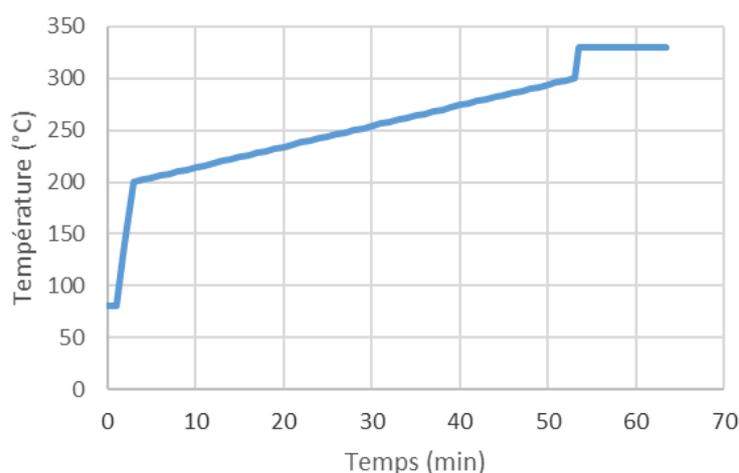


Figure 45 : Programme de température initial de la GC pour l'analyse des extraits obtenus avec la méthode UAE/SPE 1

La température initiale du four de 80 °C est maintenue pendant 1 min, ensuite la température augmente de 60 °C/min jusqu'à 200 °C puis de 2 °C/min jusqu'à 300 °C et enfin de 60

°C//min jusqu'à 330 °C, température qui est maintenue pendant 10 min. Le programme dure au total 63,5 min. Le filament, permettant l'ionisation et donc la détection, est actionné 6,5 min après l'injection. La détection des composés s'effectue en mode SIM avec un balayage des rapports m/z : 57-71-128-153-165-166-178-202-203-207-228-252-276-278 toutes les 0,3 secondes, tout au long de l'analyse. Les composés correspondant aux rapports m/z balayés au cours de l'analyse sont indiqués dans le tableau 19 et les valeurs soulignées correspondant aux ions utilisés pour mesurer l'aire des pics. La méthode permet l'analyse des extraits obtenus avec la méthode UAE/SPE 1 en utilisant le *n*-nonadécane comme étalon interne.

La dernière partie (après 53 min) du programme de température appliqué à la GC a ensuite été modifiée, l'élévation de température de 60 °C/min étant supprimée. La température initiale du four de 80 °C est maintenue pendant 1 min, ensuite la température augmente de 60 °C/min jusqu'à 200 °C puis de 2 °C/min jusqu'à 330 °C. Cette température finale est maintenue pendant 5 min. La programmation, présentée par la figure 46, dure au total 73 min.

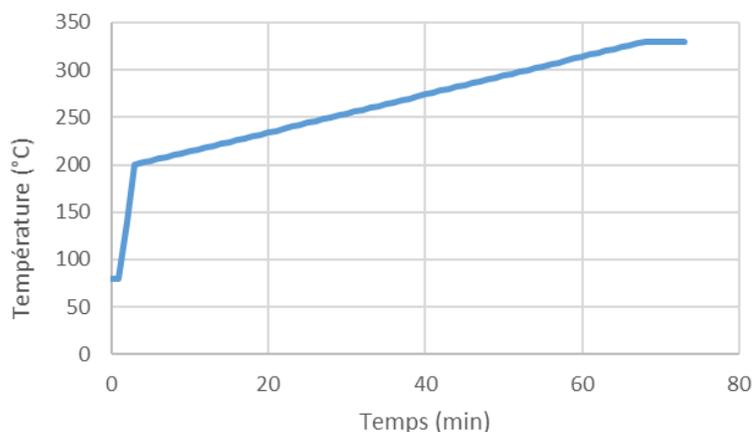


Figure 46 : Programme de température de la GC pour l'analyse des extraits obtenus avec les méthodes UAE/SPE 2 et UAE/MEPS

Le filament, permettant l'ionisation et donc la détection, est allumé 6,5 min après l'injection pour la méthode UAE/SPE 2, et après 8 min pour la méthode UAE/MEPS. Le programme se partage en 5 segments de détection au cours desquels un balayage des rapports m/z , précisé en tableau 22, a lieu toutes les secondes.

Tableau 22 : Programme des rapports m/z balayés lors de l'analyse des extraits obtenus avec les méthodes UAE/SPE 2 et UAE/MEPS

Segments d'analyse	Rapports m/z des ions sélectionnés	Composés recherchés
0-8 min	Pas d'acquisition en masse	
8-16,5 min	91	Toluène, éthylbenzène, xylènes
	<u>128</u>	Naphtalène
	<u>152</u>	Acénaphtylène
	<u>153</u>	Acénaphène
	164	Acénaphène-d10
	<u>166</u>	Fluorène
16,5-21 min	51-76-152-164	Acénaphtylène, acénaphène, acénaphène-d10
	176- <u>178</u>	Phénanthrène, anthracène
21-37 min	101-200- <u>202</u> -203	Fluoranthène, pyrène
37-44 min	101-113-114-226- <u>228</u>	Benzo(<i>a</i>)anthracène, chrysène
	120-236- 240	Benzo(<i>a</i>)anthracène-d12
44-73 min	113-126- <u>252</u>	Banzo(<i>b</i>)fluoranthène, benzo(<i>a</i>)pyrène
	124-138- <u>276</u>	Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène, benzo(<i>ghi</i>)perylène
	139- <u>278</u>	Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène

Les rapports m/z soulignés sont utilisés pour mesurer l'aire du pic du composé. Les valeurs en gras correspondent à l'acénaphène-d10 ($m/z = 164$) et au benzo(*a*)anthracène-d12 ($m/z = 240$), étalons interne ajoutés lors de l'utilisation des méthodes UAE/SPE 2 et UAE/MEPS. Le toluène, l'éthylbenzène, les xylènes et le naphtalène sont recherchés mais ne sont pas détectés avec les méthodes UAE/SPE 2 et UAE/MEPS.

La méthode d'analyse est appliquée aux extraits obtenus avec les méthodes UAE/SPE 2 et UAE/MEPS.

3.5.2.4. Programme complémentaire pour l'élimination de résidus avant et après analyse par GC-MS

Avant et après chacune des analyses par GC-MS, un programme, visant à éliminer d'éventuels résidus de HAP et BTEX, est appliqué. La température de départ du four est de 80 °C puis la température est augmentée de 30 °C/min jusqu'à 270 °C, cette température est ensuite maintenue pendant 5 min. La programmation dure 11,33 min avec un débit de 0,82 mL/min pour le gaz vecteur (hélium). La température de l'injecteur dépend des analyses en cours, 200 °C dans le cas de la HS-SPME et 300 °C avant et entre les analyses d'extraits liquides (UAE/SPE ou UAE/MEPS).

3.5.2.5. Vérification des séparations chromatographiques

Calcul du facteur d'asymétrie des pics chromatographiques

La qualité des pics chromatographiques est estimée au moyen du calcul d'un facteur d'asymétrie. Pour ce calcul, une droite verticale passant par le sommet du pic chromatographique au temps de rétention du composé est tracée. Une droite horizontale à 10% de la hauteur du pic est également tracée. Puis, à l'intersection de ces droites, le temps correspondant à la partie droite de la verticale (a) est rapporté à celui de la partie à gauche de la verticale (b) (figure 47).

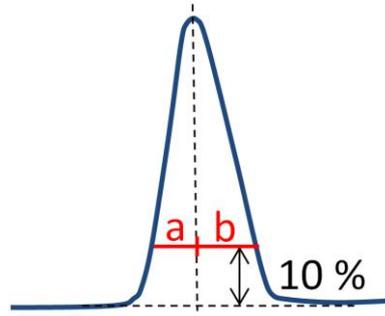


Figure 47 : Calcul du facteur d'asymétrie

Calcul de l'efficacité des pics chromatographiques

De plus, l'efficacité des pics chromatographiques (N) est estimée d'après l'équation suivante :

$$N=5,54 (t_R/\delta)^2$$

Avec : t_R le temps de rétention et δ la largeur du pic à mi-hauteur

Calcul d'une résolution entre pics chromatographiques (R)

Une résolution (R) est déterminée entre deux pics chromatographiques d'après la formule :

$$R=2(t_{R2}-t_{R1})/(\omega_1+\omega_2)$$

Avec : t_R le temps de rétention et ω la largeur prise à 10 % de la hauteur du pic* ; t_{R1} et ω_1 attribués au pic ayant le temps de rétention le plus faible ; t_{R2} et ω_2 au pic ayant le temps de rétention le plus élevé.

* la largeur prise à 10% de la hauteur du pic a été préférée à la mesure de largeurs à mi-hauteur et de largeurs à la base en raison (i) d'épaulements survenant aux alentours de la mi-hauteur de certains pics et (ii) de l'impossibilité de retour à la ligne de base pour certains pics (liée à la détection en mode SIM)

3.6. Validation des méthodes

Pour chaque BTEX et HAP, l'aire du pic de l'ion sélectionné pour la détection est rapportée à l'aire du pic de l'étalon interne permettant ainsi d'obtenir leur aire relative. Les droites d'étalonnage représentent l'aire relative du composé en fonction de sa concentration massique rapportée à l'échantillon en $\mu\text{g}/\text{kg}$. Les résultats des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont analysés sur la base de répliqués en aires relatives.

Le tableau 23 indique l'étalon interne référent pour chaque groupe de composés en fonction de la méthode d'extraction utilisée.

Tableau 23 : Etalons interne utilisés pour chaque méthode d'extraction

Composés	HS-SPME 1	HS-SPME 2	HS-SPME 3	UAE/SPE 1	UAE/SPE 2	UAE/MEPS
BTEX	No	E-d10	E-d10	-	-	-
HAP légers	No ^a	A-d10	A-d10	<i>n</i> -Nd	-	A-d10
HAP lourds	-	-	-	<i>n</i> -Nd	BaA-d12	BaA-d12

No : nonane, E-d10 : éthylbenzène-d10, A-d10 : acénaphthène-d10, *n*-Nd : *n*-nonadécane, BaA-d12 : benzo(*a*)anthracène-d12

^a La méthode HS-SPME 1 permet l'analyse d'un seul HAP léger : le naphthalène

Les BTEX sont le benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes. Les HAP légers sont les composés de masse moléculaire inférieure ou égale à 178 g/mol. Les HAP lourds ont une masse moléculaire supérieure ou égale à 202 g/mol (les masses moléculaires sont indiquées dans le tableau 1).

3.6.1. Linéarité et justesse : gammes d'étalonnage

Les gammes d'étalonnage sont réalisées en utilisant différents volumes (précisés en section 3.3.2) des solutions de travail contenant les HAP et BTEX (solution HAP/BTEX 1 et 2) pour obtenir une gamme en hydrocarbures aromatiques comprise entre 0 et 10 µg/kg en poids humide. 6 points d'étalonnage (0 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 µg/kg) sont réalisés, chacun en triple.

Des points entre 0,2 et 2 µg/kg (0,2 ; 0,5 ; 1 et 2 µg/kg) sont effectués (en HS-SPME avec la fibre PDMS 100 µm et en UAE/MEPS) grâce à des volumes croissants (10 à 100 µL) de la solution HAP/BTEX 3. Ces points sont également réalisés en triplicat.

Une régression linéaire est appliquée aux courbes représentant l'aire relative en fonction de la concentration en hydrocarbures aromatiques. Les pentes servent à quantifier la présence dans les fruits. La linéarité des courbes d'étalonnage est estimée grâce au coefficient de détermination (R^2) de la régression linéaire.

3.6.2. Fidélité : tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire

Les tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont effectués sur des fruits additionnés de BTEX et de HAP à 4 µg/kg. Ces tests font intervenir le coefficient de variation (CV) qui correspond à l'écart type d'une série de mesures (en aires relatives) rapporté à sa moyenne.

La répétabilité est estimée grâce au CV calculé à partir des mesures effectuées le même jour. 3 mesures par jour sont réalisées (n=3) sauf pour la méthode HS-SPME 2 avec 4 répétitions par jour (n=4).

La fidélité intermédiaire est évaluée par la détermination du CV sur les réplicats réalisés chaque jour pendant 3 jours. 3 extraits par jour pendant 3 jours sont analysés (n=9) excepté avec la méthode HS-SPME 2 pour laquelle le contenu de 4 extraits est déterminé chaque jour pendant 3 jours (n=12).

3.6.3. Sensibilité : limites de détection et de quantification (LOD et LOQ)

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont déterminées conformément au recueil international des méthodes d'analyse (Résolution Oeno 7/2000). Les limites sont respectivement décrites comme suit :

$$\text{LOD}=3 \times R \times h$$

$$\text{LOQ}=10 \times R \times h$$

Le logiciel Shimadzu GCMS solution version 2.72 permet de déterminer la hauteur du signal pour chaque point d'étalonnage ainsi que la hauteur moyenne du bruit de fond autour du pic d'intérêt (h). Le facteur de réponse quantité/signal (R) correspond à la pente de la régression linéaire de la concentration en hydrocarbures aromatiques en fonction de la hauteur du signal.

3.6.4. Analyses statistiques des données

La cohérence entre les droites d'étalonnage est étudiée au moyen des pentes, obtenues à partir des méthodes UAE/SPE 2 et HS-SPME 2 pour la pomme, la poire, la prune et le raisin. Les données sont traitées avec le logiciel STATGRAPHICS Centurion, version XVII (Statpoint

Technologies, Inc). Pour chaque HAP et BTEX, les valeurs des pentes ($n=3$) sont comparées entre les quatre fruits. L'analyse de la variance (ANOVA) permet la comparaison des moyennes des 3 valeurs de pentes. L'absence de différence significative entre les moyennes des pentes est ensuite indiquée par le test HSD (honest significant difference) de Tukey à un niveau de confiance de 95%.

3.7. Tests d'utilisation des méthodologies d'extraction

3.7.1. Détermination du taux de récupération après micro-extraction par solide compacté

Le taux de récupération est déterminé pour la procédure MEPS et consiste à comparer :

- les aires relatives d'un extrait purifié et concentré d'un facteur 24 par MEPS ; l'extrait est obtenu par UAE partir d'une pomme, il est supplémenté d'un équivalent à 4 $\mu\text{g/L}$ en HAP (voir procédure ci-après)
- aux aires relatives obtenues lors de l'injection directe d'une solution dont la concentration (96 $\mu\text{g/L}$) correspond à celle qui doit être retrouvée dans l'éluat si la totalité des analytes sont récupérés après MEPS.

4 extraits purifiés sont analysés puis les résultats sont comparés (extrait par extrait) à ceux des 4 injections directes.

Pour obtenir l'extrait en UAE/MEPS, la procédure utilise 20 g de pomme broyée complétés par de 25 mL d'éthanol. Le flacon en verre blanc de 125 mL (hauteur 10 cm et diamètre 4,5 cm) contenant ce mélange est à demi-immersé dans le bain à ultrasons (figure 37) à 30 kHz et 30 °C pendant 15 min. L'échantillon est ensuite transféré dans des tubes à centrifuger en verre de 35 mL pour être centrifugé à 3000 rpm (environ 1200 g) pendant 10 min à température ambiante. Le broyat est éliminé par une étape de filtration, sur filtre plissé standard en cellulose, de porosité 6 à 10 μm et de diamètre 150 mm (Servilab/LAB-ONLINE®).

L'extrait liquide récupéré est placé dans une fiole jaugée de 25 mL et additionné de 50 μL de dichlorométhane et de 50 μL de solution HAP/BTEX 1 (à 2 mg/L). Le volume est ajusté à 25 mL par complémentation avec de l'éthanol.

6 x 200 μL de cet extrait sont aspirés puis éliminés au moyen de la seringue MEPS contenant le support de type PEP. Les composés retenus sur la phase stationnaire PEP de la seringue MEPS sont élués avec 50 μL de dichlorométhane. 40 μL de l'éluat sont prélevés et additionnés de 10 μL de solution étalon interne 4 contenant du benzo(a)anthracène-d12 et de l'acénaphthène-d10 chacun en solution à 0,02 g/L dans le dichlorométhane. 1 μL de ce mélange est injecté en GC-MS et 4 déterminations sont réalisées.

Le taux de récupération est calculé en rapportant les résultats (en aires relatives) de l'analyse de cet extrait à ceux obtenus lors de l'injection directe d'1 μL d'un mélange contenant 40 μL d'une solution de HAP à 96 $\mu\text{g/L}$ (préparée avec 240 μL de la solution HAP/BTEX 1 placée dans une fiole de 5 mL complétée avec du dichlorométhane) et 10 μL de la solution étalon interne 4. La solution en injection directe est analysée à 4 reprises.

3.7.2. Vérification de l'addition de HAP à une pomme entière

Une pomme de 60 g est prélevée sur le site de l'IUT. L'un des côtés de cette pomme est percé d'un trou de diamètre 1 mm pour atteindre le milieu de la chair puis 50 μ L d'une solution de HAP à 1,6 mg/L (préparée avec 4 μ L de la solution commerciale de HAP à 2000 μ g/mL dans 5 mL d'éthanol) sont introduits dans l'orifice. La pomme est placée sous une hotte aspirante à température ambiante pendant 1 h. La pomme est ensuite séparée en 2 moitiés, l'une (moitié a, figure 48) contenant la solution de HAP, et l'autre (moitié b, figure 48) n'ayant pas été en contact avec la solution de HAP.

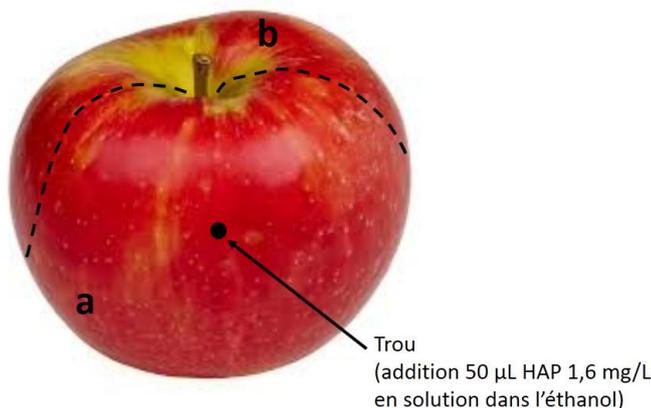


Figure 48 : Illustration de la procédure d'addition de HAP à une pomme entière

a : moitié de la pomme contenant la solution de HAP, b : moitié de la pomme n'ayant pas été en contact avec les HAP

Les deux moitiés de pomme sont débarrassées du trognon et broyées séparément afin de subir chacune une étape d'UAE suivie d'une purification en MEPS. Pour chaque moitié, 20 g de broyat sont prélevés puis additionnés de 100 μ L de dichlorométhane et 100 μ L de solution étalon interne 3. Chaque broyat est placé dans un flacon en verre blanc de 125 mL (hauteur 10 cm et diamètre 4,5 cm) et mélangé à 25 mL d'éthanol. Les flacons sont à demi-immergés dans un bain à ultrasons à 30 kHz et 30 °C pendant 15 min. Les deux échantillons sont ensuite transférés dans des tubes en verre distincts de 35 mL pour être centrifugés à 3000 rpm (environ 1200 g) pendant 10 min à température ambiante. Les extraits issus de chaque moitié de pomme sont ensuite récupérés après une étape de filtration, sur filtre plissé standard en cellulose, de porosité 6 à 10 μ m et de diamètre 150 mm (Servilab/LAB-ONLINE®, référence 0601P00024).

Des procédures distinctes de MEPS sont mises en œuvre pour la purification des deux extraits. Cette procédure consiste à aspirer puis jeter 6x200 μ L d'un extrait avec la seringue MEPS possédant un solide compacté de type PEP (polar enhanced polymer). Les HAP sont élués par aspiration de 50 μ L de dichlorométhane. L'éluat est récupéré dans un micro-insert en verre de 200 μ L contenu dans un micro-tube en verre de 1,5 mL. 1 μ L de cet éluat est prélevé (méthode des doubles bulles), directement après la purification par MEPS, avec une seringue de 10 μ L et injecté manuellement en GC-MS.

L'analyse de la moitié de pomme qui contenait la solution de HAP est ensuite comparée à celle de la moitié n'ayant pas été en contact avec les HAP.

3.7.3. Essais de conservation des échantillons et des extraits

3.7.3.1. Congélation de broyats de pomme additionnés de BTEX en vue d'une extraction ultérieure en HS-SPME

20 g de broyat de pomme sont additionnés de 40 μL de la solution HAP/BTEX 1. Trois échantillons ainsi préparés sont soumis à différentes conditions de conservation :

- Un échantillon est complété avec 60 μL de dichlorométhane et additionné de 10 μL de la solution étalon interne 1 avant d'être soumis à l'extraction en HS-SPME puis est analysé le jour même
- Un échantillon est conservé pendant 6 semaines au congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Après décongélation, l'ajout de 10 μL de la solution étalon interne 1 ainsi que la complémentation avec 60 μL de dichlorométhane sont réalisés le jour de l'extraction HS-SPME
- Un échantillon complété avec 60 μL de dichlorométhane et additionné de 10 μL de la solution étalon interne 1 est conservé pendant 6 semaines au congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Les échantillons conservés au congélateur sont placés dans des flacons en verre blanc de 125 mL (hauteur 10 cm et diamètre 4,5 cm) choisis pour leur embouchure large, facilitant la récupération du broyat. Avant congélation, l'air contenu dans le volume vide est chassé par un passage sous flux d'azote.

Les extraits conservés 6 semaines au congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sont laissés au moins 15 min à température ambiante avant l'application de la procédure d'extraction en HS-SPME.

Les 20 g de broyat de pomme sont placés dans un flacon en verre ambré de 125 mL contenant un barreau aimanté. Le flacon est ensuite à demi-immersé dans un bain marie d'eau distillée à 60°C (figure 37). Une agitation constante (750 tours par min, 50% de la vitesse maximum de l'agitateur) est maintenue tout au long de l'extraction. Après 15 min d'équilibre, une fibre, possédant un revêtement mixte CAR/PDMS (carboxen/polydiméthylsiloxane) de 75 μm , est exposée 45 min à environ 5 cm au-dessus de l'échantillon dans l'espace gazeux dont le volume est estimé à environ 75 cm^3 . La fibre est ensuite placée manuellement dans l'insert de la GC-MS pour désorption.

3.7.3.2. Réfrigération de l'extrait après extraction assistée par les ultrasons en vue d'une purification ultérieure par micro-extraction par solide compacté

20 g de broyat de pomme sont additionnés de 40 μL de solution HAP/BTEX 1, de 60 μL de dichlorométhane et de 100 μL de solution étalon interne 3 (sans acénaphthène-d10). Le broyat ainsi additionné de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en HAP est placé dans un flacon de 25 mL en verre blanc de 125 mL (hauteur 10 cm et diamètre 4,5 cm) avec 25 mL d'éthanol. Le flacon est à demi-immersé dans le bain à ultrasons à 30 kHz et $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 15 min. L'échantillon est ensuite transféré dans des tubes en verre de 35 mL pour être centrifugé à 3000 rpm (environ 1200 g) pendant

10 min à température ambiante puis le broyat est éliminé par filtration (filtre plissé standard en cellulose, de porosité 6 à 10 μm et de diamètre 150 mm).

3 extraits sont ainsi préparés puis soumis à différentes conditions de conservation :

- Un extrait UAE est purifié en MEPS immédiatement après l'extraction puis analysé le même jour
- Un extrait UAE est placé pendant 1 week-end au réfrigérateur (entre 2 et 6 °C)
- Un extrait UAE est placé pendant 1 semaine au réfrigérateur (entre 2 et 6 °C)

Les extraits conservés 1 week-end ou une semaine au réfrigérateur entre 2 et 6 °C sont laissés environ 15 min à température ambiante avant l'application de la procédure de purification en MEPS.

La procédure de MEPS consiste à aspirer et éliminer 5x150 μL d'extrait avec une seringue MEPS contenant un sorbant PEP. L'élution des HAP est ensuite réalisée par aspiration de 50 μL de dichlorométhane et récupération de l'éluat dans un micro-insert en verre de 200 μL contenu dans un micro-tube en verre de 1,5 mL. 1 μL de cet éluat est prélevé (méthode des doubles bulles), directement après la purification par MEPS, avec une seringue de 10 μL et injecté manuellement en GC-MS.

Chapitre 4 : Hydrocarbures Aromatiques Monocycliques

Partie 4.1 : Approches méthodologiques pour la détermination des hydrocarbures aromatiques monocycliques dans des matrices fruitières

Chapitre 4 : Hydrocarbures Aromatiques Monocycliques

La première partie de ce chapitre sur les hydrocarbures aromatiques monocycliques (section 4.1, page 150) est consacrée aux méthodologies mises en œuvre pour la détermination des BTEX dans les matrices fruitières. Dans la seconde partie de ce chapitre (section 4.2, page 187), les méthodologies sont appliquées à la détermination des hydrocarbures aromatiques monocycliques dans des pommes récoltées en Normandie, dans des fruits du commerce et pour des fruits exposés à des gaz d'échappement de moteur diesel et à des fumées de combustion de végétaux.

Partie 4.1 : Approches méthodologiques pour la détermination des hydrocarbures aromatiques monocycliques dans des matrices fruitières

Plusieurs approches méthodologiques ont été mises en œuvre lors de ce travail pour la détermination des hydrocarbures aromatiques monocycliques (BTEX) dans les fruits. Dans cette partie, les choix de méthodes d'extraction et d'analyse vont tout d'abord être expliqués (section 4.1.1). La technique d'extraction sélectionnée, la micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME), est ensuite optimisée. Les différents paramètres de désorption de la fibre CAR/PDMS utilisée en HS-SPME sont notamment modifiés dans le but d'éliminer les analytes retenus sur la fibre au cours de l'extraction et d'obtenir des pics gaussiens et résolus lors de la séparation par GC-MS (sections 4.1.2 et 4.1.3).

Afin de réduire les variabilités induites par la procédure d'extraction et par l'injection mais aussi de permettre la quantification des BTEX, un étalon interne est utilisé. Deux composés sont ainsi testés comme étalon interne, le nonane et l'éthylbenzène-d10. Le nonane est utilisé comme étalon interne pour la méthode HS-SPME 1, la validation de la méthodologie sera vue en section 4.1.4. Les résultats des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire ainsi que les gammes d'étalonnage, les limites de détection et de quantification sont présentés pour la pomme et la poire comme modèles de fruit. Les mêmes critères seront validés pour la méthode HS-SPME 2, utilisant l'éthylbenzène-d10 comme étalon interne (section 4.1.5). Ces critères seront étudiés et comparés pour diverses matrices fruitières (pomme, poire, prune et raisin).

Un revêtement supplémentaire de fibres pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques monocycliques par HS-SPME est également expérimenté, il correspond à un polymère de type « polydiméthylsiloxane » (PDMS) dont deux épaisseurs différentes 30 et 100 µm seront testées (section 4.1.6).

Les méthodes HS-SPME sont dans un premier temps validées avec la pomme comme matrice extraite. Les résultats des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire ainsi que les gammes d'étalonnage, les limites de détection et de quantification sont donc présentés pour ce fruit. Les méthodes sont ensuite validées pour d'autres matrices fruitières (la poire, la prune et le raisin). Les performances des différentes méthodologies optimisées sont finalement comparées (section 4.1.7).

4.1.1. Choix des méthodologies d'extraction, de séparation et de détection pour les hydrocarbures aromatiques monocycliques

4.1.1.1. Choix de la méthodologie d'extraction pour les hydrocarbures aromatiques monocycliques

Les méthodologies mises en œuvre lors de l'extraction des hydrocarbures aromatiques monocycliques sont principalement des techniques utilisant un support d'extraction miniaturisé, telles que l'extraction dynamique en phase solide (SPDE), l'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE) ou la micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME).

Les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes) sont des composés très volatils (température d'ébullition entre 80 et 150°C). Très hydrophobes, les hydrocarbures aromatiques monocycliques présentent une nature chimique différente de la matrice aqueuse (fruits) dans laquelle ils sont susceptibles d'être contenus. Ces caractéristiques associées à la très faible proportion en composés hydrophobes (tels que les lipides) dans les fruits favorise la libération des BTEX par évaporation.

L'utilisation de l'espace gazeux permet d'éviter le contact direct avec la matrice et minimise la récupération de composés non volatils présents dans l'échantillon (fruit). L'un des inconvénients mentionné pour la SPME, par rapport à la SBSE par exemple, est la faible épaisseur du revêtement. Néanmoins, les BTEX étant présents en faibles concentrations dans les échantillons de fruits, la capacité d'extraction du support SPME ne devrait pas s'avérer être un facteur limitant au cours de cette étude. De plus, des travaux préliminaires menés au laboratoire indiquent que la HS-SPME appliquée pour une durée de 45 min à 60 °C constitue une méthode d'extraction performante pour la récupération des BTEX dans des échantillons de pomme (Poinot, 2014). Cette technique et ces conditions d'extraction sont donc sélectionnées pour extraire les BTEX des fruits ciblés dans le cadre de ce travail (pomme, poire, prune et raisin).

4.1.1.2. Choix du revêtement du support d'extraction en HS-SPME

L'extraction des analytes est dépendante de l'épaisseur et du type de revêtement de la fibre SPME (Doong, 2000 ; King, 2003 ; Purcaro 2013 ; Ridgway 2007a). Les fibres ayant un revêtement fin permettent l'adsorption des composés semi-volatils tandis que les revêtements plus épais sont généralement utilisés pour l'extraction des composés volatils (Kataoka, 2000 ; King, 2003). Les procédures d'extraction en phase solide réalisées dans l'espace de tête utilisent généralement des supports avec un revêtement polydiméthylsiloxane (PDMS) seul ou associé au carboxen (CAR/PDMS), pour la récupération des BTEX. Un revêtement PDMS (d'épaisseur 100 µm) est également utilisé en HS-SPME pour l'extraction des BTEX à partir d'échantillon aqueux (Menéndez, 2000). La HS-SPME est appliquée à l'extraction des BTEX à partir d'échantillon de sol grâce à un revêtement de fibre de type CAR/PDMS (d'épaisseur 75 µm) (Ezquerro, 2004). L'étude préliminaire réalisée au laboratoire a également permis de déterminer que le revêtement CAR/PDMS (d'épaisseur 75 µm) est plus adapté, à l'extraction en HS-SPME des BTEX à partir d'échantillons de pomme, que le revêtement polydiméthylsiloxane/divinylbenzène (PDMS/DVB, d'épaisseur 65 µm) (Poinot, 2014).

D'après l'ensemble de ces données, deux types de fibres, l'une ayant un revêtement mixte CAR/PDMS de 75 μm d'épaisseur et l'autre un revêtement PDMS de 100 μm d'épaisseur, sont sélectionnées dans le cadre de la détermination des BTEX dans les fruits ciblés par ce travail.

4.1.1.3. Choix de la méthode séparative et de la phase stationnaire

Bien que la séparation des hydrocarbures aromatiques monocycliques par chromatographie liquide à hautes performances (HPLC) ait été décrite dans la littérature, la chromatographie en phase gazeuse (GC) reste la méthode chromatographique la plus fréquemment utilisée pour ces composés. La GC apporte notamment une meilleure résolution et une sensibilité plus importante que l'HPLC (Campos-Candel, 2009). De plus, la GC est une technologie particulièrement adaptée à l'analyse des composés très volatils que sont les BTEX.

Les principales phases stationnaires utilisées pour la séparation des hydrocarbures aromatiques monocycliques sont apolaires en raison du caractère hydrophobe de ces composés. La colonne la plus utilisée pour la séparation des BTEX possède une phase stationnaire composée de 5% phényl-95% méthylpolysiloxane (type DB 5 ou équivalent) (Gilbert-López, 2010 ; Górna-Binkul, 1996 ; Menéndez, 2000 ; Poinot, 2014). Ce type de colonne permet une séparation sur une phase stationnaire de polarité relativement similaire à celle des BTEX. Cette phase stationnaire utilisée dans les premiers travaux sur la pomme (Poinot, 2014) est donc conservée pour réaliser l'étude des BTEX dans diverses matrices fruitières.

4.1.1.4. Choix de la méthode de détection

Les principaux détecteurs couplés à la chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des BTEX sont le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le spectromètre de masse (MS). Le FID est, par exemple, utilisé pour la détection des BTEX dans des échantillons de sol et d'eau (Babanezhad, 2012 ; Ezquerro, 2004 ; Menéndez, 2000).

La spectrométrie de masse, notamment appliquée à la détection des BTEX dans des extraits de fruits, de légumes, d'olive et d'huile d'olive, de boissons ainsi que d'exsudats de viande offre une meilleure sélectivité et sensibilité que le FID (Benet, 2015 ; Gilbert-López, 2010 ; Górna-Binkul, 1996 ; Ridgway, 2007b). La détection par spectrométrie de masse est donc choisie pour l'analyse des BTEX dans les fruits sélectionnés pour cette étude.

L'étude de Poinot *et al.* réalisée au laboratoire utilise un appareillage de GC-MS équipé d'un analyseur de type trappe ionique Saturn 2000 (Agilent Technologies) pour la détermination des BTEX dans les échantillons de pomme. La trappe ionique (itMS) permet l'obtention de spectres de masse complets mais la gamme de masse est limitée aux ions de faibles masses moléculaires. Cet analyseur présente, de plus, une perte de résolution pour les gammes d'étalonnage dépassant deux décades et une perte de la moitié des ions lors de la détection. Un analyseur de masse quadripolaire (qMS) est donc préféré pour la détection des BTEX dans cette étude.

4.1.1.5. Application des méthodologies à la séparation et à la détection des hydrocarbures aromatiques monocycliques

Les méthodes de séparation et de détection sont testées grâce à l'injection directe de BTEX en solution dans du dichlorométhane. L'injection directe permet notamment d'apprécier la résolution des pics (figure 49).

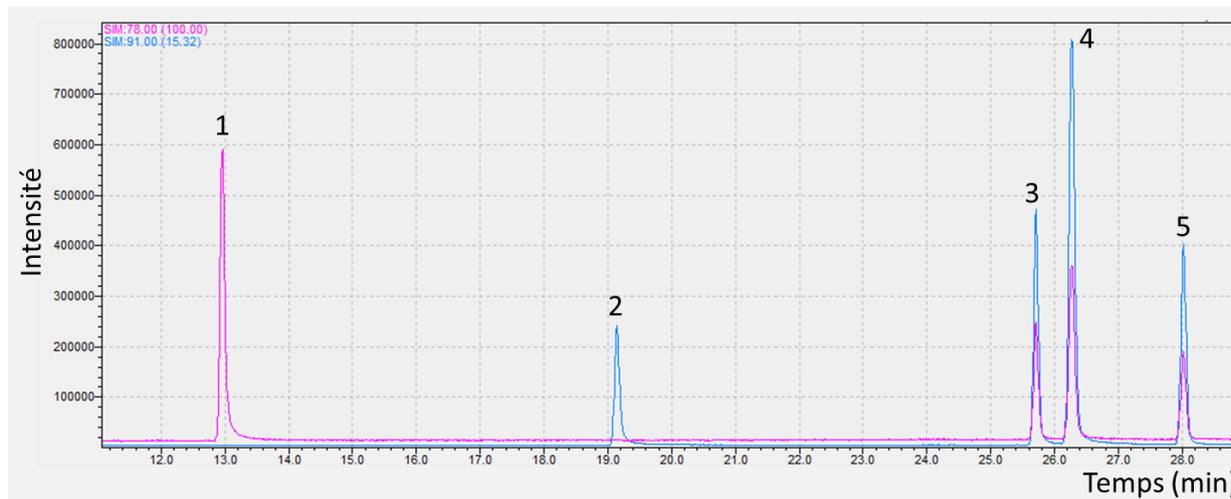


Figure 49 : Chromatogramme obtenu (entre 11 et 27 min) en GC-qMS après injection directe d'une solution de BTEX à 10 µg/L

Présentation des ions de rapports $m/z=78$ et 91

1 : benzène, 2 : toluène, 3 : éthylbenzène, 4 : *m/p*-xylènes, 5 : *o*-xylène

Les conditions de séparation sont précisées dans la section 3.5.2.1 du chapitre 3

La programmation de température permet la bonne séparation des pics des BTEX. Cependant, les conditions de séparation (colonne DB 5ms) et de détection (GC-qMS) ne permettent pas de différencier les isomères *m*- et *p*-xylène qui possèdent un spectre de masse très proche. Dans les divers travaux sur les BTEX disponibles dans la littérature et utilisant une colonne chromatographique de phase stationnaire 5% phényl-95% méthylpolysiloxane (de type DB-5ms), ces deux isomères sont généralement co-élus (Gilbert-López, 2010 ; Góna-Binkul, 1996 ; Menéndez, 2000). Cette co-élution s'explique par les températures d'ébullition très proches pour le *m*- et le *p*-xylène avec respectivement 139,1 °C et 138,2 °C. En ce qui concerne l'*o*-xylène, sa température d'ébullition plus élevée 144,4 °C permet de le différencier et sa détection se fait indépendamment des deux autres.

La sensibilité de la détection est améliorée par l'utilisation du mode de sélection d'ions (SIM : single ion monitoring) disponible pour l'analyseur de masse quadripolaire utilisé. Le mode SIM limite la détection à certains ions (ratios masse/charge) préalablement sélectionnés et non à une détection de l'ensemble des spectres de masse. La détection sélective en MS avec le mode SIM permet d'éviter la détection de composés issus de la matrice et éventuellement co-élus à ceux des analytes. Néanmoins, le gain en sensibilité peut être amoindri par la multiplication des ions détectés. En mode SIM, l'ensemble des rapports masses/charges des ions sélectionnés sont balayés dans un temps donné. Le temps consacré à chaque ion diminue avec l'augmentation du nombre d'ions sélectionnés, induisant ainsi une perte de sensibilité. Afin de pallier ce problème, la détection est divisée en plusieurs segments de temps

comportant chacun un nombre limité d'ions à balayer. Des segments sont créés pour la détection des BTEX (tableau 20, section 3.5.2.1, page 143). L'ensemble des ions composant le spectre de masse d'un composé n'est pas utilisé pour la détection en masse. Pour un composé donné entre 1 et 4 ions (rapports m/z) sont sélectionnés parmi les ions majoritaires du spectre de masse. Le benzène est par exemple le seul composé recherché dans le segment s'étendant de 11 à 16,5 minutes et deux ions ($m/z=51$ et 78), dont l'ion majoritaire ($m/z=78$), sont utilisés pour permettre de détecter sa présence.

4.1.2. Optimisation de la procédure de désorption de la fibre après extraction en HS-SPME

Lors de la précédente étude menée au laboratoire, les conditions optimales d'extraction des BTEX ont été déterminées pour des concentrations de l'ordre du mg/kg dans la pomme (Poinot, 2014). La procédure de désorption mise en place consiste à placer la fibre pendant 5 min dans l'insert de la GC-MS à 250°C. Les paramètres ensuite appliqués pour l'analyse en GC-MS sont décrits dans la section 3.5.2.1 (chapitre 3, page 138).

Dans un premier temps, la fibre CAR/PDMS (d'épaisseur 75 μm ayant servi pour les extractions de BTEX au mg/kg dans la pomme) ainsi que les conditions d'extraction et d'analyse sont directement transposées au nouvel appareil de GC-MS Shimadzu QP 2010 acquis par le laboratoire.

Les premières analyses, ayant consisté à réaliser des blancs en exposant la fibre au-dessus d'un échantillon de pomme du commerce non additionné d'hydrocarbures aromatiques, révèlent d'importants pics correspondant aux BTEX. A la suite de simples désorptions des fibres (sans échantillon) dans l'insert du GC-MS, une présence des BTEX est également détectée, indiquant une présence résiduelle liée à une contamination croisée entre extractions. (figure 50).

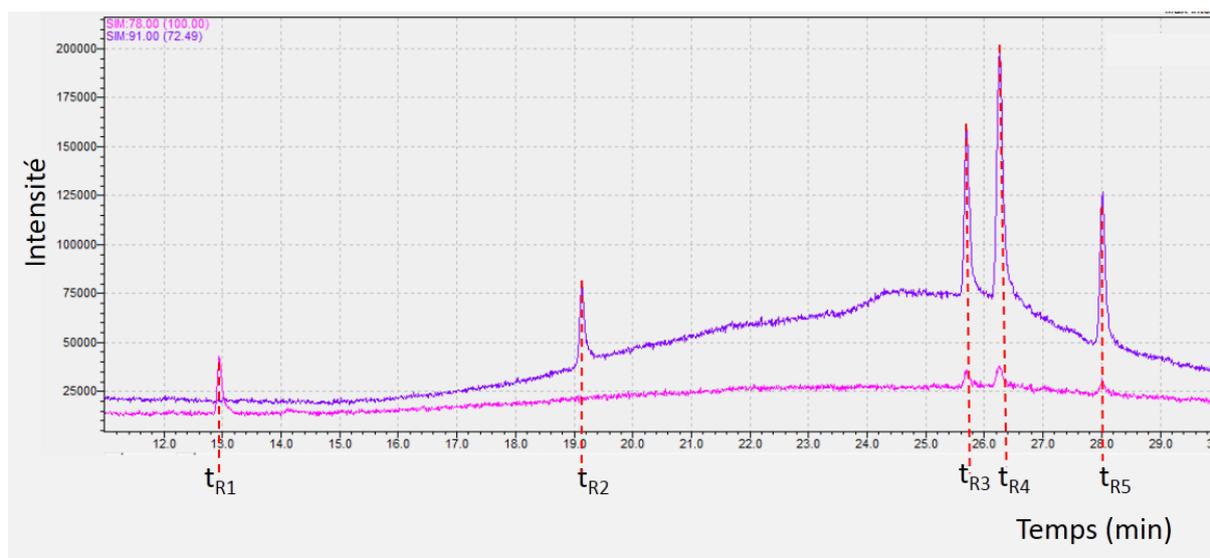


Figure 50 : Chromatogramme obtenu lors de la désorption de la fibre dans l'insert de la GC-MS (blanc)

Détection en mode SIM, présentation des ions de rapports $m/z=78$ et 91

t_R : temps de rétention correspondant au benzène t_{R1} , au toluène t_{R2} , à l'éthylbenzène t_{R3} , aux *m/p*-xylènes t_{R4} , et à l'*o*-xylène t_{R5}

Les conditions de séparation sont précisées dans la section 3.5.2.1 du chapitre 3

Une contamination résiduelle de la fibre n'avait pas été mise en évidence avec le précédent appareillage de type trappe ionique Saturn 2000 (Agilent Technologies) car l'utilisation du mode SIM de l'appareil Shimadzu QP 2010 permet la détection d'ions spécifiques aux composés ciblés, ce qui améliore le rapport signal/bruit et donc la sensibilité et la sélectivité de la détection des analytes.

La procédure de désorption appliquée ne permet pas d'éliminer la totalité des composés extraits au cours des précédentes expérimentations. Un nettoyage de la fibre avec un solvant aurait pu être envisagé. Les fournisseurs de fibres HS-SPME indiquent la compatibilité des fibres avec les solvants pouvant être utilisés pour le rinçage. Cependant, cette pratique n'est que peu relayée dans la littérature. Afin de minimiser la manipulation de solvant et d'éviter un éventuel apport de contaminant, une décontamination par désorption thermique reste privilégiée.

4.1.2.1. Données de désorption thermique en HS-SPME dans la littérature

Dans la littérature, la méthode HS-SPME est une technique fréquemment rencontrée pour l'extraction des BTEX. Les fibres utilisées sont diverses et la température ainsi que la durée de désorption des fibres est adaptée en fonction du type de revêtement et de la matrice extraite. La gamme de températures utilisée pour la désorption des fibres après l'extraction des BTEX varie généralement entre 150 et 280 °C (Doong, 2000 ; Lei, 2011 ; Tankiewicz, 2013). Après extraction des BTEX dans des échantillons d'eau, les fibres ayant un revêtement PDMS (100 μm d'épaisseur), PDMS/DVB (65 μm d'épaisseur) et DVB/CAR/PDMS (50/30 μm d'épaisseur) sont désorbées à 260 °C pendant 10 min (Bianchin, 2012). Pour l'extraction des BTEX dans des échantillons aqueux, une température de 150 °C pendant 3 min est appliquée pour la désorption de la fibre PDMS d'épaisseur 100 μm (Menéndez, 2000). Une

température de 260 °C appliquée à une fibre PDMS 100 µm pendant 5 min apparaît suffisante pour la désorption du toluène et des xylènes après leur extraction d'échantillons aqueux (Tankiewicz, 2013). Une température de 265 °C pendant 5 min est utilisée pour la désorption du toluène, de l'éthylbenzène et des xylènes d'une fibre DVB/CAR/PDMS (50/30 µm d'épaisseur) après extraction à partir d'échantillons d'huile (Vichi, 2005).

Pour permettre la désorption des BTEX extraits d'échantillons de sol, une température de 280 °C pendant 10 min est appliquée à une fibre ayant un revêtement CAR/PDMS (d'épaisseur 75 µm) identique à celui utilisé pour les échantillons de pomme par Ezquerro *et al.* (Ezquerro, 2004).

4.1.2.2. Paramètres sélectionnés pour la désorption de la fibre HS-SPME

L'utilisation de températures élevées et trop proches de la température maximale tolérée par la fibre CAR/PDMS (320 °C) est susceptible d'engendrer son usure prématurée. De plus, la température de 250 °C initialement sélectionnée pour la désorption de la fibre est cohérente avec celles rencontrées dans la littérature. Une température de 250 °C est donc conservée pour la désorption de la fibre CAR/PDMS d'épaisseur 75 µm après extraction en HS-SPME des BTEX dans les échantillons de pomme.

La température de désorption n'étant pas modifiée, une désorption plus longue doit être mise en place. Après avoir été placée 5 minutes dans l'insert de la GC-MS QP 2010 pour désorption et analyse des BTEX, la fibre subit une étape de conditionnement durant laquelle elle est de nouveau placée dans l'insert pendant 30 minutes à 250 °C. Ainsi, deux étapes distinctes sont appliquées à la fibre, l'une de désorption pour l'analyse des composés d'intérêt et l'autre de conditionnement afin d'assurer l'élimination des analytes avant l'utilisation suivante.

Afin d'observer l'impact de cette nouvelle étape de conditionnement sur l'élimination des BTEX présents sur la fibre, l'analyse correspondant à une fibre exposée dans l'espace de tête d'un échantillon de pomme additionné de BTEX à 4 µg/kg est comparée à l'analyse de cette même fibre après 30 min de désorption à 250 °C (tableau 24).

Tableau 24 : Evaluation de l'étape de conditionnement (30 min, 250 °C) sur la présence des BTEX sur la fibre SPME de type CAR/PDMS

	Analyse d'une fibre exposée à une pomme additionnée de BTEX à 4 µg/kg		Analyse de la fibre après 30 min à 250 °C		Pourcentage approximatif de BTEX restant sur la fibre
	Aire brute	Hauteur du pic	Aire brute	Hauteur du pic	
Benzène	41954	3933	2260	172	5 %
Toluène	159524	10427	7797	178	5 %
Ethylbenzène	149282	14502	393	22	<0,5 %
<i>m/p</i> -Xylènes	433973	35576	41971	1754	10 %
<i>o</i> -Xylène	313346	29788	492	36	<0,5 %

L'étape de conditionnement apparaît efficace pour éliminer les composés restant potentiellement adsorbés sur la fibre après l'analyse. Après 30 min passées à 250 °C,

l'analyse de la fibre montre une présence négligeable de BTEX, correspondant à moins de 10 % en aire brute de ce qui est retrouvé lors de l'analyse de la fibre après exposition à une additionnée de BTEX à 4 µg/kg (tableau 24).

Ce temps de conditionnement, assez long, assure l'élimination de la quasi-totalité des analytes retenus sur la fibre ; il est cohérent avec la recherche de faibles concentrations en hydrocarbures aromatiques.

Afin d'éviter des contaminations croisées entre analyses se caractérisant par un report des analytes d'une extraction à une autre, un outil indépendant, dédié au nettoyage de la fibre par désorption thermique, est mis en place. Après avoir été placée dans l'insert de la GC-MS QP 2010 pour désorption et analyse des BTEX, la fibre subit une étape de conditionnement où elle est placée 30 minutes à 250°C dans l'insert d'un autre chromatographe (Varian 3800 GC, Agilent Technologies, Santa Clara, US) dans lequel circule un flux d'azote.

4.1.2.3. Application de la HS-SPME à la détermination des BTEX présents à faibles concentrations (µg/kg) dans la pomme

Lors de la précédente étude avec l'appareil de GC-MS Saturn 2000 (Agilent Technologies), les niveaux étudiés étaient de l'ordre du mg/kg. La sensibilité de l'appareil Shimadzu QP 2010 en mode SIM a permis d'envisager l'analyse des hydrocarbures aromatiques en plus faibles concentrations. La gamme d'étude en BTEX est maintenant comprise entre 0 et 10 µg/kg, ce qui correspond à des concentrations susceptibles d'être retrouvées dans des échantillons naturels (Górna-Binkul, 1996 ; Fleming-Jones, 2003).

La fibre utilisée pour réaliser les premiers tests avait été utilisée lors de l'étude préliminaire menée au laboratoire et avait subi de très nombreuses extractions (estimées à plus de 200) avec des concentrations en BTEX de plusieurs mg/kg. La fibre est donc susceptible de se trouver dans un état d'usure avancé, ce qui peut modifier ses capacités de rétention et engendrer des conditions d'extraction peu reproductibles.

Une fibre CAR/PDMS 75 µm neuve est donc utilisée pour réaliser l'extraction des BTEX à partir d'une pomme polluée à 4 µg/kg avec la méthode HS-SPME. L'utilisation de cette nouvelle fibre d'extraction conduit à l'apparition de « plateaux » à la suite des pics des composés d'intérêt (figure 51).

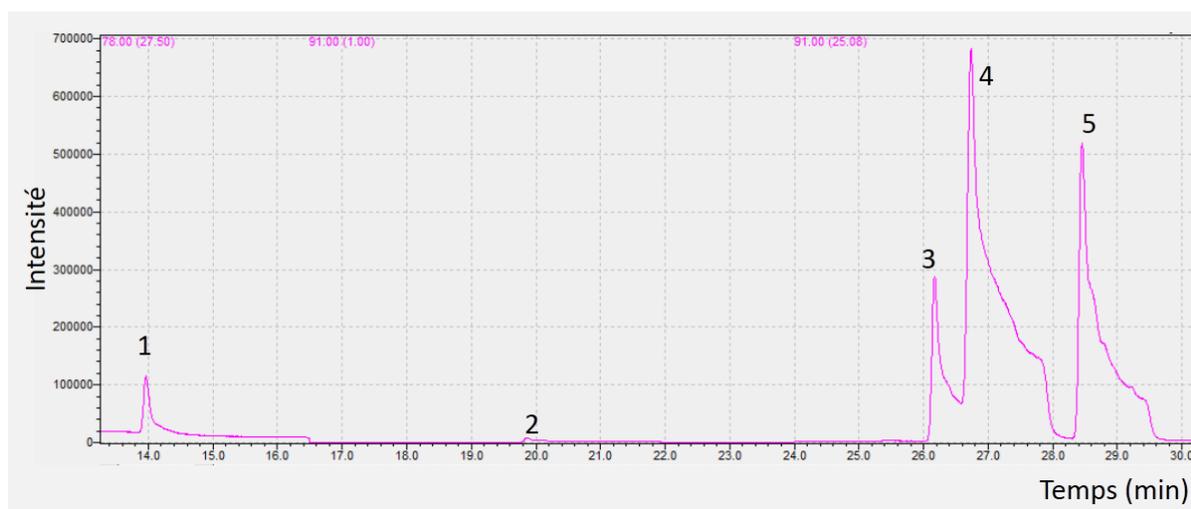


Figure 51 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS après analyse d'une nouvelle fibre HS-SPME (CAR/PDMS 75 μ m) exposée à une pomme additionnée de BTEX à 4 μ g/kg

Gradient de température : température initiale 40 °C maintenue 2 min ; 2 °C/min jusqu'à 55 °C maintenue 5 min ; 4 °C/min jusqu'à 100 °C maintenue 5 min ; 2 °C/min jusqu'à 150 °C maintenue 5 min ; 30 °C/min jusqu'à 300 °C maintenue 10 min.

Détection en mode SIM selon les conditions présentées en section 3.5.2.1, présentation des ions de rapports $m/z=78$ (de 13 à 16,5 min) et 91 (de 16,5 à 30 min)

1 : benzène, 2 : toluène, 3 : éthylbenzène, 4 : *m/p*-xylènes, 5 : *o*-xylène

Le lot de fibre a dans un premier temps été incriminé. Une fibre provenant d'un autre lot conduit à un résultat similaire avec des pics traînants. Ces problèmes non mentionnés dans la littérature n'ont jamais été rapportés auprès du fournisseur qui a été contacté. Les « plateaux » à la suite des pics n'étant pas présents lors des expérimentations avec la fibre « ancienne », il peut être envisagé qu'elle possédait des sites de fixation profonds saturés par de précédentes extractions avec de fortes quantités d'hydrocarbures aromatiques (mg/kg). Les sites profonds étant saturés, les composés extraits s'adsorbent seulement sur les sites situés en surface. Ces sites de surface pouvant potentiellement être rapidement désorbés, les pics obtenus présentaient un retour rapide à la ligne de base.

Afin d'optimiser la forme des pics, différentes durées et températures de désorption de la fibre neuve au niveau de l'insert sont testées. L'efficacité (exprimée par le nombre N de plateaux théoriques) est déterminée pour les BTEX dans chacune des conditions et la forme des pics avec la nouvelle fibre est appréciée (tableau 25) par le calcul d'un facteur d'asymétrie (formules en section 3.5.2.5, p 147).

Tableau 25 : Effet de la modification des conditions de désorption sur l'efficacité chromatographique (nombre de plateaux) et sur le facteur d'asymétrie des pics de BTEX

	Conditions de désorption							
	5 min		2 min		1 min		1 min	
	250 °C		250 °C		250 °C		200 °C	
	N	a/b	N	a/b	N	a/b	N	a/b
Benzène	93519	0,21	80724	0,11	83823	0,18	78663	0,44
Toluène	123615	0,04	73529	0,08	83939	0,16	124587	0,18
Ethylbenzène	235239	0,17	142459	0,19	142657	0,30	212678	0,32
<i>m/p</i> -Xylènes	62108	0,11	102847	0,23	93050	0,39	122387	0,35
<i>o</i> -Xylène	96680	0,08	131099	0,23	168612	0,40	343195	0,41

N : efficacité exprimée par le nombre de plateaux théoriques pour la colonne chromatographique

a/b : facteur d'asymétrie

Une durée relativement longue (5 min) est favorable à une désorption de la majeure partie des analytes pour leur passage dans la colonne d'un GC-MS. Lors de l'utilisation d'une fibre neuve, les hydrocarbures aromatiques sont susceptibles de s'adsorber sur des sites de fixation situés en surface et en profondeur. Cette différence d'adsorption peut générer, lors de la désorption, une libération des composés volatils à des temps différents, ce qui se traduit par l'apparition de pics traînants. L'apparition de ces pics asymétriques entraîne des chevauchements importants notamment entre les pics de l'éthylbenzène et des *m/p*-xylènes (figure 51). Pour ces analytes, une diminution du temps de désorption (5 min, 2 min, puis 1 min) pour une même température de 250°C permet de diminuer largement l'asymétrie des pics (tableau 25). Pour exemple, le facteur d'asymétrie (a/b) du pic de l'éthylbenzène de 0,17 pour 5 min de désorption atteint 0,30 pour 1 min de désorption. Pour autant, l'efficacité (N) reste relativement constante pour les BTEX, composés les moins volatils, et ce quel que soient les temps de désorption (tableau 25).

Pour un même temps de désorption de 1 min, la réduction de l'écart de température entre l'insert (200°C au lieu de 250°C) et l'entrée de la colonne (40°C) a peu d'influence sur la symétrie des pics de BTEX (tableau 25). Des facteurs d'asymétrie similaires sont trouvés pour les pics du toluène, de l'éthylbenzène et des xylènes. Pour la majorité des composés, l'efficacité (N) est, cependant, nettement améliorée par la diminution de la température de l'insert de 250 à 200 °C (tableau 25). Pour les BTEX les moins volatils (éthylbenzène et xylènes), l'efficacité des pics est ainsi augmentée de facteurs 1,3 à 2,0. Les analytes ne variant pas au niveau de leur temps de rétention, seule la largeur du pic (largeur à 10 % de la hauteur du pic) est alors diminuée ce qui conduit à l'obtention de pics plus fins.

La résolution calculée entre les pics de l'éthylbenzène (pic n°1, figure 52) et des *m/p*-xylènes (pic n°2, figure 52), en utilisant la largeur des pics à 10 % (selon la formule précisée en section 3.5.2.5, chapitre 3, p 148), passe de 0,6 pour une désorption de 5 min à 1,5 pour une désorption de 1 min à 200 °C. La diminution de la durée de désorption (5 min à 1 min) ainsi que de la température de désorption (250°C à 200°C) permet surtout d'améliorer la résolution entre les pics de l'éthylbenzène et des *m/p*-xylènes (figure 52). Leurs pics présentent la différence de temps de rétention la plus faible entre analytes ciblés et n'auraient pu être correctement quantifiés au moyen des conditions initiales de désorption.

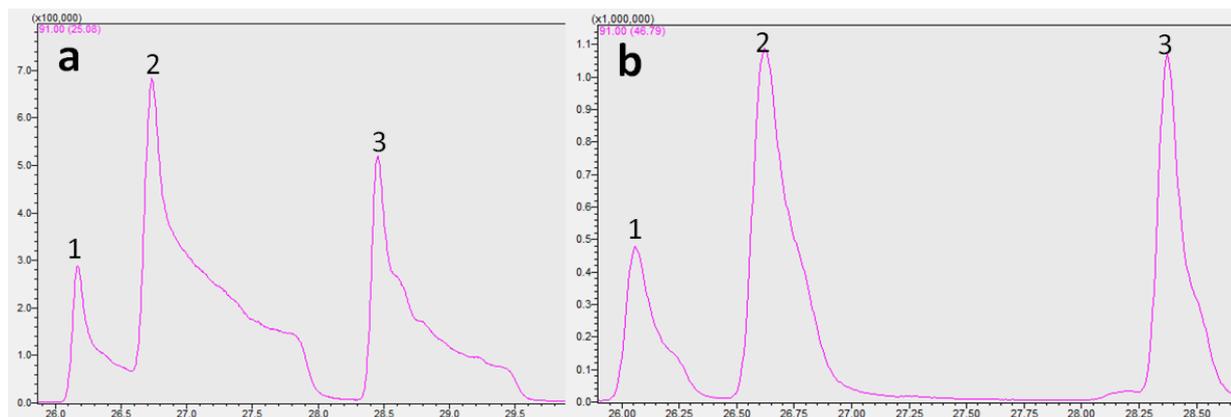


Figure 52 : Optimisation des paramètres de désorption de la fibre d'extraction

Chromatogrammes obtenus en GC-MS après extraction HS-SPME d'un échantillon de pomme pollué par les hydrocarbures aromatiques à 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Gradient de température : température initiale 40 °C maintenue 2 min ; 2 °C/min jusqu'à 55 °C maintenue 5 min ; 4 °C/min jusqu'à 100 °C maintenue 5 min ; 2 °C/min jusqu'à 150 °C maintenue 5 min ; 30 °C/min jusqu'à 300 °C maintenue 10 min.

Détection en mode SIM, présentation de l'ion de rapport $m/z=91$

a : température de désorption 250 °C, temps de désorption 5 min

b : température de désorption 200 °C, temps de désorption 1 min

1 : éthylbenzène, 2 : *m/p*-xylènes, 3 : *o*-xylène

L'ensemble de la procédure de désorption de la fibre utilisée en HS-SPME a été optimisé. L'application d'une température de 200 °C pendant 1 min pour la désorption de la fibre permet d'obtenir des pics résolus lors de l'analyse des BTEX. L'élimination des composés restant adsorbés après l'analyse est ensuite assurée par un conditionnement à 250 °C pendant 30 min. L'application de ces conditions constitue une étape indispensable pour permettre l'analyse des composés à l'état de trace.

4.1.3. Optimisation de la procédure d'extraction en HS-SPME

4.1.3.1. Vérification de l'utilisation du nonane comme étalon interne pour la procédure d'extraction en HS-SPME (méthode HS-SPME 1)

La première étape de l'optimisation de la procédure d'extraction consiste à ajouter un étalon interne aux échantillons afin de réduire les variabilités induites à la fois par l'extraction et l'injection en GC-MS pour permettre une quantification adéquate des BTEX.

Le nonane qui appartient à la famille des hydrocarbures est d'abord sélectionné comme étalon interne. Ce composé, dont la masse moléculaire ($MM=128 \text{ g/mol}$) et la température d'ébullition (150 °C) sont proches de celles des BTEX (MM de 78 à 106 g/mol et températures d'ébullition de 80 à 144 °C), est généralement non présent dans les matrices fruitières qui contiennent principalement des alcanes linéaires avec un nombre pair de carbones. Le nonane a également pour avantage d'être stable et d'avoir une durée de conservation longue en solution par rapport aux étalons deutérés. Les premières extractions en HS-SPME visent à vérifier la capacité d'adsorption du nonane sur la fibre d'extraction et l'absence d'interférence avec des pics associés aux composés de la matrice fruitière. L'ion majoritaire utilisé pour l'intégration du pic du nonane ainsi que son temps de rétention ne correspondent à aucun BTEX et à aucun composant de la pomme (figure 53). Aucune

confusion entre le pic de l'étalon interne et ceux correspondants aux composés d'intérêt n'est possible. Le nonane semble donc être un étalon interne adapté à la méthode HS-SPME.

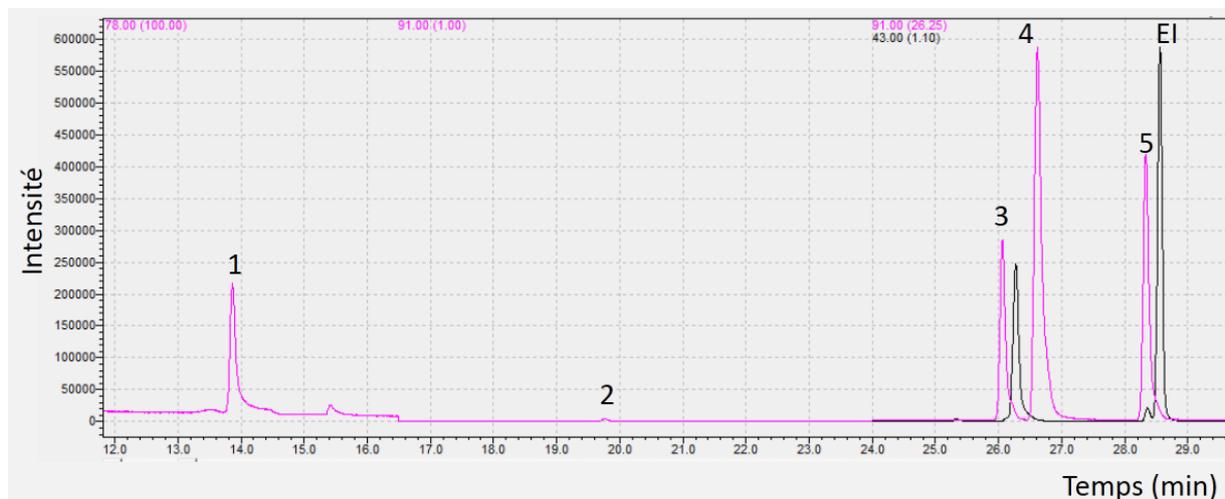


Figure 53 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS avec la méthode HS-SPME 1 pour une pomme additionnée de BTEX à 10 µg/kg et de nonane à 500 µg/kg

Gradient de température : température initiale 40 °C maintenue 2 min ; 2 °C/min jusqu'à 55 °C maintenue 5 min ; 4 °C/min jusqu'à 100 °C maintenue 5 min ; 60 °C/min jusqu'à 200 °C ; 2 °C/min jusqu'à 250 °C ; 30 °C/min jusqu'à 300 °C maintenue 5 min.

Détection en mode SIM, présentation des ions de rapports $m/z=78$ (de 13 à 16,5 min), 91 (de 16,5 à 30 min) et 43 (de 24 à 30 min)

1 : benzène, 2 : toluène, 3 : éthylbenzène, 4 : *m/p*-xylènes, 5 : *o*-xylène, EI : étalon interne (nonane)

Une gamme d'étalonnage est ensuite effectuée afin de vérifier dans un premier temps la linéarité de la réponse obtenue en GC-MS en fonction de la quantité de BTEX introduite, entre 0 et 10 µg/kg.

L'ajout des BTEX ainsi que l'étalon interne à la matrice induit un apport de solvant. L'impact de l'introduction de solvant sur l'extraction est étudié (tableau 26) en comparant les chromatogrammes obtenus après HS-SPME 1 pour une pomme (20 g de broyat) additionnée de nonane (10 µL à 1 mg/mL), **condition 1**, et pour une pomme (20 g de broyat) à laquelle est ajouté le nonane (10 µL à 1 mg/mL) et 200 µL de solvant (dichlorométhane), **condition 2**. Ce dernier ajout a pour but de simuler l'apport de solvant généré lors de la réalisation de la gamme d'étalonnage. Les aires brutes obtenues pour le pic du nonane, lors des 3 essais réalisés, sont présentées pour chacune des deux conditions (tableau 26).

Tableau 26 : Aires brutes du nonane (500 µg/kg) en présence ou absence de dichlorométhane

	Condition 1	Condition 2
Aires brutes du nonane	128639	35543
	177806	72573
	150922	31619
Moyenne	152456	46578

Aires brutes obtenues pour le nonane (500 µg/kg) en GC-MS après extraction en HS-SPME d'une pomme (20 g de broyat) additionnée de nonane (condition 1) ou additionnée de nonane et de dichlorométhane (200 µL) (condition 2)

Les conditions de séparation et de détection sont précisées dans la section 3.5.2.1 du chapitre 3

L'aire brute est 3 fois plus importante pour le nonane lorsqu'il est introduit seul dans l'échantillon de pomme (**condition 1**, tableau 26). L'extraction du nonane est moins efficace lorsqu'il est additionné au broyat avec un ajout de solvant (**condition 2**, tableau 26). Néanmoins, dans les deux conditions le nonane reste largement quantifiable avec un rapport signal/bruit très supérieur à 10.

Dans la littérature, l'addition de solvant en HS-SPME est généralement effectuée pour faciliter le passage des composés d'intérêt fortement adsorbés à la matrice dans la phase gazeuse. Cependant, la présence de solvant organique tel que le dichlorométhane peut mener à une diminution de l'efficacité d'extraction des HAP dans les légumes (Lei, 2011). Ce phénomène correspond à celui observé lors de l'extraction du nonane en HS-SPME après ajout du dichlorométhane. La réalisation de la courbe d'étalonnage prévoit l'ajout de volumes croissants de la solution HAP/BTEX 1 préparée dans le dichlorométhane. La réponse du nonane obtenue en GC-MS pouvant varier en fonction du volume de solution HAP/BTEX 1 introduit, le volume de solvant additionné à l'échantillon est maintenu constant. Lors de la réalisation de la gamme d'étalonnage, le volume de solution HAP/BTEX 1 ajouté varie entre 0 et 100 μL ; cet ajout est complété systématiquement par du dichlorométhane pour maintenir le volume introduit constant. Ce complément en dichlorométhane assure le maintien de conditions d'extraction similaires pour l'ensemble des échantillons, et ainsi une réponse stable de l'étalon interne. Des proportions identiques entre la masse de broyat et les quantités d'étalon interne et de solvant introduites sont respectées pour les échantillons additionnés ou non de HAP et BTEX.

La procédure d'extraction ayant été optimisée par l'ajout d'un étalon interne et par le maintien d'un volume constant introduit dans l'échantillon, une vérification de la conservation des échantillons de pomme broyée est réalisée.

4.1.3.2. Choix du mode de conservation pour les échantillons de pomme broyée

La pomme est un fruit ayant une durée de conservation longue. Cependant, la récolte des pommes est saisonnière, regroupée sur une période assez courte d'environ 3 à 4 mois (de septembre à décembre dans l'hémisphère nord).

Dans le but de mener des campagnes de prélèvement dans la période de maturité des fruits, puis de les analyser ultérieurement, un mode de conservation des échantillons a été recherché. Dans la littérature, des méthodes de lyophilisation, congélation ou réfrigération sont utilisées pour la conservation des aliments contaminés par les hydrocarbures aromatiques (Ashraf, 2012 ; Fleming-Jones, 2003 ; Purcaro, 2009 ; Camargo, 2003). Néanmoins, il n'existe aucune donnée à notre connaissance comparant les quantités d'hydrocarbures aromatiques avant et après la conservation des échantillons.

La lyophilisation est une procédure répandue pour conserver les échantillons ; elle a notamment été utilisée pour des échantillons de viandes contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Purcaro, 2009). Néanmoins, ce mode de conservation n'a pas été retenu en raison du processus d'évaporation drastique mis en jeu qui peut induire des pertes en BTEX, composés très volatils et apolaires contenus dans des matrices aqueuses.

Des pertes importantes (jusqu'à 100 %) de composés volatils tels que le *d*-limonène et le myrcène sont notamment observées après lyophilisation du pamplemousse (Vanamala, 2005). Pour la peau du raisin, la lyophilisation entraîne une perte significative (niveau de confiance 0,005) de certains terpènes (menthol, nérol et *trans*-géraniol), dont la structure est relativement proche de celles des hydrocarbures aromatiques monocycliques (de Torres, 2010).

Avant l'analyse des BTEX dans des aliments, Fleming-Jones *et al.* ont mixé puis conservé les échantillons au congélateur (Fleming-Jones, 2003). La congélation apparaît donc être une option de conservation favorable. En raison des faibles températures présentes au cours de la congélation, le risque de perte de composés sensibles semble moins important que durant la réfrigération. L'impact de ce mode de conservation sur le contenu en BTEX dans 20 g de broyat de pomme a donc été testé. Le flaconnage choisi pour la conservation possède une embouchure large pour faciliter la récupération de l'échantillon. De plus, avant la congélation de l'échantillon, l'air contenu dans le volume vide est chassé par un passage sous flux d'azote, gaz inerte avec lequel l'échantillon n'a pas d'interaction, minimisant ainsi le processus d'oxydation.

Des tests de conservation effectués à partir de 20 g de broyat de pomme additionné de BTEX à 4 µg/kg consistent à comparer 3 conditions :

- Ajout d'étalon interne et complémentation avec le dichlorométhane puis extraction en HS-SPME le jour même (J0)
- Ajout d'étalon interne et complémentation avec le dichlorométhane, puis congélation pendant 6 semaines à -20°C. Décongélation (minimum 15 min à température ambiante) puis extraction en HS-SPME (S6a)
- Congélation pendant 6 semaines à -20°C. Décongélation (minimum 15 min à température ambiante) puis ajout d'étalon interne et complémentation avec le dichlorométhane le jour de l'extraction en HS-SPME (S6b)

En figure 54, les résultats en aires relatives après extraction en HS-SPME des BTEX sont comparés pour des échantillons de pomme conservés dans ces différentes conditions.

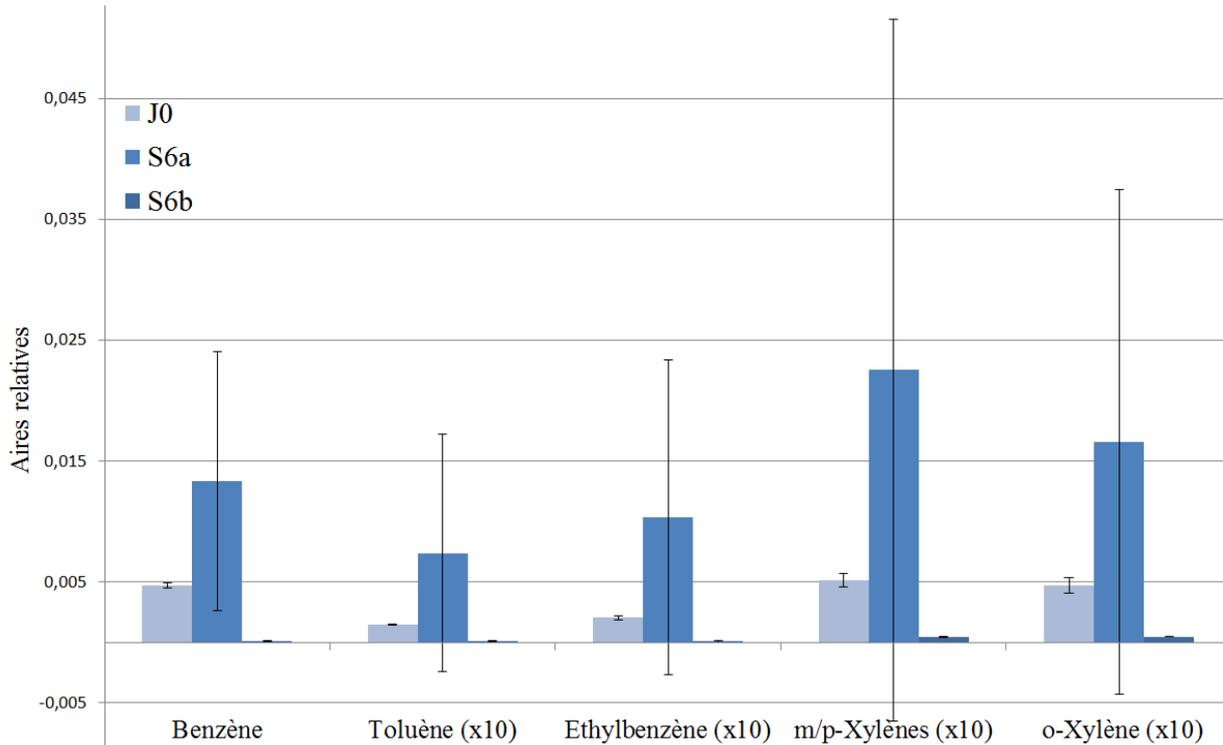


Figure 54 : Comparaison des aires relatives obtenues en HS-SPME pour une pomme additionnée de BTEX à 4 µg/kg dans différentes conditions de conservation

Pour chaque condition, l'aire relative représentée correspond à la moyenne de 2 déterminations (n=2)

Les barres d'erreurs correspondent aux écarts entre les 2 déterminations

x10 : les aires relatives pour le toluène, l'éthylbenzène, les *m/p*-xylènes et l'*o*-xylène ont été divisées par 10 pour être à la même échelle que le benzène

J0 : addition de BTEX à 4 µg/kg à 20 g de broyat de pomme puis ajout d'étalon interne et complémentation avec le dichlorométhane suivi de l'extraction en HS-SPME le jour même

S6a : addition de BTEX à 4 µg/kg à 20 g de broyat de pomme puis ajout d'étalon interne et complémentation avec le dichlorométhane, congélation pendant 6 semaines à -20°C. Décongélation (minimum 15 min à température ambiante) suivie de l'extraction en HS-SPME

S6b : addition de BTEX à 4 µg/kg à 20 g de broyat de pomme puis congélation pendant 6 semaines à -20°C. Décongélation (minimum 15 min à température ambiante) puis ajout d'étalon interne et complémentation avec le dichlorométhane suivi de l'extraction en HS-SPME

Une faible dispersion des aires relatives est observée (figure 54) pour l'échantillon n'ayant pas subi d'étape de conservation (J0). Au contraire, une variabilité très importante des aires relatives est observée lorsque l'étalon interne et le solvant sont ajoutés avant la congélation de l'échantillon (S6a). Lorsque l'étalon interne et le solvant sont ajoutés après la décongélation de l'échantillon (S6b), les aires relatives sont quasi nulles et difficilement comparables à celles retrouvées avec les autres conditions de stockage.

L'histogramme de la figure 54 montre que la congélation (aussi bien dans les conditions S6a que S6b) ne permet pas de retrouver les mêmes aires relatives que lorsque l'échantillon n'est pas soumis à une procédure de conservation. La congélation n'est donc pas un mode de conservation favorable pour les BTEX dans la pomme.

Afin d'observer l'évolution des composés indépendamment du comportement de l'étalon interne, les aires brutes sont également présentées (figure 55) pour les mêmes conditions de conservation du broyat de pomme additionné en BTEX à 4 µg/kg.

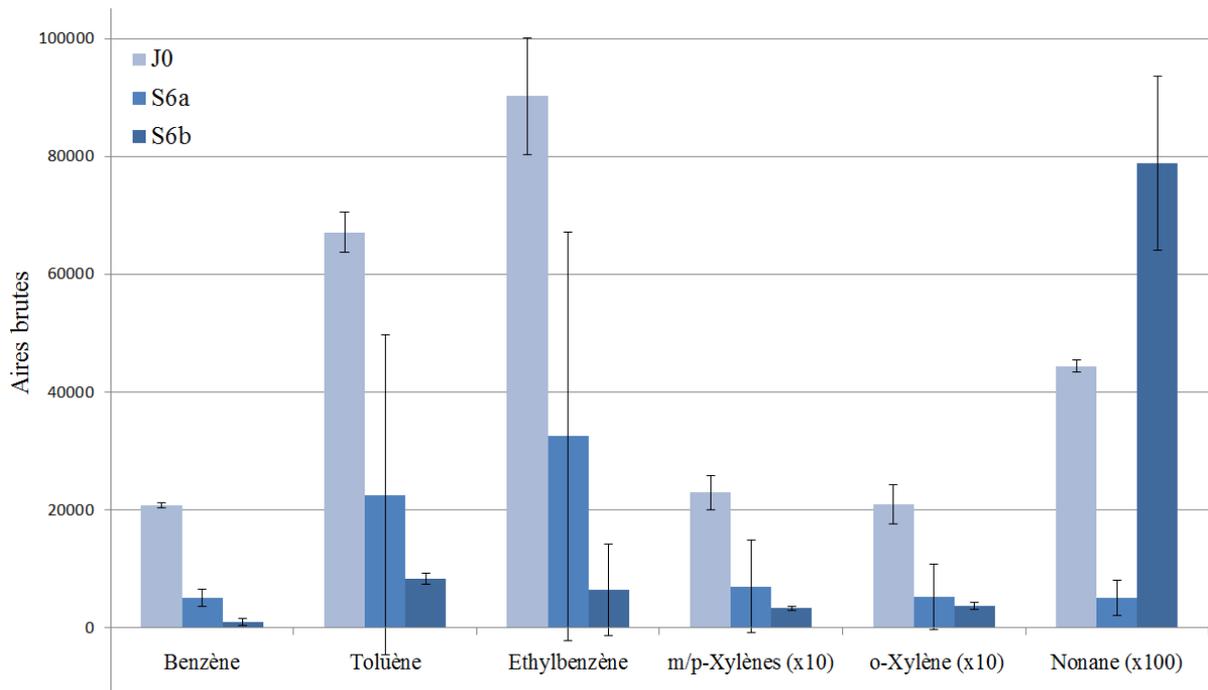


Figure 55 : Comparaison des aires brutes obtenues en HS-SPME pour une pomme additionnée de BTEX à 4 µg/kg dans différentes conditions de conservation

Pour chaque condition, l'aire brute représentée correspond à la moyenne de 2 déterminations (n=2)

Les barres d'erreurs correspondent aux écarts entre les 2 déterminations

x10 : les aires brutes pour les *m/p*-xylènes et l'*o*-xylène ont été divisées par 10 pour être à la même échelle que le benzène, le toluène et l'éthylbenzène

x100 : les aires brutes pour le nonane ont été divisées par 100 pour être à la même échelle que le benzène, le toluène et l'éthylbenzène

J0 : addition de BTEX à 4 µg/kg à 20 g de broyat de pomme puis ajout d'étalon interne et complémentation avec le dichlorométhane suivi de l'extraction en HS-SPME le jour même

S6a : addition de BTEX à 4 µg/kg à 20 g de broyat de pomme puis ajout d'étalon interne et complémentation avec le dichlorométhane, congélation pendant 6 semaines à -20°C. Décongélation (minimum 15 min à température ambiante) suivie de l'extraction en HS-SPME

S6b : addition de BTEX à 4 µg/kg à 20 g de broyat de pomme puis congélation pendant 6 semaines à -20°C. Décongélation (minimum 15 min à température ambiante) puis ajout d'étalon interne et complémentation avec le dichlorométhane suivi de l'extraction en HS-SPME

Pour l'échantillon n'ayant pas subi d'étape de conservation (J0), les valeurs d'aires brutes sont faiblement variables (figure 55). Après 6 semaines de congélation à -20 °C, les aires brutes des BTEX initialement additionnés seuls au broyat de pomme (conditions S6b) sont réduites de 80 à 90% comparées aux valeurs brutes des BTEX pour l'échantillon non conservé (J0). Dans les conditions S6a, où les BTEX et l'étalon interne sont conservés 6 semaines au congélateur, les résultats bruts sont très variables mais montrent globalement une tendance à la diminution par rapport aux aires obtenues avec l'échantillon non conservé (J0). Dans ces conditions de conservation (S6a), le nonane subit une perte de près de 90 % par rapport à l'ajout initial (figure 55).

Il apparaît que les conditions de conservation testées engendrent une perte d'une part importante et variable des BTEX et du nonane après 6 semaines de congélation à -20 °C. Du fait de l'impact négatif de la congélation sur la quantité de nonane et de BTEX dans

l'échantillon, celle-ci n'apparaît pas être un mode de conservation adapté du broyat de pomme.

Ainsi, afin d'éviter les pertes mais également des biais entre les analyses d'échantillons conservés plus ou moins longtemps, la conservation des pommes sur le long terme est abandonnée. Les extractions en HS-SPME des pommes prélevées en milieu naturel seront principalement réalisées dès le lendemain de leur récolte. Les pommes seront conservées au maximum 2 jours dans un récipient en verre fermé hermétiquement.

Ces résultats ont également amené à remettre en cause le mode de conservation des solutions commerciales et diluées de HAP, de BTEX et d'étalons internes. En effet, ces solutions conservées au congélateur subissent de fréquentes décongélations et recongélations susceptibles d'entraîner leur dégradation rapide et une éventuelle volatilisation des composés. Ce mode de conservation a donc été abandonné et l'ensemble des solutions est conservé au réfrigérateur entre 4 et 6 °C.

En respectant les conditions ainsi définies pour l'utilisation du nonane comme étalon interne et pour la conservation des échantillons, la méthode HS-SPME 1 a pu être validée pour la détermination des BTEX dans deux matrices fruitières : la pomme et la poire.

4.1.4. Validation de la méthode HS-SPME 1 avec la pomme et la poire

Afin de valider la méthode HS-SPME 1, des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire ainsi qu'une gamme d'étalonnage entre 0 et 10 µg/kg sont réalisés pour la pomme (sections 4.1.4.1 à 4.1.4.3) et pour la poire (sections 4.1.4.4 et 4.1.4.5).

4.1.4.1. Essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour la méthode HS-SPME 1 avec la pomme

Les essais de répétabilité permettent d'étudier la variabilité des résultats de trois extractions réalisées le même jour. Le nombre de déterminations (n=3 pour les essais de répétabilité) est choisi pour être en cohérence avec les essais menés par la suite avec les HAP. La durée des méthodologies d'extraction en UAE/SPE et d'analyse des HAP ne permettent que 3 déterminations par jour. La fidélité intermédiaire exprime la variabilité des résultats d'extractions réalisées dans un même laboratoire mais à des moments différents. Les essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire utilisent un ajout équivalent à 4 µg/kg pour chaque BTEX dans la pomme selon la procédure décrite dans la section 3.5.2 du chapitre 3 Matériels et Méthodes. Cette teneur est sélectionnée car elle se situe au milieu de la gamme de linéarité étudiée. La variabilité des essais de répétabilité et de précision intermédiaire est évaluée grâce aux calculs des coefficients de variation qui correspondent à l'écart type rapporté à la moyenne des mesures. Les résultats obtenus pour la méthode HS-SPME 1 sont présentés dans le tableau 27.

Tableau 27 : Coefficients de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire des BTEX avec la méthode HS-SPME 1

	Répétabilité CV % (n=3)	Fidélité intermédiaire CV % (n=9)
Benzène	10	19
Toluène	11	14
Ethylbenzène	8	10
<i>m/p</i> -Xylènes	6	20
<i>o</i> -Xylène	10	12

Essais réalisés avec la pomme additionnée de BTEX à 4 µg/kg, excepté pour les *m/p*-Xylènes (8 µg/kg) qui ne peuvent pas être dissociés lors de l'analyse par GC-MS

n : nombre d'échantillons analysés

CV : coefficient de variation

Les coefficients de variation (CV) de répétabilité sont tous compris entre 6 % (pour les *m/p*-xylènes) et 11 % (pour le toluène). Pour des échantillons d'eau, les coefficients de variation obtenus en SPME (en immersion directe et dans l'espace de tête) pour une concentration en BTEX de 1 µg/L sont compris entre 2 et 16 % et varient de 6 à 11 % avec 10 µg/L (5 déterminations pour chaque concentration) (Bianchin, 2012). Les résultats de répétabilité avec la pomme sont donc comparables à ceux obtenus dans l'eau, qui est une matrice moins complexe, et pour une concentration de 10 µg/L. Pour l'olive qui est une matrice complexe, les 8 déterminations réalisées dans l'espace de tête à 10 µg/kg donnent des CV de 10 à 14 % pour la répétabilité et les CV sont compris entre 10 et 13 % pour une concentration de 50 µg/kg (8 déterminations) (Gilbert-López, 2010). Les CV de répétabilité présentés dans le tableau 27 sont cohérents avec ceux observés pour l'olive avec des concentrations testées 2 à 10 fois supérieures à celle utilisée pour la pomme (4 µg/kg).

En ce qui concerne la fidélité intermédiaire avec la pomme, les coefficients de variation varient entre 10 % pour l'éthylbenzène et 20 % pour les *m/p*-xylènes. La variabilité des résultats sur des journées différentes (5 déterminations) est étudiée en HS-SPME pour le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes à 10 µg/kg dans des échantillons d'huile d'olive et les CV obtenus atteignent jusqu'à 15 % (Vichi, 2005). Les résultats de fidélité intermédiaire sont globalement cohérents avec les résultats de variabilité sur des jours différents présentés pour l'huile d'olive, la concentration étudiée ici avec la pomme étant environ 2 fois plus faible.

Les coefficients de variation obtenus avec la méthode HS-SPME 1 sont appropriés à la détermination des BTEX à 4 µg/kg.

4.1.4.2. Réalisation des gammes d'étalonnage pour la méthode HS-SPME 1 avec la pomme

La seconde étape de la validation de la méthode HS-SPME 1 consiste à vérifier la linéarité des mesures entre 0 et 10 µg/kg (section 3.5.1 du chapitre 3). Les droites obtenues pour chaque composé sont présentées en figure 56.

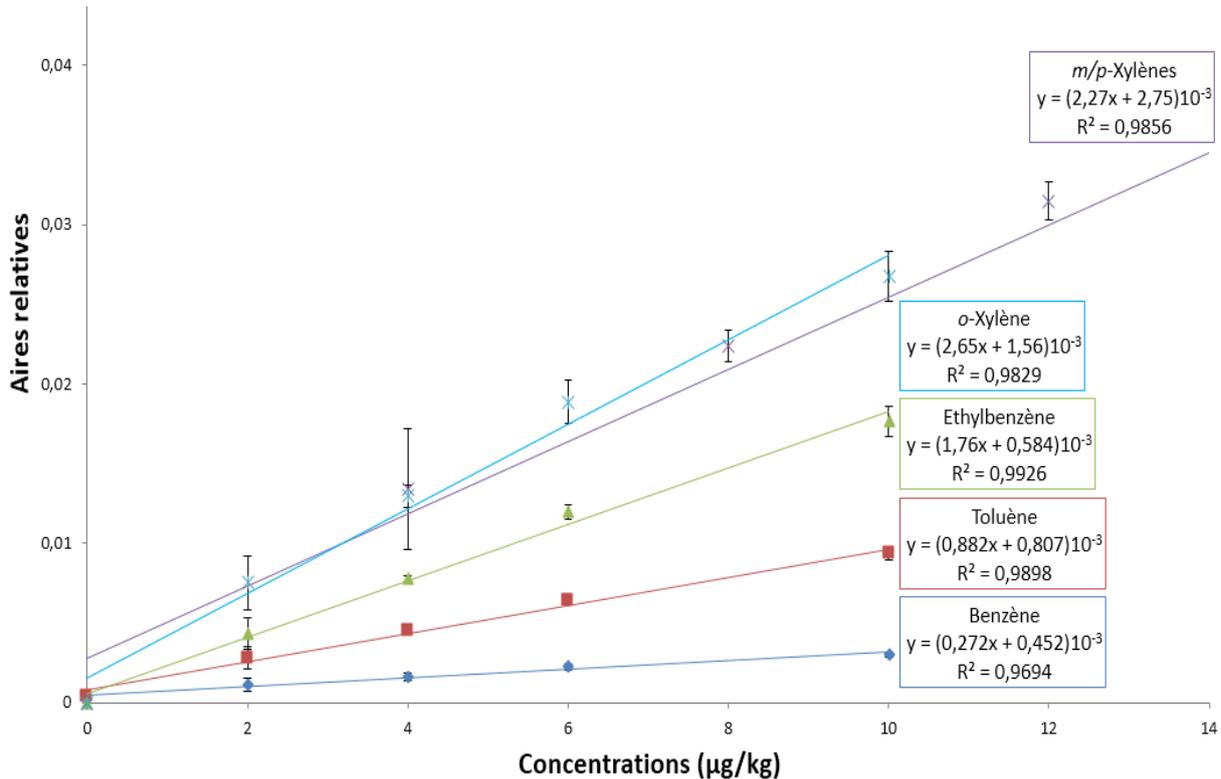


Figure 56 : Droites d'étalonnage pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 1

Gammes réalisées sur 6 points en triplicat : 0, 2, 4, 6, 8, et 10 µg/kg (excepté *m/p*-xylènes 0, 4, 8, 12, 16 et 20 µg/kg, les points à 16 et 20 µg/kg ne sont pas représentés)

Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les valeurs des 3 étalonnages réalisés

Le benzène est le composé présentant la plus faible pente entre 0 et 10 µg/kg avec la pomme. La pente de l'éthylbenzène est environ 2 fois moins importante que celle du toluène qui est elle-même environ 3 fois supérieure à celle du benzène. L'*o*-xylène et les *m/p*-xylènes montrent des pentes très proches, ce qui indique que ces composés sont extraits et détectés de façon similaire.

Le coefficient de détermination (R^2) le plus faible obtenu à partir des droites de régression linéaire est de 0,9694 pour le benzène. Au cours de l'étude préliminaire menée au laboratoire, le coefficient de détermination obtenu pour le benzène dans la pomme avec la même fibre d'extraction CAR/PDMS (75 µm d'épaisseur) et la même colonne chromatographique (DB 5ms) était inférieur à 0,9 pour une concentration en benzène de 1000 µg/kg (Pointot, 2014). L'utilisation de l'appareil de GC-MS Shimadzu QP 2010 et du mode SIM permet d'améliorer le résultat précédemment obtenu. L'ion sélectionné pour la détection du benzène ($m/z=78$) correspond à l'ion majoritairement formé lors de l'ionisation électronique ; son intensité relative est plus de 3 fois supérieure à celles des autres ions du spectre de masse pour ce composé. De plus, une très faible variabilité des résultats entre 0 et 10 µg/kg pour le benzène associée à de faibles écarts types est observée (figure 56).

Pour le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes, les R^2 obtenus avec la pomme sont compris entre 0,9829 et 0,9926 (figure 56). Des R^2 déterminés après HS-SPME à partir d'échantillons d'eau varient entre 0,9864 et 0,9926 pour le toluène et les *m/p*-xylènes et la gamme de linéarité des résultats se situe entre environ 10 et 1000 µg/L (Tankiewicz, 2013). La pomme

est une matrice plus complexe que l'eau et la gamme de linéarité étudiée dans la pomme est plus faible (comprise entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), les R^2 présentés en figure 56 sont donc cohérents avec ceux présentés pour des échantillons d'eau.

4.1.4.3. Détermination des limites de détection et quantification pour la méthode HS-SPME 1 avec la pomme

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont ensuite calculées pour la méthode HS-SPME 1 selon la procédure décrite dans la section 3.5.3 du chapitre 3. Les valeurs de LOD et LOQ obtenues pour la pomme sont données dans le tableau 28.

Tableau 28 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 1

	LOD	LOQ
	(μg/kg)	
Benzène	0,065	0,217
Toluène	0,022	0,072
Ethylbenzène	0,014	0,048
<i>m/p</i> -Xylènes	0,013	0,044
<i>o</i> -Xylène	0,011	0,036

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

Les LOD varient entre 0,011 et 0,065 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masse fraîche et les LOQ entre 0,036 et 0,217 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masse fraîche. Pour les BTEX extraits par SPME (immersion directe et dans l'espace de tête) à partir d'échantillons d'eau, les LOD (compris entre 0,07 et 0,32 $\mu\text{g}/\text{L}$) sont environ 5 à 10 fois supérieurs à ceux trouvés pour la pomme (Bianchin, 2012). Dans une étude menée en HS-SPME sur des échantillons d'huile, les LOD et LOQ pour le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes sont compris entre 0,4 et 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et entre 1,4 et 2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivement (Vichi, 2005). Ces résultats également obtenus en utilisant le mode SIM de la détection en masse montrent que les limites de détection et de quantification (tableau 28) déterminées avec la pomme sont faibles et compatibles avec la recherche des BTEX à l'état de traces dans ces échantillons.

Les résultats obtenus avec la méthode HS-SPME 1 sont répétables et une bonne fidélité intermédiaire est obtenue. Pour chaque BTEX, des linéarités sont observées pour les droites d'étalonnage (aire relative = $f(\text{concentration})$) entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masse fraîche). Les limites de détection et de quantification déterminées sont faibles, ce qui est compatible avec une détermination de ces composés à l'état de traces dans la pomme.

4.1.4.4. Réalisation des droites d'étalonnage avec la méthode HS-SPME 1 appliquée à la poire

La méthode HS-SPME 1, validée pour la détermination des BTEX dans la pomme, a été testée dans le cas d'une autre matrice fruitière, la poire. Des courbes d'étalonnage ont été réalisées pour chaque BTEX avec la poire comme matrice extraite. Les droites obtenues sont présentées sur la figure 57.

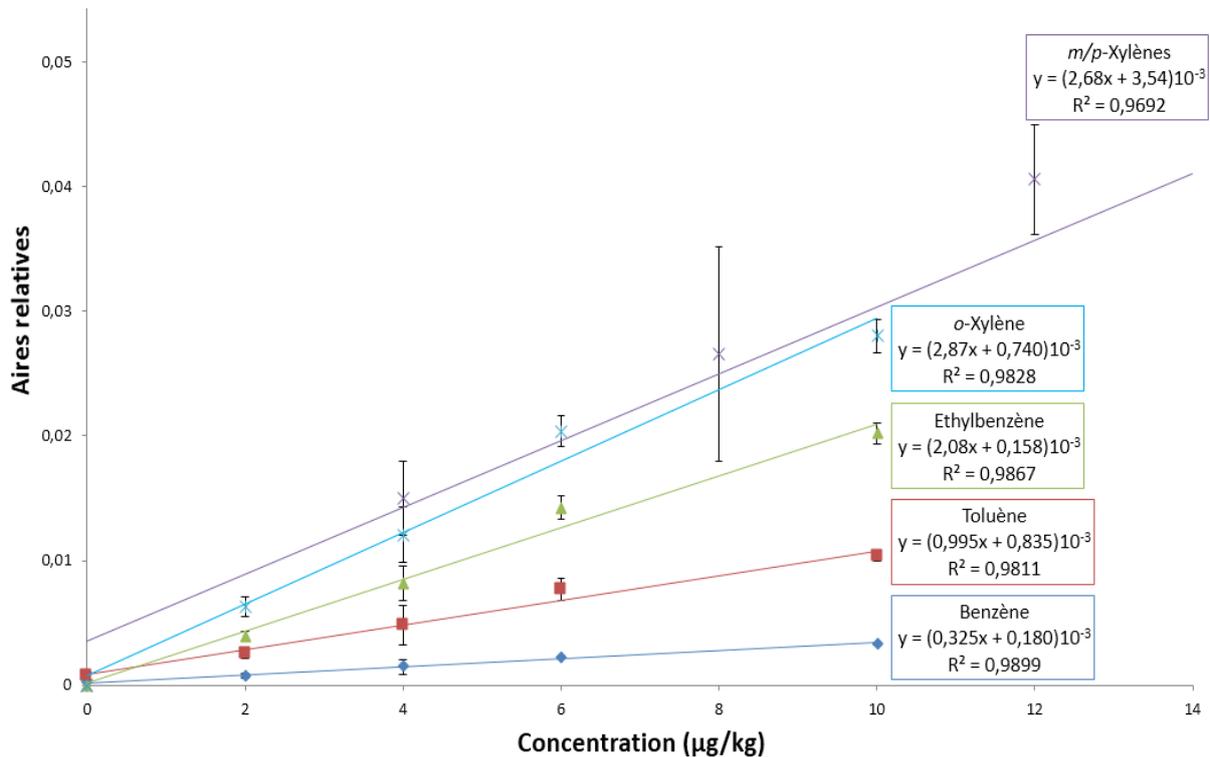


Figure 57 : Droites d'étalonnage pour les BTEX dans la poire avec la méthode HS-SPME 1

Gammes réalisées sur 6 points en triplicat : 0, 2, 4, 6, 8, et 10 µg/kg (excepté *m/p*-xylènes 0, 4, 8, 12, 16 et 20 µg/kg, les points à 16 et 20 µg/kg ne sont pas représentés)

Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les valeurs des 2 étalonnages réalisés

De la même façon que pour la pomme, la pente observée pour l'éthylbenzène avec la poire est environ 2 fois plus importante que celle du toluène qui est elle-même égale à environ 3 fois la pente obtenue pour le benzène. Les valeurs des pentes pour l'*o*-xylène et les *m/p*-xylènes sont proches et du même ordre de grandeur que celles observées avec la pomme (figure 56).

Les coefficients de détermination (R^2) obtenus pour l'étalonnage entre 0 et 10 µg/kg avec la méthode HS-SPME 1 et la poire comme matrice extraite sont compris entre 0,9692 pour les *m/p*-xylènes et 0,9899 pour le benzène. Ces valeurs de R^2 sont légèrement inférieures à celles trouvées avec la pomme, néanmoins, pour chaque point de gamme les mesures d'aires relatives avec la poire sont relativement peu dispersées. Elles sont cohérentes avec celles retrouvées généralement dans la littérature (Tankiewicz, 2013). Les pentes sont quant à elles proches de celles trouvées pour la pomme.

Globalement, pour les 5 composés analysés, il existe une relation linéaire entre la réponse obtenue en GC-MS et la quantité de BTEX introduite entre 0 et 10 µg/kg de masse fraîche. La méthode HS-SPME 1 est donc applicable à la détermination des BTEX dans la poire.

4.1.4.5. Détermination des limites de détection et quantification pour la méthode HS-SPME 1 avec la poire

Les LOD et LOQ déterminées pour la poire comme matrice sont présentées dans le tableau 29.

Tableau 29 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans la poire avec la méthode HS-SPME 1

	LOD	LOQ
	(µg/kg)	
Benzène	0,081	0,271
Toluène	0,026	0,086
Ethylbenzène	0,017	0,056
<i>m/p</i> -Xylènes	0,016	0,052
<i>o</i> -Xylène	0,013	0,043

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

Les LOD sont comprises entre 0,013 µg/kg de masse fraîche pour les *m/p*-xylènes et 0,081 µg/kg de masse fraîche pour le benzène. Pour les LOQ, les valeurs varient entre 0,043 et 0,271 µg/kg de masse fraîche. Ces valeurs sont cohérentes avec les LOD et LOQ retrouvées précédemment avec la pomme (tableau 28) et sont globalement plus faibles que les valeurs rencontrées dans la littérature pour les BTEX (Bianchin, 2012 ; Vichi, 2005).

Les LOD et les LOQ sont faibles et cohérentes pour une analyse de faibles quantités de BTEX dans la poire.

4.1.5. Validation de la méthode HS-SPME 2 pour différentes matrices fruitières

4.1.5.1. Validation de la méthode HS-SPME 2 avec la pomme

Le nonane est un étalon interne qui a été sélectionné pour sa stabilité, caractéristique non retrouvée avec les étalons deutérés en solution du fait des échanges proton-deutérium. Néanmoins, certains résultats (section 4.1.3.2 page 166) révèlent qu'une conservation à long terme des échantillons de pomme, additionnés de nonane et contenant des BTEX, est impossible. De longues étapes de conservation n'étant plus envisagées, la stabilité de l'étalon interne ne s'avère plus être une caractéristique indispensable. De plus, les résultats de répétabilité et de fidélité intermédiaire obtenus en HS-SPME 1 avec le nonane sont acceptables mais sont susceptibles d'être améliorés par l'utilisation d'un étalon interne de structure chimique, de volatilité et de capacité d'adsorption sur la fibre plus proche des analytes ciblés. Un nouvel étalon a donc été sélectionné. La méthode HS-SPME 1 utilisant le nonane comme étalon interne est remplacée par la méthode HS-SPME 2 qui se différencie de la première par l'utilisation de l'éthylbenzène-d10 comme étalon interne. L'éthylbenzène-d10 qui possède une structure similaire aux BTEX, doit posséder des caractéristiques d'extraction et d'adsorption proches de celles de l'éthylbenzène en HS-SPME.

L'éthylbenzène-d10 (t_R autour de 25,6 min) possède un temps de rétention proche de celui de l'éthylbenzène (t_R autour de 26 min). L'ion majoritaire utilisé pour la détection en SIM de l'éthylbenzène-d10 ($m/z = 116$) ne correspond à aucun des BTEX recherché, le pic de l'étalon interne ne se trouve pas co-élué avec les pics des composés d'intérêt ou des pics provenant des composés de la matrice fruitière (figure 58).

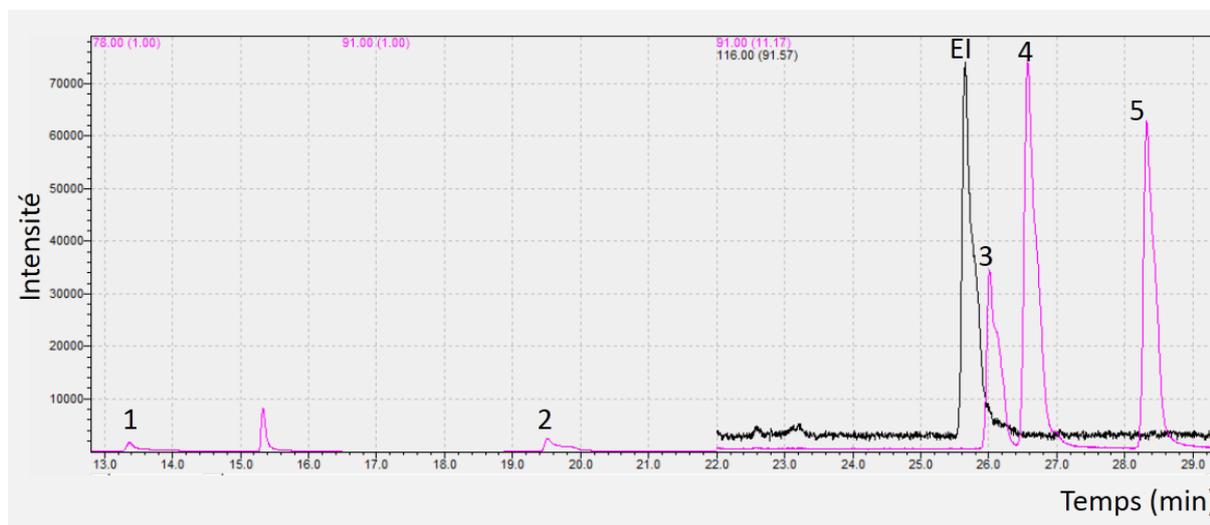


Figure 58 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS après l'analyse des BTEX à 10 µg/kg dans la pomme avec la méthode HS-SPME 2

Gradient de température : température initiale 40 °C maintenue 2 min ; 2 °C/min jusqu'à 55 °C maintenue 5 min ; 4 °C/min jusqu'à 100 °C maintenue 5 min ; 60 °C/min jusqu'à 200 °C ; 2 °C/min jusqu'à 250 °C ; 30 °C/min jusqu'à 300 °C maintenue 5 min.

Détection en mode SIM, présentation des ions de rapports $m/z=78$ (de 13 à 16,5 min), 91 (de 16,5 à 30 min) et 116 (de 22 à 30 min)

1 : benzène, 2 : toluène, 3 : éthylbenzène, 4 : *m/p*-xylènes, 5 : *o*-xylène

EI : étalon interne éthylbenzène-d10

La méthode d'extraction HS-SPME 2 utilisant l'éthylbenzène-d10 comme étalon interne doit être validée. Les essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire à 4 µg/kg ainsi que les droites d'étalonnage entre 0 et 10 µg/kg sont de nouveau effectués.

4.1.5.1.1. Répétabilité et fidélité intermédiaire pour la méthode HS-SPME 2 avec la pomme

Afin de valider la méthode HS-SPME 2, les essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont réalisés. Les résultats pour l'ensemble des BTEX sont présentés dans le tableau 30.

Tableau 30 : Coefficients de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire des BTEX avec la méthode HS-SPME 2

Composés	Répétabilité (n=4)	Fidélité intermédiaire (n=12)
	CV (%)	CV (%)
Benzène	4	12
Toluène	3	6
Ethylbenzène	3	6
<i>m/p</i> -Xylènes	3	21
<i>o</i> -Xylène	3	12

Essais réalisés avec la pomme additionnée de BTEX à 4 µg/kg, excepté pour les *m/p*-Xylènes (8 µg/kg) qui ne peuvent pas être dissociés lors de l'analyse par GC-MS

n : nombre d'échantillons analysés

CV : coefficient de variation

Les coefficients de variation obtenus pour les essais de répétabilité avec la méthode HS-SPME 2 sont compris entre 3 et 4 % alors que des résultats entre 6 et 11 % sont trouvés avec la méthode HS-SPME 1. La comparaison des tableaux 30 et 33 indique que la mise en place de l'étalon interne éthylbenzène-d10 permet d'améliorer les CV des essais de répétabilité, le seul paramètre ayant été modifié entre les deux techniques étant l'étalon interne.

Les CV déterminés après l'extraction par HS-SPME (5 réplicats) des BTEX présents entre 2 et 15 µg/L dans des échantillons d'eau sont compris entre 3 et 7 % (Menéndez, 2000). Les résultats des essais de répétabilité obtenus pour les BTEX avec la pomme sont donc comparables à ceux retrouvés pour l'eau qui est une matrice moins complexe.

En ce qui concerne la fidélité intermédiaire, le coefficient de variation le plus élevé obtenu dans la pomme avec la méthode HS-SPME 2 est de 21 % pour les *m/p*-xylènes (tableau 30). Cette valeur est similaire à celle observée pour les *m/p*-xylènes (20 %) avec la méthode HS-SPME 1 (tableau 27). Pour les autres composés, les CV de fidélité intermédiaire avec la méthode HS-SPME 2 varient entre 6 et 12 % (tableau 30). L'utilisation de l'éthylbenzène-d10 (méthode HS-SPME 2) permet d'améliorer les résultats de fidélité intermédiaire par rapport à ceux obtenus avec la méthode HS-SPME 1 puisque les CV étaient tous compris entre 10 et 19 % (tableau 27).

Les résultats de fidélité intermédiaire (tableau 30) sont cohérents avec les résultats de variabilité sur des jours différents (5 déterminations) présentés en HS-SPME pour le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes à 10 µg/kg dans des échantillons d'huile d'olive avec des CV jusqu'à 15 % (Vichi, 2005).

4.1.5.1.2. Réalisation des gammes d'étalonnage pour la méthode HS-SPME 2 avec la pomme

Les gammes d'étalonnage sont ensuite réalisées avec la méthode HS-SPME 2 entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Les droites obtenues sont présentées en figure 59.

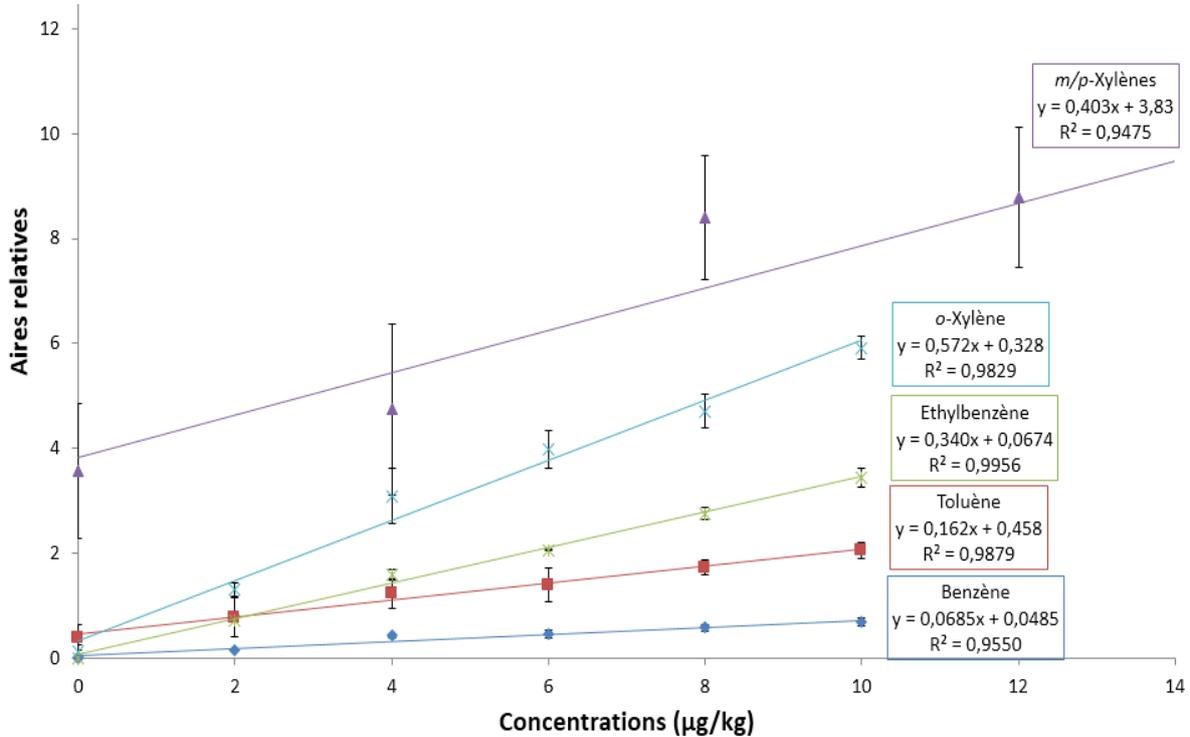


Figure 59 : Droites d'étalonnage pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 2

Gammes réalisées sur 6 points en triplicat : 0, 2, 4, 6, 8, et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (excepté *m/p*-xylènes 0, 4, 8, 12, 16 et 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, les points à 16 et 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ne sont pas représentés)

Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les valeurs des 3 étalonnages réalisés

Les coefficients de détermination (R^2) obtenus pour les BTEX avec la méthode HS-SPME 2 sont compris entre 0,9475 et 0,9956. Les plus faibles valeurs de R^2 sont observées pour les *m/p*-xylènes avec 0,9475 et le benzène avec 0,9550. Pour ces deux composés, les valeurs de R^2 sont inférieures à celles trouvées avec la méthode HS-SPME 1 (R^2 de 0,9856 pour les *m/p*-xylènes et 0,9694 pour le benzène, figure 56). Pour le toluène, l'éthylbenzène et l'*o*-xylène, les R^2 , 0,9879, 0,9956 et 0,9829 respectivement, sont comparables à ceux de la méthode HS-SPME 1 (R^2 de 0,9898, 0,9926 et 0,9829 respectivement).

Les valeurs des pentes obtenues pour les BTEX avec la méthode HS-SPME 2 ne peuvent pas être comparées à celles de la méthode HS-SPME 1 en raison du changement d'étalon interne induisant des facteurs de réponse différents. Néanmoins, les pentes conservent globalement le même ordre avec la plus faible valeur observée pour le benzène suivi du toluène (2 fois la pente du benzène), puis de l'éthylbenzène (2 fois la pente du toluène). Ce résultat indique que l'extraction des BTEX n'a pas été modifiée par le changement d'étalon interne effectué entre la méthode HS-SPME 1 et la méthode HS-SPME 2.

Les ordonnées à l'origine (point à 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) assez élevées, (figure 59) indique une présence significative des *m/p*-xylènes et du toluène dans les pommes provenant du supermarché. Ces

deux composés étaient observés en proportions moins importantes lors de la réalisation des gammes d'étalonnage avec la méthode HS-SPME 1 (figure 56). Les pommes provenant du supermarché possèdent donc un contenu en BTEX susceptible de varier d'un achat à l'autre.

4.1.5.1.3. Détermination des limites de détection et de quantification pour la méthode HS-SPME 2 avec la pomme

Les limites de détection et de quantification déterminées pour chaque BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 2 sont présentées dans le tableau 31.

Tableau 31 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 2

Composés	LOD	LOQ
	(µg/kg)	
Benzène	0,097	0,323
Toluène	0,043	0,144
Ethylbenzène	0,028	0,094
<i>m/p</i> -Xylènes	0,024	0,079
<i>o</i> -Xylène	0,017	0,058

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

Les LOD varient entre 0,017 µg/kg w.w. pour l'*o*-xylène et 0,097 µg/kg w.w. pour le benzène. En ce qui concerne les LOQ, elles varient entre 0,058 et 0,323 µg/kg w.w. pour les *o*-xylènes et le benzène, respectivement (tableau 31). Ces valeurs sont globalement similaires à celles obtenues pour la pomme avec la méthode HS-SPME 1 dont les LOD varient de 0,007 à 0,065 µg/kg w.w. et de 0,022 à 0,217 µg/kg w.w. pour les LOQ (tableau 28). La seule modification de l'étalon interne (passage du nonane pour la méthode HS-SPME 1 à l'éthylbenzène-d10 pour la méthode HS-SPME 2) n'a pas d'influence sur les valeurs des LOD et LOQ qui sont liées aux caractéristiques d'extraction et de détection individuelles de chaque BTEX.

4.1.5.2. Validation de la méthode HS-SPME 2 avec d'autres matrices fruitières

La méthode HS-SPME 2 est ensuite appliquée à diverses matrices fruitières. La pomme, la poire, la prune et le raisin sont des fruits sélectionnés pour leurs caractéristiques différentes. Ils présentent notamment des teneurs variables en eau et certains possèdent des pépins alors que d'autres ont un noyau. L'expérimentation vise une large gamme de fruits afin d'envisager une application méthodologique quel que soit le type de fruit.

4.1.5.2.1. Réalisation des gammes d'étalonnage avec la méthode HS-SPME 2 pour diverses matrices fruitières

De la même façon que pour la pomme, des gammes d'étalonnage entre 0 et 10 µg/kg sont réalisées au moyen de la méthode HS-SPME 2 en triplicat avec la poire, la prune et le raisin. Les pentes et les coefficients de détermination des droites de régression linéaire obtenues avec les différents fruits sont comparés à ceux déterminés pour la pomme dans le tableau 32.

Tableau 32 : Comparaison des données de linéarité obtenues dans les différentes matrices fruitières avec la méthode HS-SPME 2

Composés	Pomme		Poire		Prune		Raisin	
	Pente	R ²	Pente	R ²	Pente	R ²	Pente	R ²
Benzène	0,0685 ^a	0,9550	0,0585 ^a	0,9851	0,0567 ^a	0,9766	0,0912	0,9875
Toluène	0,162 ^a	0,9879	0,179 ^{a, b}	0,9604	0,184 ^{a, b}	0,9956	0,230 ^b	0,9957
Ethylbenzène	0,340 ^a	0,9956	0,375 ^{a, b}	0,9993	0,410 ^b	0,9978	0,401 ^b	0,9980
<i>m/p</i> -Xylènes	0,403 ^a	0,9475	0,440 ^a	0,9787	0,502 ^a	0,9978	0,438 ^a	0,9964
<i>o</i> -Xylène	0,572 ^a	0,9829	0,649 ^{a, b}	0,9971	0,726 ^{b, c}	0,9980	0,793 ^c	0,9954

Déterminés à partir de 6 points de concentrations en triplicat : 0, 2, 4, 6, 8, et 10 µg/kg (excepté *m/p*-xylènes 0, 4, 8, 12, 16 et 20 µg/kg)

a, b, c: pour chaque composé, deux pentes avec au moins une lettre similaires ne sont pas significativement différentes ; méthode : 95% Tukey HSD (honest significant difference)

Pour chaque fruit, la linéarité de l'étalonnage est cohérente avec les valeurs des coefficients de détermination obtenus précédemment, les R² étant compris entre 0,947 et 0,999 (tableau 32).

Un test ANOVA est appliqué pour permettre la comparaison statistique des pentes obtenues avec les différents fruits. Pour le benzène et le toluène, la pente obtenue avec la pomme n'est pas significativement différente (à 95 %) de celles déterminées pour la poire ou la prune. En ce qui concerne le raisin, il n'y a pas, pour le toluène, de différence significative (à 95 %) entre les pentes obtenues avec la prune ou la poire. Pour l'éthylbenzène, les pentes obtenues avec la poire et la pomme ne sont pas significativement différentes, de même en ce qui concerne les pentes pour la poire, la prune et le raisin.

Pour les *m/p*-xylènes, il n'y a pas de différence significative (95 %) entre les pentes des différentes matrices fruitières.

Néanmoins, des valeurs pour certains facteurs de réponse (pentes) peuvent présenter quelques différences. La pente observée pour le benzène dans le raisin est par exemple significativement différente de celles obtenues avec les 3 autres fruits.

La matrice semble avoir une faible influence sur l'adsorption des analytes sur le support d'extraction ainsi que sur l'équilibre entre l'échantillon et l'espace de tête.

Les pentes observées pour le raisin sont généralement un peu plus élevées que pour les autres fruits. Il peut être envisagé que le broyat, plus aqueux, obtenu avec le raisin soit à l'origine d'un déplacement de l'équilibre favorable à l'extraction dans l'espace de tête.

Globalement, pour un composé donné, les pentes sont de même ordre de grandeur. Le calcul d'une valeur de pente moyenne à partir des résultats des 4 fruits pourrait être envisagé afin de permettre une estimation de la quantité de chaque BTEX dans n'importe quelle matrice fruitière.

La méthode HS-SPME 2 est adaptée à la détermination des BTEX dans les différentes matrices fruitières étudiées entre 0 et 10 µg/kg. Chacune des pentes obtenues (tableau 32) sera appliquée aux échantillons exposés aux émissions d'un moteur diesel (section 4.2.4 page 196) afin de déterminer la quantité de BTEX présente dans chaque fruit.

4.1.5.2.2. Détermination des limites de détection et quantification pour la méthode HS-SPME 2 pour diverses matrices fruitières

Les LOD et LOQ sont déterminées avec la méthode HS-SPME 2 pour chaque fruit (tableau 33).

Tableau 33 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans les différentes matrices fruitières avec la méthode HS-SPME 2

Composés	Pomme		Poire		Prune		Raisin	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
	(µg/kg)							
Benzène	0,097	0,323	0,148	0,494	0,152	0,508	0,183	0,610
Toluène	0,043	0,144	0,041	0,137	0,037	0,124	0,057	0,191
Ethylbenzène	0,028	0,094	0,029	0,095	0,020	0,067	0,036	0,120
<i>m/p</i> -Xylènes	0,024	0,079	0,022	0,074	0,019	0,063	0,029	0,096
<i>o</i> -Xylène	0,017	0,058	0,018	0,058	0,014	0,045	0,020	0,068

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

Les LOD varient de 0,014 µg/kg de masse fraîche pour l'*o*-xylène dans la prune à 0,183 µg/kg (w.w.) pour le benzène dans le raisin. Les LOQ sont compris entre 0,045 et 0,610 µg/kg (w.w.) (tableau 33).

Pour l'*o*-xylène une très faible différence entre les limites (LOD et LOQ) est observée avec le changement de matrice fruitière. De même, pour le toluène, l'éthylbenzène, et les *m/p*-xylènes les limites trouvées avec la pomme, la poire et la prune sont proches. Pour le benzène, les limites les plus faibles sont obtenues avec la pomme et les plus fortes sont observées avec le raisin ; en ce qui concerne la poire et la prune les limites obtenues pour le benzène sont similaires.

Globalement, les limites déterminées avec le raisin sont légèrement plus élevées qu'avec les autres matrices fruitières étudiées.

Les faibles valeurs des LOD et LOQ permettent d'envisager la quantification, dans une large gamme de fruits, de teneurs inférieures à 0,2 µg/kg (0,2 ppb) pour l'ensemble des BTEX à l'exception du benzène (LOD = 0,183 µg/kg avec le raisin) qui reste néanmoins détecté à cette concentration.

4.1.6. Mise en place et évaluation d'un nouveau support d'extraction en HS-SPME pour l'analyse des BTEX dans la pomme

Les coefficients de variations obtenus pour la fidélité intermédiaire au moyen des méthodes HS-SPME 1 et HS-SPME 2, peuvent atteindre jusqu'à 20 % pour quelques BTEX. Une nouvelle méthodologie par HS-SPME est donc recherchée afin d'une part de réduire ces variations mais aussi d'obtenir des limites de quantification inférieures à 0,1 µg/kg, concentrations pouvant être retrouvées dans certains échantillons (Górna-Binkul 1996). D'une autre part, la nouvelle méthodologie par HS-SPME visera à associer l'analyse des BTEX à celle des HAP légers (section 5.1.2.3, page 218).

4.1.6.1. Essais de revêtements PDMS pour la fibre utilisée en micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête

Les fibres possédant des revêtements carboxen/polydiméthylsiloxane (CAR/PDMS) et polydiméthylsiloxane (PDMS) sont les plus utilisées pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques (Bianchin, 2012 ; Ezquerro, 2004 ; Menéndez, 2000). Des fibres avec un revêtement PDMS de 30 et de 100 µm d'épaisseur sont testées pour l'extraction d'une même pomme additionnée en BTEX à 10 µg/kg. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec une fibre CAR/PDMS de 75 µm utilisée avec la méthode HS-SPME 2 (tableau 34).

Tableau 34 : Comparaison des aires brutes obtenues après extraction des BTEX d'une pomme polluée à 10 µg/kg avec la méthode HS-SPME 2 utilisant des revêtements de fibres différents

	Revêtement de fibre					
	CAR/PDMS 75 µm		PDMS 30 µm		PDMS 100 µm	
	aire brutes	S/N	aire brutes	S/N	aire brutes	S/N
Benzène	8368	350	2374	90	10382	543
Toluène	24624	712	5082	232	24716	1270
Ethylbenzène	41263	1381	14143	544	62122	2233
Ethylbenzène-d10	11957	470	3327	134	14346	649
<i>m/p</i> -Xylènes	138036	2784	24137	802	107184	3376
<i>o</i> -Xylène	70796	1673	13811	433	59760	1780

Les aires brutes présentées correspondent aux moyennes de 3 déterminations

S/N : rapport signal du composé sur le bruit de fond

L'utilisation d'une fibre comportant un revêtement PDMS de 30 µm d'épaisseur conduit à l'obtention d'aires brutes 3 à 5 fois inférieures à celles observées avec une fibre CAR/PDMS de 75 µm d'épaisseur. De même, les valeurs des rapports signal/bruit sont environ 3 fois moins importantes avec la fibre PDMS d'épaisseur 30 µm qu'avec la fibre CAR/PDMS d'épaisseur 75 µm (tableau 34). Les essais étant réalisés avec un échantillon de pomme additionné à 10 µg/kg, des difficultés de détection des BTEX à des concentrations inférieures peuvent être envisagées.

La comparaison des résultats obtenus avec les deux fibres PDMS d'épaisseurs 30 et 100 µm confirme que les revêtements plus épais sont plus appropriés à l'extraction des composés volatils que les revêtements fins (Kataoka, 2000 ; King, 2003). Des résultats similaires sont

observés pour les HAP dans l'eau avec des aires plus importantes obtenues avec une fibre PDMS d'épaisseur 100 μm qu'avec des fibres PDMS d'épaisseur 7 et 30 μm (Doong, 2000).

Les aires brutes obtenues sont globalement du même ordre de grandeur pour une fibre CAR/PDMS de 75 μm d'épaisseur et pour une fibre PDMS de 100 μm d'épaisseur (tableau 35). Néanmoins, une amélioration significative du rapport signal/bruit (S/N) est observée pour un revêtement PDMS de 100 μm d'épaisseur. Le gain, pour cet indicateur, est très appréciable par rapport au revêtement CAR/PDMS de 75 μm d'épaisseur (+6 % pour l'*o*-xylène et jusqu'à +80 % pour le toluène). Il est possible de considérer que le support PDMS seul permet d'obtenir un bruit de fond analytique moins important ; ceci pouvant être dû à une co-extraction moindre d'autres éléments volatils contenus dans la pomme broyée.

L'ensemble des résultats présentés pour les méthodes HS-SPME 1 et 2 (sections 4.1.4 et 4.1.5) confirme qu'un revêtement CAR/PDMS est adapté à l'extraction des BTEX mais qu'un revêtement PDMS de 100 μm d'épaisseur peut permettre l'obtention de meilleures limites de détection et de quantification.

En conséquence, le support d'extraction PDMS d'épaisseur 100 μm est amené à être validé pour l'extraction des BTEX avec la méthode HS-SPME 3.

4.1.6.2. Validation du revêtement PDMS 100 μm comme support d'extraction en HS-SPME

La première étape de la validation de la méthode HS-SPME 3, utilisant une fibre PDMS d'épaisseur 100 μm , consiste à réaliser les essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire avec un échantillon de pomme additionnée en BTEX à 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 35.

Tableau 35 : Coefficients de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire des BTEX avec la méthode HS-SPME 3

Composés	Répétabilité (n=3)	Fidélité intermédiaire (n=9)
	CV (%)	CV (%)
Benzène	6	7
Toluène	7	8
Ethylbenzène	2	5
<i>m/p</i> -Xylènes	3	6
<i>o</i> -Xylène	3	6

Essais réalisés avec la pomme additionnée de BTEX à 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, excepté pour les *m/p*-Xylènes (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) qui ne peuvent pas être dissociés lors de l'analyse par GC-MS

n : nombre d'échantillons analysés

CV : coefficient de variation

Les coefficients de variation obtenus lors des essais de répétabilité sont compris entre 2 % pour l'éthylbenzène et 7 % pour le toluène (tableau 35). Des CV de répétabilité plus

importants sont observés pour le benzène et le toluène, respectivement 6 et 7 %. En ce qui concerne les autres BTEX, les résultats de répétabilité sont comparables à ceux obtenus avec la méthode HS-SPME 2 pour laquelle les CV sont de 3 % (tableau 30).

Pour la fidélité intermédiaire les valeurs des CV obtenus avec la méthode HS-SPME 3 pour les BTEX dans la pomme varient de 5 à 8 % (tableau 35) alors qu'ils atteignent jusqu'à 21 % avec la méthode HS-SPME 2 (tableau 30). Globalement, la variabilité d'adsorption des BTEX sur la fibre PDMS (épaisseur 100 µm) semble moins importante que sur la fibre CAR/PDMS (épaisseur 75 µm).

La méthode HS-SPME 3 permet donc d'obtenir des résultats répétables ainsi que de très bonnes fidélités intermédiaires.

4.1.6.3. Réalisation des gammes d'étalonnage pour la méthode HS-SPME 3 avec la pomme

La linéarité au moyen d'une fibre PDMS d'épaisseur 100 µm (méthode HS-SPME 3) est testée au moyen de gammes d'étalonnage entre 0 et 10 µg/kg.

De très faibles présences en BTEX ayant été constatées pour certains fruits testés (section 4.2), des points à 0,2, 0,5 et 1 µg/kg sont ajoutés pour réaliser les gammes d'étalonnage avec la méthode HS-SPME 3 (figure 60).

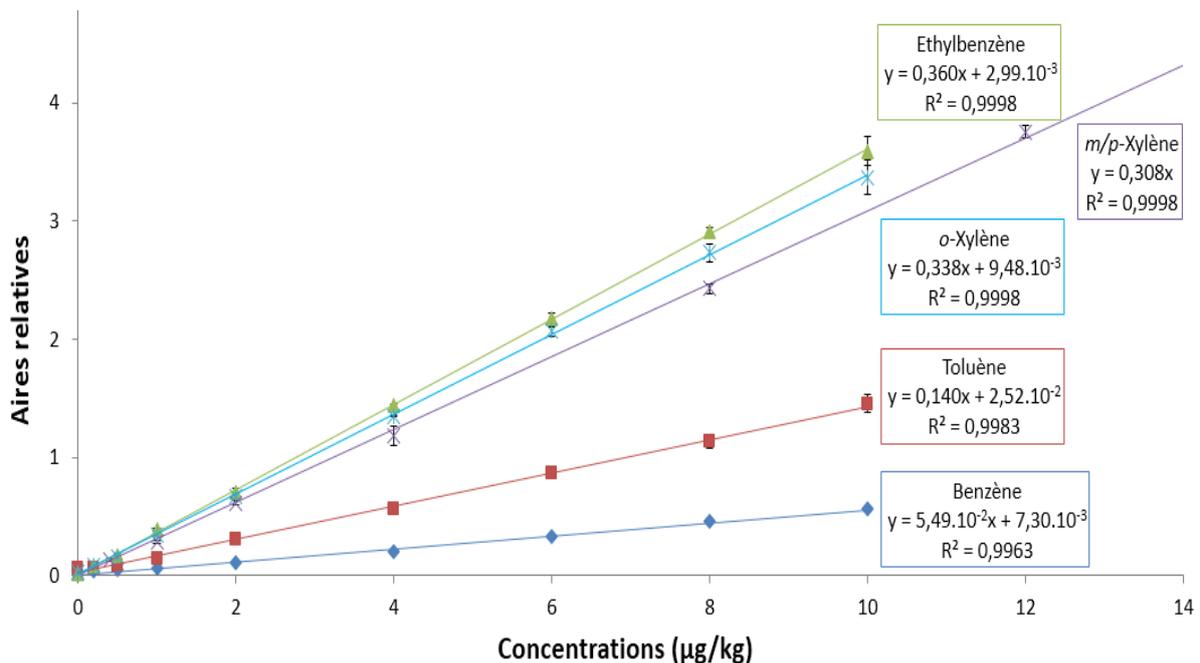


Figure 60 : Droites d'étalonnage pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 3

Gammes réalisées sur 9 points en triplicat : 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, et 10 µg/kg (excepté m/p-xylènes 0, 0,4, 1, 2, 4, 8, 12, 16 et 20 µg/kg, les points à 16 et 20 µg/kg ne sont pas représentés)

Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les valeurs des 3 étalonnages réalisés

Pour chaque concentration étudiée (figure 60), des barres d'erreur réduites sont obtenues par rapport à celles observées lors de la réalisation des gammes d'étalonnage avec les méthodes HS-SPME 1 et HS-SPME 2 (figures 55 et 60). Ce résultat confirme la plus faible variabilité d'adsorption sur la fibre PDMS que sur la fibre CAR/PDMS.

Les ordonnées à l'origine (points à 0 µg/kg) des droites de la figure 60 sont quasi nulles voire même nulle pour les *m/p*-xylènes. Les BTEX peuvent donc être considérés comme absents des pommes utilisées pour réaliser l'étalonnage avec la méthode HS-SPME 3.

Avec la méthode HS-SPME 3, le benzène reste le composé présentant la plus faible valeur de pente comme pour les méthodes HS-SPME 1 et 2 et la pente du toluène est environ 2 fois supérieure à celle du benzène. Les pentes obtenues pour l'*o*-xylène et les *m/p*-xylènes avec la méthode HS-SPME 3 sont très proches avec 0,338 et 0,308 respectivement (figure 60). L'éthylbenzène est le composé ayant la pente la plus importante en HS-SPME 3 avec 0,360 (figure 60). Pour les méthodes HS-SPME 1 et 2, ce sont les xylènes (*o*-xylène et *m/p*-xylènes) qui présentent les pentes les plus élevées, ce qui indique une différence d'adsorption sur les fibres CAR/PDMS et PDMS.

Pour les méthodes HS-SPME 2 et HS-SPME 3, les pentes obtenues pour l'éthylbenzène sont proches avec 0,360 et 0,340 respectivement, ce qui s'explique par le fait que les gammes d'étalonnage sont établies à partir des aires relatives et donc du rapport de chaque composé à l'étalon interne qui est l'éthylbenzène-d10 dans le cas des méthodes HS-SPME 2 et HS-SPME 3. L'éthylbenzène et l'éthylbenzène-d10 sont, de plus, des composés ayant des caractéristiques physico-chimiques quasi similaires et notamment des volatilités et des capacités d'adsorption très proches.

Les données de linéarité de la figure 60 sont reprises dans les deux premières colonnes du tableau 36. Les pentes des droites d'étalonnage établies avec des BTEX à 9 concentrations entre 0 et 10 µg/kg seront utilisées pour déterminer les quantités en BTEX dans les pommes récoltées en Normandie ainsi que dans les pommes exposées aux fumées de combustion de biomasse.

Le tableau 36 présente également les pentes et les R² pour des droites d'étalonnage avec 6 points de concentrations entre 0 et 10 µg/kg pour les BTEX afin de permettre la comparaison avec les précédents résultats des méthodes HS-SPME 1 et HS-SPME 2.

Tableau 36 : Données de linéarité obtenues pour les BTEX de 0 à 10 µg/kg dans la pomme avec la méthode HS-SPME 3

	Données de linéarité entre 0 et 10 µg/kg			
	9 points de gamme ^a		6 points de gamme ^b	
	R ²	pente	R ²	pente
Benzène	0,9963	0,0549	0,9974	0,0559
Toluène	0,9983	0,140	0,9981	0,139
Ethylbenzène	0,9998	0,360	0,9998	0,360
<i>m/p</i> -Xylènes	0,9998	0,308	0,9997	0,308
<i>o</i> -Xylène	0,9998	0,338	0,9997	0,337

^a gamme réalisée sur 9 points en triplicat : additions des points à 0,2, 0,5 et 1 à la gamme réalisée sur 6 points : 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg/kg (pour les *m/p*-xylènes points à 0, 0,4, 1, 2, 4, 8, 12, 16 et 20 µg/kg)

^b gamme réalisée sur 6 points en triplicat : 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg/kg (excepté *m/p*-xylènes 0, 4, 8, 12, 16 et 20 µg/kg)

La comparaison des données de linéarité avec les 6 et les 9 points de gamme (tableau 36) montre tout d'abord le bon alignement des points en bas de gamme (0,2 à 1 µg/kg) avec le reste des points. Les pentes et les R^2 ne sont que très peu modifiés par l'ajout des points réalisés à de faibles concentrations.

Les R^2 obtenus avec la méthode HS-SPME 3 sont compris entre 0,9974 pour le benzène et 0,9998 pour l'éthylbenzène (tableau 36). Ces valeurs sont plus élevées que celles trouvées avec les autres méthodes puisque le R^2 maximal avec la méthode HS-SPME 1 est de 0,9926 et de 0,9956 avec la méthode HS-SPME 2.

La méthode HS-SPME 3 permet donc d'obtenir des résultats linéaires entre 0 et 10 µg/kg.

4.1.6.4. Détermination des limites de détection et de quantification pour la méthode HS-SPME 3 avec la pomme

Les limites de détection et de quantification sont ensuite déterminées pour chaque BTEX avec la méthode HS-SPME 3, les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans le tableau 37.

Tableau 37 : Limites de détection et de quantification pour les BTEX dans la pomme avec la méthode HS-SPME 3

	LOD	LOQ
	(µg/kg)	
Benzène	0,038	0,128
Toluène	0,014	0,048
Ethylbenzène	0,008	0,026
<i>m/p</i> -Xylènes	0,012	0,038
<i>o</i> -Xylène	0,009	0,030

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

Les LOD varient entre 0,008 µg/kg w.w. pour l'éthylbenzène et 0,038 µg/kg w.w. pour le benzène. Ces valeurs sont légèrement inférieures (d'un facteur 2 environ) à celles déterminées pour la méthode HS-SPME 1 (0,011 à 0,065 µg/kg) et la méthode HS-SPME 2 (0,017 à 0,097 µg/kg). Il en est de même pour les LOQ avec la méthode HS-SPME 3 dont les valeurs sont comprises entre 0,017 pour les *m/p*-xylènes et 0,128 µg/kg w.w. pour le benzène respectivement (tableau 37) contre 0,036 à 0,217 µg/kg avec la méthode HS-SPME 1 et 0,058 à 0,323 µg/kg avec la méthode HS-SPME 2. La méthodologie d'extraction des BTEX avec la fibre PDMS est plus sensible qu'avec la fibre CAR/PDMS.

Les faibles valeurs des LOD et LOQ permettent d'envisager la quantification de faibles teneurs de BTEX (jusqu'à 0,1 µg/kg) dans les échantillons de pommes.

4.1.7. Comparaison des performances des méthodes HS-SPME avec la pomme

Trois méthodes HS-SPME ont été développées et validées pour la détermination des BTEX dans les pommes. Les performances de chacune d'entre-elles sont comparées (tableau 38) puis confrontées aux performances de méthodes disponibles dans la littérature. Le peu de

données, dans la littérature, concernant la validation de méthodologies permettant la détermination des BTEX dans les fruits a mené à étendre la comparaison des résultats expérimentaux à ceux obtenus avec d'autres matrices.

Tableau 38 : Comparaison des performances des différentes méthodes développées pour l'analyse des BTEX dans la pomme par HS-SPME

Méthode	<u>HS-SPME 1</u>	<u>HS-SPME 2</u>	<u>HS-SPME 3</u>
Fibre	CAR/PDMS 75 µm	CAR/PDMS 75 µm	PDMS 100 µm
Etalon interne	nonane	Ethylbenzène-d10	Ethylbenzène-d10
Répétabilité ^a (CV %)	6-11	3-4*	2-7
Fidélité intermédiaire ^b (CV %)	10-20	6-21*	5-8
Linéarité R ²	0,9694-0,9926 ^c	0,9475-0,9956 ^c	0,9974-0,9998 ^c 0,9963-0,9998 ^d
LOD (µg/kg)	0,011-0,065	0,017-0,097	0,008-0,038
LOQ (µg/kg)	0,036-0,217	0,058-0,323	0,026-0,128

^a test réalisé avec des BTEX à 4 µg/kg w.w. dans la pomme (excepté *m/p*-xylènes à 8 µg/kg), 3 déterminations (n=3)

^b test réalisé avec des BTEX à 4 µg/kg w.w. dans la pomme (excepté *m/p*-xylènes à 8 µg/kg), 9 déterminations (n=9)

* n=4 pour la répétabilité et n=12 pour la fidélité intermédiaire

^c gamme réalisée sur 6 points en triplicat : 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg/kg (excepté *m/p*-xylènes 0, 4, 8, 12, 16 et 20 µg/kg)

^d gamme réalisée sur 9 points en triplicat : 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, et 10 µg/kg (excepté *m/p*-xylènes 0, 0,4, 1, 2, 4, 8, 12, 16 et 20 µg/kg)

CV : coefficient de variation

R² : coefficient de détermination de la régression linéaire appliquée à l'étalonnage

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

Comparaison des résultats de répétabilité et de fidélité intermédiaire en HS-SPME avec la pomme

Les coefficients de variation (CV) obtenus pour la répétabilité en HS-SPME varient entre 2 et 11 % (tableau 38). Les méthodes HS-SPME 2 et HS-SPME 3 présentent les plus faibles CV avec une valeur autour de 3 % pour la plupart des BTEX.

En ce qui concerne la fidélité intermédiaire les CV en HS-SPME sont compris entre 5 et 21 % (tableau 38). La méthode HS-SPME 3 est celle présentant les plus faibles variations avec un CV maximal de 8 %.

Les coefficients de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire dépendent du nombre de réplicats, de la concentration utilisée pour réaliser les tests mais également de la méthode et de la matrice d'extraction. Pour les essais de répétabilité en HS-SPME avec la pomme, les BTEX sont soumis à 3 déterminations (excepté pour la méthode HS-SPME 2 avec 4 déterminations). Dans la littérature, entre 5 et 8 réplicats servent généralement à la réalisation des tests de répétabilité pour les BTEX (Bianchin, 2012 ; Gilbert-López, 2010 ; Vichi, 2005). Des essais de répétabilité utilisant 3 réplicats permettent d'obtenir des CV compris entre 3,2 et 6,9% pour les BTEX (66-260 ng) contenu dans des échantillons de sol

extraits par HS-SPME (étapes multiples) (Ezquerro, 2004). Ces valeurs cohérentes avec celles obtenues pour la répétabilité des méthodes HS-SPME 2 et HS-SPME 3 (tableau 17).

Les coefficients de variation pour les essais de répétabilité sont généralement plus importants lorsque la concentration testée est faible. Les coefficients de variation obtenus en HS-SPME pour la répétabilité (5 déterminations) par Tankiewicz *et al.* pour les BTEX à 200 µg/L dans l'eau sont compris entre 2,6 et 8,7 % alors que pour Bianchin *et al.* ils atteignent jusqu'à 16,2 % pour un échantillon d'eau contenant des BTEX à 1 µg/L (Bianchin, 2012 ; Tankiewicz, 2013). Les CV obtenus avec les différentes méthodes HS-SPME appliquées aux BTEX à 4 µg/kg dans la pomme (tableau 38) sont globalement inférieurs à ceux obtenus pour les BTEX à 1 µg/L dans l'eau.

En ce qui concerne la fidélité intermédiaire des méthodes étudiant les BTEX très peu de résultats sont disponibles dans la littérature. Une étude menée sur des échantillons d'huile d'olive en HS-SPME a estimé la variabilité des déterminations sur des journées différentes (5 déterminations) pour le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes à 10 µg/kg et obtient des CV entre 4 et 15 % (Vichi, 2005). Ces résultats sont globalement comparables avec ceux observés pour les essais de précision intermédiaire en HS-SPME pour les BTEX dans la pomme puisque seuls les CV obtenus pour le benzène en HS-SPME 1 et pour les *m/p*-xylènes avec les méthodes HS-SPME 1 et 2 excèdent 15 %.

Les coefficients de variations trouvés en répétabilité et fidélité intermédiaire avec les 3 méthodes développées en HS-SPME sont cohérents avec ceux rencontrés pour les BTEX dans la littérature sur d'autres matrices. L'ensemble des conditions opératoires optimisées permet de limiter la variabilité des résultats et la détermination des concentrations en BTEX dans la pomme est ainsi possible avec de faibles incertitudes pour des valeurs de l'ordre de 4 µg/kg.

Comparaison des limites de détection et de quantification en HS-SPME avec la pomme

Les limites de détection (LOD) déterminées pour les méthodes HS-SPME avec les BTEX dans la pomme varient de 0,008 à 0,097 µg/kg (w.w.) (tableau 38). Les limites de quantification (LOQ) sont quant-à-elles comprises entre 0,026 et 0,323 µg/kg (w.w.) (tableau 38).

Les valeurs sont plus faibles pour la méthode HS-SPME 3 avec des LOD et LOQ inférieures à 0,04 et à 0,2 µg/kg (w.w.) respectivement (tableau 38). Pour l'ensemble des méthodes HS-SPME optimisées, les valeurs des LOD et des LOQ sont faibles et restent globalement de même ordre de grandeur.

Dans la littérature, des méthodes d'extraction (HS-SPME) et d'analyse (GC-MS) similaires permettent d'obtenir des LOD entre 0,07 et 0,32 µg/L pour les BTEX dans des échantillons d'eau (Bianchin, 2012). Les LOD et LOQ déterminées en HS-SPME pour la pomme sont faibles comparées à celles rencontrées dans d'autres matrices complexes. Dans les olives, le couplage d'une extraction dans l'espace de tête de l'échantillon et de l'analyse en GC-MS permet pour les BTEX des LOD comprises entre 0,1 et 7,4 µg/kg de masse fraîche et des LOQ de 0,4 à 24,4 µg/kg de masse fraîche (Gilbert-López, 2010).

L'extraction réalisée dans l'espace de tête au-dessus de l'échantillon permet de réduire le bruit de fond en minimisant l'extraction de composés peu volatils de la matrice. Les revêtements CAR/PDMS et PDMS se sont montrés adaptés à l'extraction des BTEX et permettent leur extraction sélective. Les faibles valeurs de LOD et LOQ attestent de la qualité de l'extraction et de la détection des BTEX. L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse permet l'obtention de pics résolus. Cette résolution se trouve encore améliorée par l'application d'une programmation de température adaptée. Les ratios signal sur bruit sont largement améliorés par l'utilisation du mode SIM qui permet la détection d'ions spécifiques aux composés d'intérêt.

Les faibles valeurs pour les LOD et LOQ sont nécessaires à l'étude des BTEX à l'état de traces.

Comparaison des données de linéarité en HS-SPME avec la pomme

Les coefficients de détermination R^2 obtenus lors de l'étalonnage des BTEX entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans la pomme avec les méthodes HS-SPME varient entre 0,9475 et 0,9998 (tableau 38).

La méthode présentant les meilleurs R^2 est la méthode HS-SPME 3 avec des valeurs comprises entre 0,9974 et 0,9998 (tableau 38).

La comparaison des données de linéarité avec celles d'autres études est entravée par le manque d'information sur les concentrations et le nombre de points utilisés pour réaliser les gammes d'étalonnage. Néanmoins, des R^2 entre 0,986 et 0,999 sont généralement rencontrés pour les BTEX dans différentes matrices (Bianchin, 2012 ; Ezquerro, 2004 ; Gilbert-López, 2010 ; Tankiewicz, 2013).

Parmi les données expérimentales obtenues en HS-SPME dans la pomme (tableau 38), le plus faible R^2 est obtenu pour les *m/p*-xylènes avec la méthode HS-SPME 2. Néanmoins, la valeur médiane pour les R^2 avec la méthode HS-SPME 1 est de 0,9856, de 0,9829 pour la méthode HS-SPME 2 et atteint 0,9997 pour la méthode HS-SPME 3. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés en HS-SPME dans un produit alimentaire tel que l'huile d'olive où selon Vichi *et al.* la valeur la plus faible du coefficient R est de 0,988 pour le toluène (Vichi, 2005).

Conclusion sur les méthodes HS-SPME appliquées à la pomme

L'ensemble des performances des 3 méthodes HS-SPME optimisées pour la détermination des BTEX à l'état de traces dans les échantillons de pommes est représenté sur un diagramme en radar afin de permettre leur comparaison (figure 61).

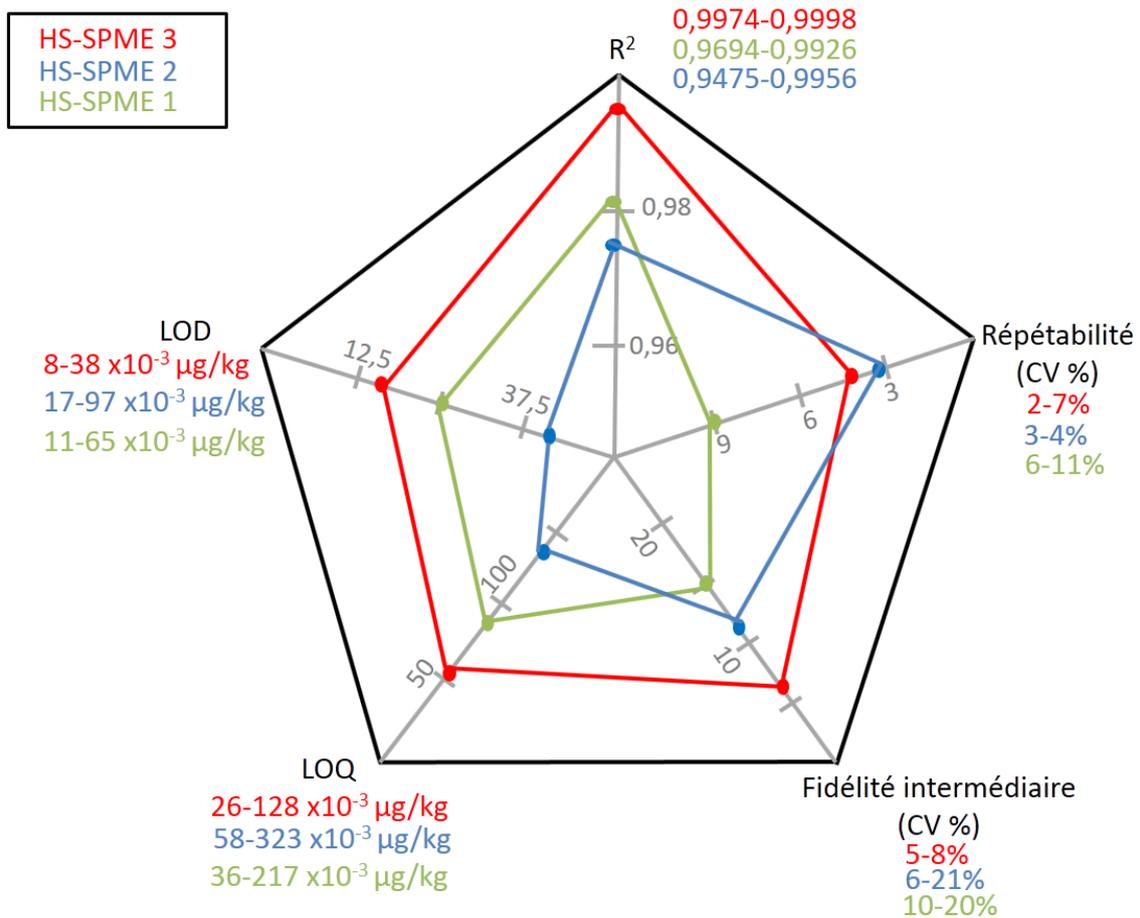


Figure 61 : Diagramme en radar comparatif des performances des méthodes HS-SPME pour la détermination des BTEX dans les échantillons de pomme

LOD : limite de détection, LOQ : limite de quantification, CV : coefficient de variation

En rouge : méthode HS-SPME 3 utilisant une fibre PDMS d'épaisseur 100 µm et l'éthylbenzène-d10 comme étalon interne

En bleu : méthode HS-SPME 2 utilisant une fibre CAR/PDMS d'épaisseur 75 µm et l'éthylbenzène-d10 comme étalon interne

En vert : méthode HS-SPME 1 utilisant une fibre CAR/PDMS d'épaisseur 75 µm et le nonane comme étalon interne

Les différences d'extraction observées pour les BTEX avec le support PDMS et le support CAR/PDMS sont peu significatives. Néanmoins, le revêtement mixte CAR/PDMS est susceptible d'être un peu plus hétérogène et d'entraîner une variabilité des résultats légèrement plus importante qu'avec une phase non mixte.

Le support PDMS d'épaisseur 100 µm (méthode HS-SPME 3) permet d'obtenir de plus faibles limites de détection et de quantification que le support CAR/PDMS d'épaisseur 75 µm (méthodes HS-SPME 1 et 2). L'utilisation d'une épaisseur plus importante pour le revêtement de la fibre HS-SPME améliore la sensibilité de l'extraction des BTEX dans la pomme.

L'ensemble des méthodes présente des performances cohérentes avec les données disponibles dans la littérature pour les BTEX extraits en HS-SPME dans diverses matrices. Les techniques HS-SPME présentées dans cette étude sont particulièrement adaptées à l'extraction de faibles quantités de BTEX, de l'ordre de quelques µg/kg (w.w.) dans une matrice complexe telle que la pomme.

Dans la littérature, la méthode HS-SPME est largement utilisée pour l'extraction des BTEX, néanmoins, très peu d'études rapportent l'application de cette méthodologie aux matrices fruitières. Ce travail propose donc deux méthodes HS-SPME validées et utilisant deux revêtements différents, CAR/PDMS 75 μm et PDMS 100 μm , pour l'extraction des BTEX.

L'optimisation d'une méthodologie existante utilisant une fibre CAR/PDMS de 75 μm pour l'extraction des BTEX a tout d'abord permis une amélioration significative des performances de l'extraction ainsi qu'une détection de niveaux en BTEX 1000 fois moins importants que dans une étude préalablement réalisée au laboratoire (Poinot, 2014), soit des concentrations de l'ordre du dixième de $\mu\text{g}/\text{kg}$.

L'utilisation d'une fibre PDMS 100 μm , dont le revêtement présente une épaisseur plus importante que la fibre CAR/PDMS a également permis d'obtenir de meilleures performances pour la détermination des BTEX dans la pomme.

Chapitre 4 : Hydrocarbures Aromatiques Monocycliques

Partie 4.2 : Applications à des matrices fruitières

Chapitre 4 : Hydrocarbures Aromatiques Monocycliques

Partie 4.2 : Applications à des matrices fruitières

Dans la seconde partie de ce chapitre dédiée aux hydrocarbures aromatiques monocycliques, les méthodologies optimisées sont notamment appliquées à la détermination du contenu en BTEX dans un produit agricole de fort intérêt régional, la pomme, qui est la base de la production cidricole normande. Le degré de contamination des pommes provenant de 13 sites régionaux localisés en zone urbaine, péri-urbaine ou rurale en Normandie sont étudiés. Une attention particulière est portée aux BTEX provenant des émissions liées aux transports et à la combustion de biomasse qui sont susceptibles d'être à l'origine du dépôt de ces polluants organiques sur les cultures environnantes. La présence des BTEX est donc identifiée dans divers fruits, la pomme, la poire, la prune et le raisin contaminés par des gaz d'échappement issus d'un moteur diesel. Le contenu en hydrocarbures aromatiques monocycliques est également déterminé pour des pommes exposées aux fumées de combustion de végétaux et le transfert des hydrocarbures aromatiques monocycliques de l'épiderme vers le mésocarpe du fruit est étudié.

4.2.1. Contenu en BTEX dans des pommes récoltées en Normandie

Le contenu en BTEX (tableau 39) est déterminé dans des pommes provenant de 13 sites localisés en Normandie (indiqués dans la section 3.1 du chapitre 3), dont 9 situés en zone urbaine ou aux alentours d'une agglomération, 2 à proximité d'une route nationale et 2 en zone rurale.

Tableau 39 : Estimation du contenu en BTEX dans des pommes récoltées en Normandie

	Benzène	Toluène	Ethylbenzène	<i>m/p</i> - Xylènes	<i>o</i> -Xylène	Total BTEX
	(µg/kg masse fraîche)					
Zone rurale						
Agy	nd	0,14±0,06	nd	nd	nd	0,14±0,06
Livry	nd	0,41±0,06	0,09±0,03	0,17±0,03	0,04±0,01	0,71±0,13
Zone urbaine (Caen, plus de 100 000 habitants)						
Parc expo	nd	0,13±0,02	nd	nd	nd	0,13±0,02
IUT 1.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IUT 1.2	nd	0,23±0,02	nd	0,06±0,01	0,03±0,01	0,32±0,04
Rectorat	nd	0,26±0,01	0,04±0,02	0,10±0,01	0,05±0,01	0,45±0,05
Venoix	nd	1,05±0,13	nd	nd	0,26±0,04	1,31±0,17
Zone périphérique d'une ville comptant plus de 100 000 habitants (Caen)						
Bretteville	nd	nd	0,07±0,01	0,06±0,03	<LOQ	0,13±0,04
Epron 1	nd	0,16±0,01	nd	nd	nd	0,16±0,01
Epron 2	nd	0,12±0,07	nd	nd	nd	0,12±0,07
Verson	nd	0,42±0,11	0,06±0,03	0,23±0,06	0,10±0,02	0,81±0,19
Zone urbaine (moins de 20 000 habitants)						
Saint-Lô	nd	0,38±0,08	nd	0,09±0,03	0,04±0,01	0,51±0,12
Vire	nd	0,47±0,09	nd	0,11±0,03	0,04±0,01	0,62±0,13
A proximité d'une route nationale						
Romilly	nd	nd	0,07±0,01	0,05±0,01	0,04±0,02	0,16±0,04
Isigny	nd	nd	0,07±0,01	0,06±0,03	0,04±0,01	0,17±0,05

La localisation des prélèvements est précisée dans la section 3.1 du chapitre 3

Les contenus présentés sont calculés d'après les pentes déterminées pour la pomme avec la méthode HS-SPME 3 et correspondent aux moyennes de 3 déterminations

nd : non détecté

<LOQ : inférieur à 0,03 µg/kg pour l'*o*-xylène

Les mesures visant à déterminer le contenu en hydrocarbures aromatiques monocycliques des pommes provenant de cultures régionales normandes montrent tout d'abord que le benzène, qui est le seul BTEX reconnu comme cancérigène pour l'Homme, n'a jamais été détecté dans les échantillons testés (< 0,038 µg/kg).

En ce qui concerne l'éthylbenzène et les xylènes, la majorité des concentrations retrouvées sont inférieures à 0,10 µg/kg et la concentration en toluène n'excède pas 0,5 µg/kg (excepté pour les pommes prélevées à Venoix avec 1,05±0,13 µg/kg). Les valeurs mesurées dans les

pommes sont faibles quel que soit leur lieu de prélèvement puisque le contenu total en BTEX est inférieur à 1 µg/kg (excepté pour le site de Venoux) (tableau 39).

Ces faibles concentrations peuvent éventuellement être expliquées par la volatilisation facile des BTEX issus de la transpiration des fruits. La transpiration des tissus végétaux est notamment une voie d'élimination significative du benzène, pour les feuilles de peuplier le volume de transpiration est corrélé à la masse de benzène volatilisé vers l'atmosphère (Burken, 1998).

Sur le site d'Epron, des pommes ont été récoltées le même jour sur 2 arbres différents distants d'une dizaine de mètres. Seul le toluène est détecté dans les échantillons Epron 1 et Epron 2. De plus, les concentrations mesurées sont proches avec $0,16 \pm 0,01$ et $0,12 \pm 0,07$ µg/kg de masse fraîche respectivement.

Globalement, les résultats ne semblent pas révéler de tendance entre la quantité en BTEX retrouvée dans les fruits et leur site de prélèvement rural ou urbain. Les niveaux en BTEX retrouvés à Livry, en zone rurale, ainsi qu'à Saint-Lô et Vire qui sont des villes de moyenne importance, dépassent ceux généralement trouvés en milieu urbain et périurbain pour une ville de plus de 100 000 habitants. La proximité directe des pommes avec le trafic routier semble n'avoir qu'un impact limité sur leur contamination puisque des faibles niveaux sont relevés pour les fruits à proximité d'une route nationale à forte circulation (RN 13).

La détermination du contenu en BTEX dans les pommes permet d'estimer la quantité de contaminants susceptibles d'être ingérée après la consommation de ces fruits.

4.2.2. Estimation de l'apport de BTEX à travers l'ingestion des pommes récoltées

Chez l'Homme, aucune réglementation n'est disponible pour les BTEX dans l'alimentation en raison du manque de données concernant leur toxicité par voie orale. Néanmoins, pour certains composés, Santé Canada (Santé Canada, 1996) donne une dose journalière admissible (DJA) exprimée en fonction du poids corporel (p.c.) qui représente ce qu'une personne pourrait ingérer quotidiennement au cours de sa vie entière sans effet nuisible. D'après certaines données collectées, les valeurs obtenues pour les xylènes et le toluène sont respectivement de 1,5 et 0,22 mg/kg p.c./jour. Pour une personne de 60 kg cela représente une ingestion de 90 mg de xylènes par jour et 13,2 mg/jour pour le toluène.

Les valeurs obtenues pour les BTEX sont rapportées à la masse moyenne d'une pomme (150 g) afin d'avoir une estimation de l'absorption des contaminants chez l'Homme *via* la consommation de ces fruits (tableau 40).

Tableau 40 : Quantité de BTEX (en nanogrammes) susceptible d'être ingérée lors de la consommation d'une pomme de 150 g récoltée en Normandie

	Benzène	Toluène	Ethylbenzène	<i>m/p</i> -Xylène	<i>o</i> -Xylène	Total BTEX
	(nanogrammes)					
Zone rurale						
Agy	nd	20,4±9,8	nd	nd	nd	20,4±9,8
Livry	nd	61,9±8,6	13,2±4,8	25,1±4,2	6,4±1,4	106,5±19,0
Zone urbaine (Caen, plus de 100 000 habitants)						
Parc expo	nd	18,9±3,0	nd	nd	nd	18,9±3,0
IUT 1.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IUT 1.2	nd	35,0±3,2	nd	9,5±1,9	4,6±1,6	49,1±6,7
Rectorat	nd	38,4±0,5	6,6±2,6	14,6±1,0	7,4±2,0	67,0±6,1
Venoix	nd	157,1±19,1	nd	nd	39,0±6,7	196,1±25,8
Zone périphérique d'une ville comptant plus de 100 000 habitants (Caen)						
Bretteville	nd	nd	10,2±0,2	9,0±3,8	nd	19,2±4,0
Epron 1	nd	23,7±2,3	nd	nd	nd	23,7±2,3
Epron 2	nd	18,6±10,1	nd	nd	nd	18,6±10,1
Verson	nd	62,7±16,4	8,9±3,8	33,8±9,6	15,3±3,2	120,7±33,0
Zone urbaine (moins de 20 000 habitants)						
Saint-Lô	nd	57,2±12,7	nd	13,9±4,5	5,3±0,4	76,4±17,6
Vire	nd	70,2±13,8	nd	15,9±4,6	6,4±2,2	92,5±20,6
A proximité de la RN 13						
Romilly	nd	nd	10,8±1,2	8,1±1,9	5,6±2,6	24,5±5,7
Isigny	nd	nd	9,8±0,7	9,6±3,9	5,3±1,8	24,7±6,4

La localisation des prélèvements est précisée dans la section 3.1 du chapitre 3
 nd : non détecté

Les valeurs obtenues pour les xylènes et le toluène sont très largement inférieures aux DJA. La plus grande quantité de *m*-, *p*- et *o*-xylène est retrouvée pour les pommes récoltées en zone urbaine à Venoix avec 39,0±6,0 ng. Néanmoins, cette valeur reste plus de 2 millions de fois moins importante que la DJA établie pour ces composés (Santé Canada, 1996).

En ce qui concerne le toluène, la quantité la plus importante est également observée sur le site de Venoix avec 159,0±19,5 ng ce qui est inférieur d'un facteur 83 000 à la DJA proposée pour le toluène.

Au cours de cette campagne de prélèvement, les quantités d'hydrocarbures aromatiques mesurées dans les fruits sont faibles. La comparaison des concentrations mesurées aux DJA

pour le toluène et les xylènes indique que la consommation des pommes récoltées ne présente pas de risque de toxicité liée à la présence de BTEX.

4.2.3. Estimation du contenu en BTEX dans des fruits du commerce

Tout au long de ce travail, des fruits présentant des caractéristiques différentes sont achetés dans le commerce et sont additionnés de BTEX entre 0 et 10 µg/kg afin de servir à la réalisation de gammes d'étalonnage. Pour chaque composé, l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage correspond à la contamination intrinsèque du fruit. Pour les pommes, les poires, les prunes et les raisins provenant du supermarché les niveaux de contamination à l'origine sont déterminés en rapportant l'ordonnée à l'origine à la pente de la droite d'étalonnage (tableau 41).

Tableau 41 : Estimation du contenu en BTEX dans divers fruits du commerce

	Pomme			Poire		Prune	Raisin
	A ¹	B ²	C ³	A ¹	B ²	A ²	A ²
Benzène	1,66	0,71	0,13	0,55	<LOQ	<LOQ	nd
Toluène	0,91	2,83	0,18	0,84	1,81	0,19	nd
Ethylbenzène	0,33	0,20	<LOQ	0,07	nd	nd	nd
<i>m/p</i> -Xylènes	1,21	9,50	nd	1,32	6,98	<LOQ	nd
<i>o</i> -Xylène	0,59	0,57	<LOQ	0,26	nd	0,14	nd
Total	4,70	13,81	0,31	3,04	8,79	0,33	nd

1 : contenu, correspondant au rapport de l'ordonnée à l'origine sur la pente, déterminé lors de l'étalonnage avec la méthode HS-SPME 1 : fibre CAR/PDMS épaisseur 75 µm, étalon interne nonane

2 : contenu, correspondant au rapport de l'ordonnée à l'origine sur la pente, déterminé lors de l'étalonnage avec la méthode HS-SPME 2 : fibre CAR/PDMS épaisseur 75 µm, étalon interne éthylbenzène-d10 (LOQ benzène dans la poire : 0,494 µg/kg, LOQ benzène dans la prune : 0,508 µg/kg, LOQ *m/p*-xylènes dans la prune : 0,063 µg/kg)

3 : contenu, correspondant au rapport de l'ordonnée à l'origine sur la pente, déterminé lors de l'étalonnage avec la méthode HS-SPME 3 : fibre PDMS épaisseur 100 µm, étalon interne éthylbenzène-d10 (dans la pomme, LOQ éthylbenzène : 0,026 µg/kg, LOQ *o*-xylène : 0,030 µg/kg)

<LOQ : inférieur à la limite de quantification

Les 3 achats de pommes et les 2 achats de poires montrent que le contenu en BTEX dans les fruits provenant du commerce peut être très variable (tableau 41). Parmi les fruits du commerce, les pommes et les poires semblent révéler une présence en BTEX plus importante que les prunes et les raisins où la quantité en chaque composé n'excède pas 0,2 µg/kg (tableau 41). Aucun BTEX n'est par exemple détecté dans les seuls échantillons testés pour le raisin du commerce. Les composés les plus retrouvés dans les pommes et les poires sont le toluène avec jusqu'à 2,83±0,17 µg/kg et les *m/p*-xylènes avec jusqu'à 9,50±1,99 µg/kg (tableau 41). En ce qui concerne les autres composés ils n'excèdent généralement pas 0,75 µg/kg (excepté pour le benzène dans la pomme (1) avec 1,66±0,32 µg/kg).

Les pommes achetées dans le commerce possèdent globalement un contenu en BTEX plus important que les pommes récoltées en Normandie. Le benzène n'est notamment détecté dans aucune pomme provenant des pommiers normands, la concentration en toluène excède rarement 0,5 µg/kg (excepté pour les pommes prélevées à Venoix avec 1,05±0,13 µg/kg) et celle en *m/p*-xylènes reste inférieure à 0,3 µg/kg.

Les teneurs en toluène estimées pour les fruits provenant du commerce (tableau 42) sont largement inférieures à celles retrouvées dans certains fruits provenant d'un supermarché américain avec 16 µg/kg w.w. dans la fraise et jusqu'à 36 µg/kg w.w. dans la banane (Fleming-Jones, 2003). Néanmoins, des quantités en BTEX beaucoup plus faibles, inférieures à 0,02 µg/kg w.w. (concentration convertie à partir des données en masse sèche et d'une estimation du contenu en eau), sont retrouvées dans les échantillons de pomme, poire, prune et raisin provenant d'un supermarché polonais (Górna-Binkul, 1996).

Les données expérimentales montrent que les BTEX sont susceptibles d'être retrouvés en plus grande quantité dans la pomme (jusqu'à environ 14 µg/kg) et la poire (jusqu'à environ 9 µg/kg) que dans la prune et le raisin (jusqu'à environ 0,3 µg/kg) (tableau 41).

La présence de polysaccharides au niveau des parois cellulaires de la cuticule semble être défavorable à la sorption d'hydrocarbures aromatiques en raison de leur faible affinité avec les composés organiques hydrophobes (Li, 2009). Une étude menée en spectroscopie dans l'infrarouge moyen, dans une région spectrale caractéristique des polysaccharides indique que les spectres obtenus pour les parois cellulaires de la peau de la poire sont proches de ceux observés avec la pomme (Brahem, 2017). La cuticule de la pomme possède un plus faible pourcentage en polysaccharides (13,2 %) que celle du raisin (31,5 %) (Li, 2009).

Le plus faible contenu en polysaccharides au niveau des parois cellulaires de la cuticule des pommes et des poires pourrait ainsi expliquer la teneur plus importante en BTEX dans ces fruits par rapport au raisin.

4.2.4. Détermination du contenu en BTEX dans des fruits du commerce exposés aux gaz d'échappement d'une motorisation diesel

Les fruits du commerce (pommes, poires, prunes, raisins) sélectionnés pour leur diversité (précisée en section 4.1.5.2 page 179) sont ensuite exposés individuellement (environ 200 g de chaque variété) aux gaz d'échappement du véhicule diesel pendant 30 minutes selon la procédure décrite dans la section 3.1 du chapitre 3. L'exposition à ce type de gaz d'échappement a été sélectionnée en raison de la forte représentation des véhicules diesel au sein du parc automobile français. En 2012, en France, les véhicules diesel constituaient 60% du parc de véhicules particuliers soit 19,12 millions de véhicules (Insee, 2012). De plus, en raison d'une plus forte quantité de carbone contenue dans le carburant diesel par rapport à l'essence, les moteurs diesel émettent plus de particules sur lesquelles les hydrocarbures aromatiques sont susceptibles d'être adsorbés. La détermination des BTEX dans les fruits ainsi contaminés permet d'avoir une idée du dépôt éventuel de ces composés sur les fruits

exposés au trafic routier. Les quantités en BTEX retrouvés dans les pommes, les poires, les prunes et les raisins après une période d'exposition de 30 min aux émissions d'échappement diesel sont présentées dans le tableau 42.

Tableau 42 : Contenu en BTEX ($\mu\text{g}/\text{kg}$ masse fraîche) dans les fruits après 30 minutes d'exposition aux échappements diesel (n=3)

Composés	Pomme	Poire	Prune	Raisin
Benzène	nd	nd	nd	nd
Toluène	2,14 \pm 0,16	2,49 \pm 0,18	nd	nd
Ethylbenzène	nd	<LOQ	0,15 \pm 0,11	<LOQ
<i>m/p</i> -Xylènes	12,46 \pm 1,82	15,45 \pm 1,45	0,25 \pm 0,02	0,16 \pm 0,03
<i>o</i> -Xylène	0,55 \pm 0,19	0,12 \pm 0,03	0,25 \pm 0,15	0,15 \pm 0,10
Total BTEX	15,15\pm2,17	18,06\pm1,66	0,65\pm0,28	0,31\pm0,13

Les contenus présentés sont calculés d'après les pentes déterminées pour les différents fruits avec la méthode HS-SPME 2 et correspondent aux moyennes de 3 déterminations (n=3)

nd: non détecté

<LOQ : teneur inférieure à la limite de quantification (LOQ éthylbenzène : 0,095 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans la poire et 0,120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans le raisin)

Le tableau 42 permet d'estimer l'effet de l'exposition aux gaz d'échappement d'un moteur diesel pour les différents fruits étudiés. Par rapport au patrimoine en BTEX déterminé précédemment pour les fruits du commerce, seuls le contenu en *m/p*-xylènes semble significativement supérieur après l'exposition aux gaz d'échappement d'un moteur diesel. Le contenu en *m/p*-xylènes observé dans les pommes et les poires du commerce non exposées est inférieur à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, non quantifiable pour la prune et est non détectable pour le raisin (tableau 41). Les niveaux en toluène et en *o*-xylène détectés dans la pomme et la poire exposée aux gaz d'échappement sont semblables à certaines valeurs retrouvées dans des fruits non exposés. Le benzène, dont le caractère cancérigène est reconnu chez l'Homme, est absent ou présent en concentration inférieure à 0,1-0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (valeur des LOD pour le benzène dans les différents fruits) dans les fruits exposés aux gaz d'échappement. L'éthylbenzène est également retrouvé en quantité négligeable dans les fruits après exposition.

Les travaux d'Alves *et al.* (2015) utilisant un véhicule diesel de 2006 (Citroën Xsara Picasso) proche de celui utilisé pour l'étude, indiquent que le benzène est le composé majoritairement retrouvé dans les gaz d'échappement avec 33,1 \pm 14,0 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$. Des émissions importantes de toluène avec 14,4 \pm 0,75 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$ et de *m/p*-xylènes avec 10,6 \pm 0,5 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$ sont également détectées. L'*o*-xylène (6,8 \pm 0,4 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$) et l'éthylbenzène (4,2 \pm 1,0 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$) sont quant à eux plus faiblement présents dans les effluents de motorisation diesel (Alves, 2015). Le toluène (4 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$), le benzène (3 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$) et les *m/p*-xylènes (2 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$) sont également plus retrouvés que l'éthylbenzène (0,5 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$) et l'*o*-xylène (0,8 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{km}$) dans les gaz d'échappement d'un camion équipé d'un moteur diesel (Schauer, 1999).

La présence relativement importante de *m/p*-xylène ainsi que la faible quantité d'éthylbenzène dans les fruits exposés aux gaz d'échappement (tableau 42) sont cohérentes avec les données disponibles dans la littérature concernant les effluents de motorisation diesel.

En ce qui concerne le benzène, il n'est détecté dans aucun des fruits exposés (tableau 42). Le benzène et le toluène semblent être les hydrocarbures aromatiques monocycliques les plus impactés par l'état de chauffe du véhicule lors de la mesure de ces composés dans les gaz d'échappement. La présence de benzène et de toluène est plus de 5 fois supérieure lorsque la prise d'essai est réalisée avec un véhicule à froid alors que les quantités d'éthylbenzène et de *m/p*-xylène ne varient que d'un facteur 2 environ (Alves, 2015). Takada *et al.* indiquent que le benzène se trouve plus facilement oxydé lorsque la température des gaz d'échappement est élevée (Takada, 2003). Le protocole d'expérimentation visant à exposer les fruits aux émissions d'un moteur diesel utilise un véhicule ayant suivi auparavant un trajet relativement long de 30 min ce qui pourrait expliquer que le benzène n'ait pas pu être détecté.

4.2.5. Détermination des BTEX dans les pommes avant et après exposition aux fumées de combustion de biomasse

L'étude s'intéresse également aux émissions liées à la combustion de biomasse. En milieu rural, les pratiques visant à brûler les déchets verts et à utiliser le bois comme énergie de chauffage sont courantes. Ces processus de combustion de biomasse engendrent la formation d'hydrocarbures aromatiques qui sont susceptibles de se déposer sur les cultures environnantes. Des pommes entières provenant du commerce sont donc exposées pendant 1 h à des fumées obtenues grâce à la mise en contact de branches de tilleul humide avec des braises de charbon incandescentes, selon la procédure décrite dans la section 3.1 du chapitre 3 (page 128). Le tilleul est une essence qui n'est généralement pas utilisée comme bois de chauffage en raison du faible dégagement de chaleur engendrée par sa combustion. Ce type de bois fait donc partie des déchets verts susceptibles d'être brûlés à l'air libre. Les pommes contaminées par les fumées de combustion sont analysées entières puis la peau et la chair des fruits sont analysées séparément afin d'étudier la répartition des BTEX entre l'épiderme et le mésocarpe des fruits ; les contenus obtenus sont présentés en tableau 43.

Tableau 43 : Estimation du contenu en BTEX dans les pommes du commerce après 1 h d'exposition aux fumées de combustion de biomasse

		Benzène	Toluène	Ethylbenzène	<i>m/p</i> -Xylènes	<i>o</i> -Xylène
		(µg/kg masse fraîche)				
Pomme entière	Avant fumage	nd	0,45±0,04	<LOQ	0,09±0,01	nd
	Après fumage	0,28±0,07	0,76±0,15	0,08±0,02	0,19±0,01	0,10±0,01
Profil de BTEX		0,28	0,31	0,08	0,10	0,10
Peau	Avant fumage	nd	0,96±0,14	0,08±0,01	0,18±0,03	0,09±0,01
	Après fumage	0,66±0,51	1,68±0,08	0,18±0,02	0,46±0,12	0,25±0,03
Profil de BTEX		0,66	0,72	0,10	0,34	0,16
Chair	Avant fumage	nd	nd	nd	nd	nd
	Après fumage	nd	nd	nd	nd	nd

Les contenus présentés sont calculés d'après les pentes déterminées pour les différents fruits avec la méthode HS-SPME 3 et correspondent aux moyennes de 3 déterminations (n=3)

Les profils de BTEX présents dans la pomme entière et déposés sur la peau sont calculés en soustrayant le contenu initial en BTEX à celui obtenu après l'exposition aux fumées de combustion de biomasse

nd : non détecté

<LOQ : teneur inférieure à la limite de quantification (LOQ éthylbenzène : 0,03 µg/kg)

Avant exposition aux fumées de combustion de biomasse, seuls le toluène à 0,45±0,04 µg/kg et les *m/p*-xylènes à 0,09±0,01 µg/kg sont détectés dans les pommes du commerce et l'éthylbenzène est présent en quantité inférieure à la limite de quantification qui est de 0,03 µg/kg (tableau 43). Ce niveau de contamination est cohérent avec ceux retrouvés pour les pommes récoltées en Normandie et globalement inférieur aux teneurs estimées précédemment pour les pommes provenant du commerce.

Les analyses séparées de l'épicarpe et du mésocarpe révèlent la présence initiale des BTEX (excepté pour le benzène) au niveau de la peau des pommes et l'absence de ces composés au niveau de la chair (tableau 43). L'exposition des pommes aux fumées de combustion de biomasse entraîne une augmentation significative, d'un facteur supérieur à 2, du niveau de chaque BTEX dans la peau des fruits. Au contraire, aucun de ces composés n'est retrouvé dans le mésocarpe des pommes exposées ou non aux fumées. Les BTEX sont donc plus présents au niveau de l'épicarpe des pommes aussi bien avant qu'après une exposition d'1 h aux fumées de combustion de biomasse. Le caractère plus lipophile de l'épicarpe par rapport au mésocarpe explique notamment l'adsorption exclusive des BTEX au niveau de la peau et l'absence de transfert vers la chair. L'adsorption préférentielle des BTEX au niveau de la peau est également montrée par Górna-Binkul *et al.* (1996) où le toluène est par exemple retrouvé en quantité 2 fois plus importante dans la peau des pommes que dans la pulpe (Górna-Binkul, 1996).

Les profils en BTEX, présents dans la pomme entière et déposés sur la peau, sont déterminés par la soustraction du contenu initial en BTEX à celui obtenu après l'exposition aux fumées

de combustion de biomasse (tableau 43). Ces profils montrent que la combustion de bois de tilleul a entraîné le dépôt de benzène, composé qui n'est pas détecté dans les échantillons avant exposition ou dans les fruits exposés aux gaz d'échappement d'un moteur diesel. Le profil en BTEX observé au niveau de la peau indique que les composés majoritairement retrouvés sont le benzène (0,66 µg/kg), le toluène (0,72 µg/kg) et les *m/p*-xylènes (0,34 µg/kg).

Le profil obtenu est cohérent avec les données disponibles dans la littérature puisque les hydrocarbures aromatiques monocycliques principalement émis lors de la combustion de bois et de broussailles sous des pins laricio sont le benzène et le toluène. A une distance des flammes comprises entre 1 et 10 mètres, les quantités en benzène ($12 \pm 1,8$ mg/m³) et en toluène ($6 \pm 0,9$ mg/m³) retrouvées dans les fumées de combustion du bois sont 3 à 6 fois supérieures à celles en éthylbenzène ($2 \pm 0,3$ mg/m³) et en xylènes ($1 \pm 0,5$ mg/m³) (Barboni, 2010). Le benzène est également le composé majoritairement émis lors de la combustion du bois de bouleau dans une chaudière. En présence de braises incandescentes, le toluène et les 3 isomères de xylènes se trouvent également émis en proportions importantes par rapport à l'éthylbenzène (Olsson, 2006). Une quantité de 100 est arbitrairement attribuée au benzène et des quantités relatives sont déterminées par rapport à ce composé pour le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes. Les quantités relatives sont ainsi de 53 ± 29 pour le toluène, 48 ± 37 pour les 3 isomères de xylènes et 8 ± 5 pour l'éthylbenzène (Olsson, 2006).

4.2.6. Conclusion

Dans la littérature, très peu d'études évaluant les concentrations en BTEX dans les fruits sont disponibles. Ce travail a donc permis de montrer le potentiel des méthodologies d'extraction et de quantification développées. De très faibles niveaux de contamination de l'ordre du dixième de µg/kg peuvent être recherchés. Ce travail représente également une importante avancée des connaissances sur les concentrations en BTEX de pommes, provenant de vergers et de pommiers localisés dans des zones urbaines ou des jardins privés, soumises à l'impact de l'air environnant. La seconde partie de ce chapitre dédié aux hydrocarbures aromatiques monocycliques n'a révélée qu'un faible degré de contamination pour les pommes provenant des 13 sites régionaux étudiés en Normandie. Le contenu total en BTEX dans ces pommes n'excède généralement pas 1 µg/kg quel que soit le lieu de prélèvement en zone urbaine, péri-urbaine ou rurale. La consommation de ces pommes récoltées en Normandie ne paraît donc pas présenter de risque de toxicité liée à la présence d'hydrocarbures aromatiques monocycliques.

Les BTEX peuvent être présents en quantités variables et globalement supérieures dans les fruits provenant du commerce que dans les fruits locaux.

Les émissions liées aux transports et à la combustion de biomasse, susceptibles d'être à l'origine du dépôt de BTEX sur les cultures ont ensuite été étudiées. L'exposition de divers fruits aux gaz d'échappement d'un moteur diesel a notamment montré une augmentation significative du contenu en *m/p*-xylènes. Les émissions liées à la combustion de biomasse, sont quant à elles principalement susceptibles d'être à l'origine du dépôt de benzène et de toluène sur l'épiderme des pommes.

Chapitre 5 : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Partie 5.1 : Approches méthodologiques pour la détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans des matrices fruitières

Chapitre 5 : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Partie 5.1 : Approches méthodologiques pour la détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans des matrices fruitières

L'un des objectifs du travail de thèse est d'étudier la présence des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les matrices fruitières. Ce projet cible plus particulièrement un produit agricole de fort intérêt régional en Normandie, la pomme.

En absence de méthodologie standardisée pour l'extraction des HAP dans les fruits ou les légumes, un protocole d'extraction liquide est, dans un premier temps, envisagé pour l'ensemble des HAP. Une étude préalable réalisée au laboratoire (Poinot, 2014) a permis de déterminer qu'un protocole consistant en une étape d'extraction assistée par les ultrasons (UAE) suivie d'une étape de purification sur cartouche d'extraction en phase solide (SPE) est la plus appropriée pour l'extraction des HAP dans la pomme pour des concentrations de l'ordre du mg/kg. Cette procédure existante est modifiée et optimisée afin de déterminer la présence en HAP dans les fruits pour des teneurs de l'ordre de 0 à 10 µg/kg (section 5.1.1). Les conditions de validation de cette méthode par UAE/SPE n'étant pas toutes réunies pour l'ensemble des HAP, une stratégie alliant la HS-SPME pour la détermination des HAP légers ($MM \leq 178$ g/mol) et l'UAE/SPE pour les HAP plus lourds ($MM > 178$ g/mol) est développée puis validée (section 5.1.2).

Une dernière approche méthodologique de détermination des HAP dans la pomme est développée et validée par utilisation de la micro-extraction par solide compacté (MEPS) après extraction aux ultrasons afin de proposer un gain en temps de préparation d'échantillon (section 5.1.3). Cette méthode, dont très peu d'applications sont dénombrées dans la littérature, n'a jamais été décrite pour la détermination d'hydrocarbures aromatiques dans le cas de matrices fruitières.

5.1.1. Adaptation d'une méthode d'extraction des HAP dans la pomme par UAE/SPE pour leur dosage à l'état de traces (0 à 10 µg/kg)

5.1.1.1. Choix de la méthodologie d'extraction pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les conditions optimales d'extraction des HAP sont déterminées par une étude précédemment menée au laboratoire (Poinot, 2014) visant à étudier et comparer plusieurs techniques d'extraction (soxhlet, UAE et SPE). L'extraction assistée par les ultrasons (UAE) permet une récupération plus efficace des HAP pour des concentrations de l'ordre du mg/kg dans la pomme que la méthode d'extraction par soxhlet (Poinot, 2014). Cette stratégie comprend l'utilisation d'1 g d'échantillon soumis à une extraction par ultrasons (UAE) suivie par une étape de concentration au moyen d'un évaporateur rotatif. La séparation de l'extrait concentré

est par la suite menée par GC et la détection par balayage total en ionisation électronique au moyen d'un spectromètre de masse de type trappe ionique (Poinot, 2014).

La recherche de plus faibles concentrations de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ nécessite une étape de purification supplémentaire des extraits, afin de minimiser le bruit de fond lors de l'analyse. Une purification de l'extrait par extraction sur phase solide (SPE) avec une cartouche styrène/divinylbenzène comme phase de rétention est donc mise en place. L'affinité de cette phase stationnaire pour les HAP a notamment été démontrée par les travaux de Veyrand *et al.* (2007 et 2013). L'association d'une extraction accélérée par solvant (ASE) et d'une purification en SPE à travers une phase stationnaire styrène/divinylbenzène permet d'obtenir une extraction sensible des HAP dans des échantillons alimentaires (Veyrand, 2007 ; Veyrand, 2013). Ces résultats ont mené à la sélection de cette phase stationnaire pour la purification des extraits UAE obtenus à partir des fruits. Cette étape de purification est suivie d'une évaporation sous flux d'azote afin d'améliorer la sensibilité de la détection, en évaporant les solvants et en concentrant les extraits en composés d'intérêt.

Une procédure associant l'UAE et la SPE (UAE/SPE) a été point par point optimisée et vérifiée pour limiter la variabilité des réponses analytiques et gagner en sensibilité afin d'atteindre des concentrations en HAP de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Les moyens d'optimisation sont particulièrement focalisés sur la préparation et l'extraction de l'échantillon (Partie 5.1.1.2), sur l'éluion en SPE (partie 5.1.1.3), sur la concentration des extraits (partie 5.1.1.4), sur le choix de l'étalon interne (partie 5.1.1.5), et sur la séparation et la détection en GC-MS (partie 5.1.1.6).

5.1.1.2. Préparation de l'échantillon et extraction assistée par les ultrasons

5.1.1.2.1. Solvants d'extraction

Une première étape d'adaptation de la procédure d'extraction des HAP consiste à vérifier leur présence dans les solvants utilisés pour l'extraction assistée par les ultrasons (UAE). Les solvants utilisés initialement ont un certificat d'analyse (fournisseur : Sigma-Aldrich) indiquant des teneurs en substances aromatiques inférieures à 0,05%. Une contamination lors de la préparation d'échantillon n'a pas été détectée auparavant (Poinot, 2014) au regard des concentrations testées (de l'ordre du mg/kg) mais peut apparaître pour une recherche de concentrations 1000 fois inférieures (de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$). L'application de la méthodologie complète à un extrait (témoin) ne comportant ni matrice (fruit) ni addition de solution standard de HAP a révélé la présence de pics significatifs d'analytes ciblés lors des analyses par GC-MS. Ce constat a conduit à l'utilisation de solvants de pureté supérieure de type PESTINORM® achetés auprès du fournisseur VWR Prolabo. L'application de ces « nouveaux » solvants n'a révélé la présence d'aucun analyte ciblé.

5.1.1.2.2. Matériel de préparation des échantillons

Des micro-volumes sont utilisés pour réaliser les ajouts de solutions (solutions standard de HAP, solution d'étalon interne) aux échantillons de fruit avant la procédure d'extraction. La seringue de 50 μL est utilisée pour réaliser des additions entre 10 et 40 μL de solutions en HAP et la seringue de 250 μL permet d'ajouter des volumes compris entre 60 et 100 μL .

Globalement, des volumes intermédiaires de 2, 4, 20 et 100 μL sont sélectionnés afin de calculer les incertitudes liées à l'utilisation des seringues de 10, 50 et 250 μL et de vérifier la variabilité liée à l'utilisation du matériel. La masse des volumes prélevés avec des seringues de 10, 50 et 250 μL est comparée à la masse théorique souhaitée, les résultats sont regroupés dans le tableau 44.

Tableau 44 : Prélèvement du dichlorométhane (DCM) avec différentes micro-seringues

Type de seringue	Volume théorique prélevé	Nombre d'essai	Masse moyenne d'un prélèvement (g)	Ecart type	CV (%)	Masse théorique* (g)	Ecart (%)
10 μL	2x4 μL	10	0,0086	0,0005	6,2	0,0106	18,8
10 μL	4x2 μL	9	0,0077	0,0004	4,9	0,0106	27,6
50 μL	2x20 μL	10	0,0506	0,0012	2,4	0,0532	4,8
250 μL	2x100 μL	10	0,2652	0,0015	0,6	0,2660	0,3

*masse théorique calculée en multipliant le volume théorique par la masse volumique du DCM qui est de 1,33 g/cm^3

Les résultats du tableau 44 montrent que l'utilisation de la seringue de 10 μL peut être à l'origine d'une importante variation des résultats. Les seringues de 50 et 250 μL ne présentent qu'une faible incertitude (pour les prélèvements de 2x20 et de 2x100 μL) et sont susceptibles d'entraîner une faible variation des résultats. Ces seringues sont privilégiées par la suite par rapport aux seringues de 10 μL .

5.1.1.3. Elution en SPE

5.1.1.3.1. Montage de purification en SPE

Les hydrocarbures aromatiques s'adsorbent facilement sur les matières plastiques qui sont donc généralement déconseillées pour l'extraction de ces composés (Purcaro, 2013). Or, la procédure d'extraction comprend une étape de centrifugation post-extraction UAE utilisant des tubes en matière plastique. Ces derniers sont remplacés par des tubes en verre éliminant ainsi cette éventuelle source de contamination. De plus, avant élution sur cartouche de SPE, l'extrait fait un passage lent sous faible vide à travers des capillaires en matière plastique menant à l'enceinte sous vide. Concernant ces capillaires, leur contamination est vérifiée par passage de solvant au travers. L'analyse des solvants issus de ces passages révèle, après concentration sous flux d'azote, la présence de HAP en GC-MS. Le renouvellement de cette manipulation à travers le même capillaire montre une diminution de l'aire des pics de HAP. Il apparaît donc que les HAP s'adsorbent sur les parois des capillaires et se désorbent à chaque passage de solvant, contaminant ainsi l'analyse. Une procédure de nettoyage rigoureuse des capillaires, précisée dans la section 3.4.2 du chapitre 3 (page 140), est mise en place afin d'éliminer cette source de contamination.

5.1.1.3.2. Etape d'élution en SPE

L'extrait récupéré suite à l'étape de concentration par évaporateur rotatif est repris dans 1 mL de mélange cyclohexane/dichlorométhane (50/50, v/v) et 5 mL de cyclohexane. Ce nouvel extrait, représentant un volume d'environ 7 mL, est chargé sur la cartouche SPE et les composés d'intérêt sont retenus par le support copolymère styrène/divinylbenzène (cartouche

Envi Chrom P). La cartouche est ensuite rincée 3 fois avec 3 mL d'un mélange cyclohexane/éthanol (70/30, v/v), ce qui représente un volume de 9 mL pour la fraction de rinçage. L'éluion correspond ensuite à un passage de 12 mL du mélange de solvant cyclohexane/acétate d'éthyle (40/60, v/v).

Le comportement des HAP lors de l'étape de purification en SPE (cartouche Envi Chrom P) est vérifié au moyen d'une récupération de 2 volumes différents de la fraction d'éluion. Dans un cas, la fraction d'éluion avec 12 mL du mélange de solvant cyclohexane/acétate d'éthyle (40/60, v/v) est récupérée seule. Dans un autre cas, la fraction de rinçage avec 9 mL du mélange cyclohexane/éthanol (70/30, v/v) est associée à la fraction d'éluion avec 12 mL du mélange de solvant cyclohexane/acétate d'éthyle (40/60, v/v), le volume ainsi récupéré est donc de 21 mL. Chacune des deux fractions est ensuite concentrée sous flux d'azote jusqu'à un volume de 50 µL avant être analysée en GC-MS. Le but est d'estimer (i) si la récupération des HAP dans la fraction d'éluion est optimale et (ii) la variabilité associée à la récupération des HAP. Les résultats obtenus sont présentés en figure 62.

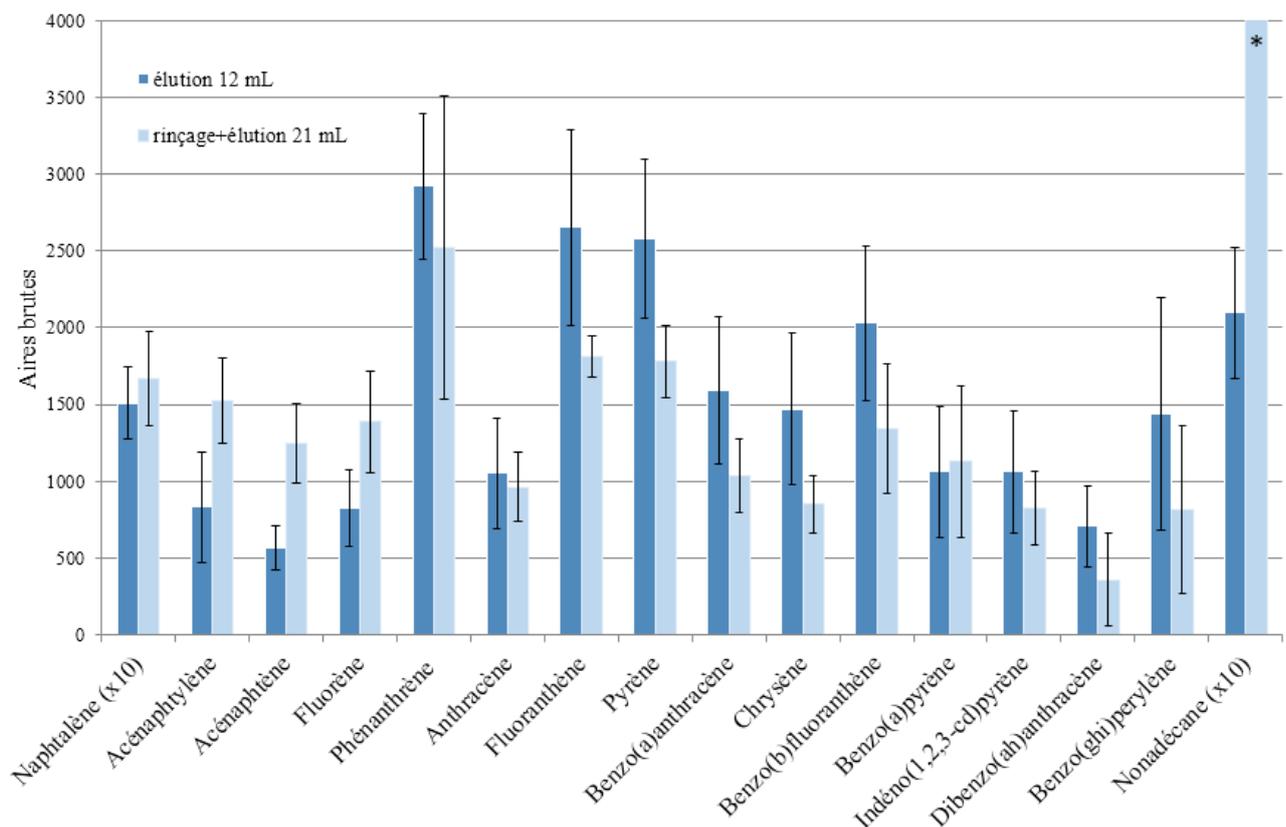


Figure 62 : Récupération et variabilité du contenu en HAP après éluion de fraction de 12 et 21 mL en SPE

La concentration en HAP de la solution initialement déposée sur la cartouche SPE est de 0,34 µg/L

Valeurs brutes obtenues pour des fractions de 12 et 21 mL obtenues après éluion et rinçage+éluion respectivement puis concentrées sous flux d'azote jusqu'à 50 µL

x10 : l'aire brute du naphtalène et du nonadécane est divisée par 10 afin de permettre la conservation d'une échelle permettant la comparaison entre les autres composés

* la valeur moyenne en aire brute pour le nonadécane dans la fraction de 21 mL (198264±18803) n'est pas totalement représentée afin de conserver une échelle permettant la comparaison entre les autres composés

Les aires brutes présentées sont une moyenne de 5 déterminations, les barres d'erreurs représentent la variabilité des aires brutes pour les 5 déterminations

Les aires brutes obtenues pour chaque HAP sont relativement peu variables pour les différents essais de récupération d'éluat en SPE. Les coefficients de variation entre les 5 déterminations lors de la récupération de la fraction d'élution avec 12 mL de mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (40/60, v/v) sont compris entre 7 et 30% quel que soit le HAP ciblé.

La variabilité est plus forte pour les HAP lourds tels que le benzo(*a*)pyrène (CV=44% pour n=5), le benzo(*ghi*)perylène (CV=69% pour n=5) et le dibenzo(*ah*)antracène (CV=83% pour n=5) dans le cas de la récupération au moyen des 21 mL d'éluat. Les variations sont de plus assez inégales entre elles (de 9 à 83%). Le volume d'éluat compris entre 0 et 9 mL, initialement dédié au rinçage, semble ainsi être à écarter pour obtenir une répétabilité adéquate des mesures.

Une nette différence de rétention existe entre les différents HAP sur le support Envi Chrom P en SPE. Les 4 HAP légers testés ($MM \leq 166$ g/mol) sont récupérés en quantité supérieure avec la fraction de 21 mL, ce qui indique une tendance pour ces composés à commencer à être élués au moment du rinçage avec les 9 mL de mélange cyclohexane/éthanol (70/30, v/v). A l'inverse, la quasi-totalité des HAP lourds ($MM \geq 202$ g/mol) sont présents en proportion plus importante dans la fraction d'élution utilisant seulement les 12 mL de mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (40/60, v/v).

5.1.1.4. Etapes de concentration

Les quantités en HAP étudiées sont faibles et nécessitent des étapes d'évaporation des solvants afin de concentrer l'extrait en composés d'intérêt. La méthodologie initiale prévoit deux étapes de concentration.

La première étape d'évaporation est réalisée à la suite de la procédure UAE par l'intermédiaire d'un évaporateur rotatif. L'extrait UAE (20 mL composé de dichlorométhane et de cyclohexane (50:50)) est évaporé jusqu'à environ 1 mL (facteur de concentration 20) puis le résidu est repris dans 1 mL de mélange cyclohexane/dichlorométhane (50:50) et 5 mL de cyclohexane avant d'être soumis à une étape de purification par SPE. Lors de cette première étape d'évaporation, l'échantillon est placé dans un bain marie à 60 °C et sous vide d'air grâce à une trompe à eau, ce qui permet de réduire rapidement le volume de solvant de l'extrait pour faciliter son introduction dans la cartouche SPE dont le volume est de 6 mL.

La seconde étape d'évaporation intervient à la suite de la purification par SPE et utilise un flux d'azote. L'élution des composés d'intérêt de la cartouche SPE est réalisée avec 12 mL d'un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (40:60). L'utilisation du flux d'azote permet d'évaporer ces solvants jusqu'à un volume de 50 μ L, soit un facteur de concentration de 240. L'extrait est ainsi plus concentré en composés d'intérêt ce qui permet d'améliorer la sensibilité.

Les HAP étant des composés assez volatils les procédures d'évaporation peuvent engendrer des pertes en composés d'intérêt et donc être à l'origine d'une variabilité des résultats. Des tests visant à évaluer la variabilité des résultats au cours des deux étapes d'évaporation sont donc mis en place.

Les essais consistent à utiliser une même quantité en HAP à partir d'une solution mère à 80 µg/L. Cette concentration correspond à celle qui serait retrouvée si la totalité des HAP introduits au départ à 4 µg/kg dans l'échantillon (1 g) était récupérée à la fin de la procédure UAE/SPE dans les 50 µL d'extrait.

Dans les deux cas, le facteur de dilution est égal au facteur de concentration, les résultats obtenus après concentration sous flux d'azote (facteur 240) et par évaporateur rotatif (facteur 20) peuvent donc être directement comparés. Pour chaque méthode de concentration, 5 déterminations des solutions diluées puis concentrées sont effectuées. Les résultats obtenus, en aires relatives, après analyse de ces solutions concentrées sont présentés en figure 63.

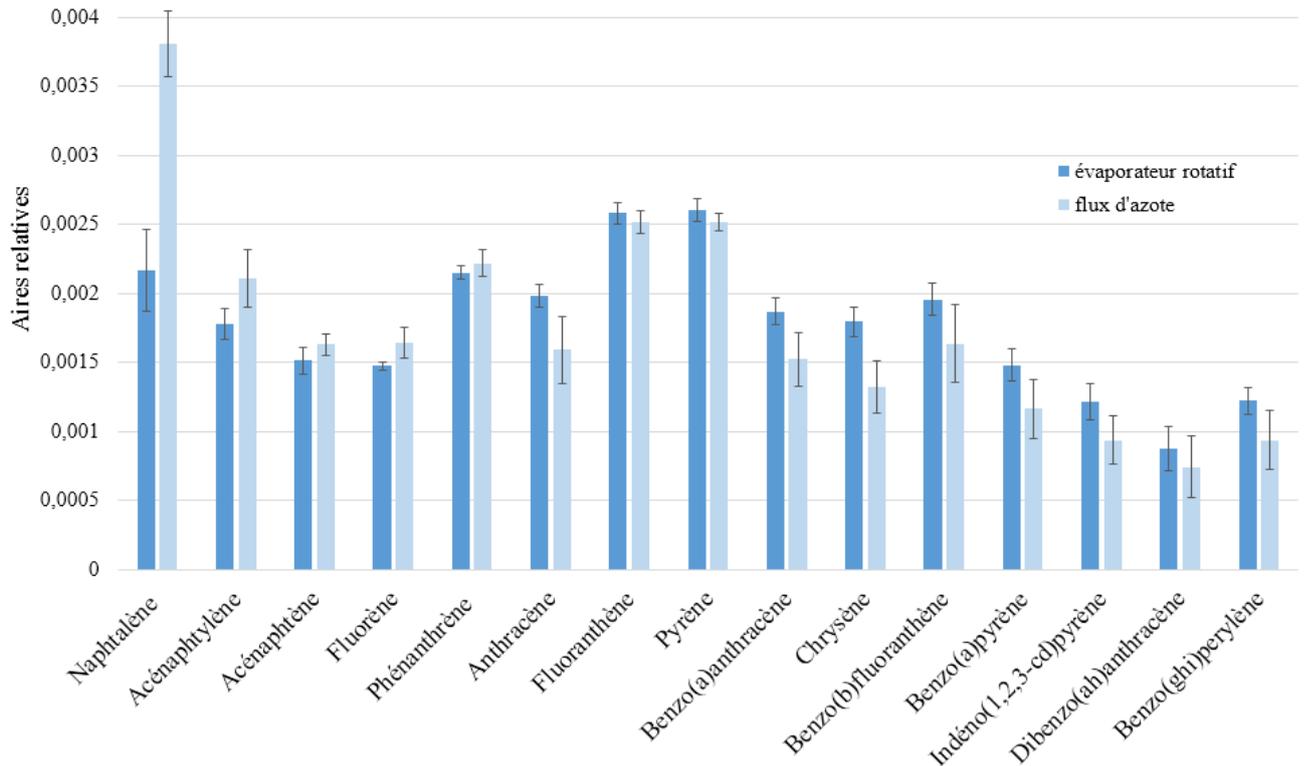


Figure 63 : Récupération et variabilité du contenu en HAP en aires relatives après concentration d'une solution par évaporateur rotatif ou sous flux d'azote afin d'obtenir une concentration finale de 80 µg/L

En bleu foncé : moyenne des aires relatives des 5 analyses d'une solution mère à 80 µg/L diluée d'un facteur 20 dans un mélange cyclohexane/dichlorométhane (50:50) puis concentrée d'un facteur 20 par évaporateur rotatif

En bleu clair : moyenne des aires relatives des 5 analyses d'une solution mère à 80 µg/L diluée d'un facteur 240 dans un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (40:60) puis concentrée d'un facteur 240 sous flux d'azote

Les barres d'erreur correspondent à l'écart type entre les 5 déterminations

L'histogramme en figure 63 indique que les résultats, en aires relatives, obtenus après concentration sous flux d'azote ou par évaporateur rotatif sont faiblement variables. Les aires relatives présentées après concentration sous flux d'azote sont similaires à celles observées après concentration par évaporateur rotatif, excepté pour le naphthalène. Les étapes de concentration ont ainsi un impact relativement faible sur la variabilité de la méthodologie et la proportion analytes ciblés/étalon interne est globalement conservée quel que soit le mode d'évaporation (évaporateur rotatif ou flux d'azote).

Afin d'évaluer les pertes en composés dues aux procédures de concentration, les aires brutes obtenues après concentration sous flux d'azote ou par évaporateur rotatif sont également comparées (figure 64).

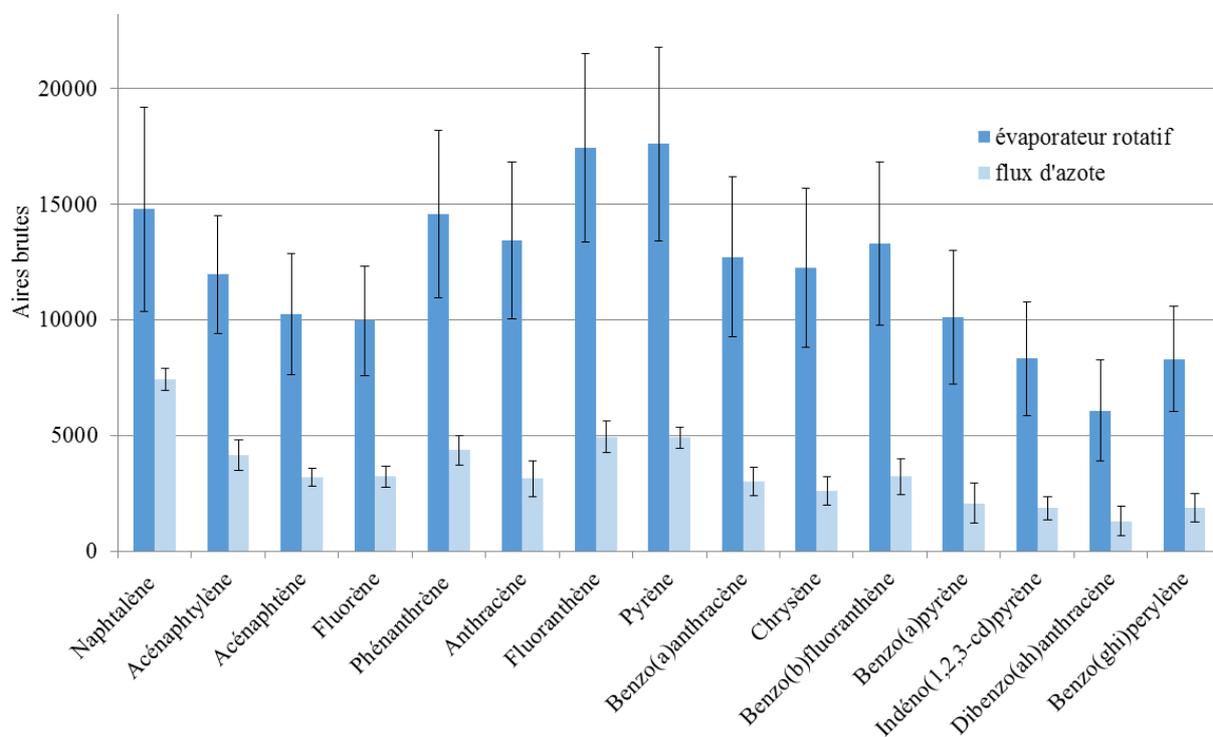


Figure 64 : Récupération et variabilité du contenu en HAP en aires brutes après concentration d'une solution par évaporateur rotatif ou sous flux d'azote afin d'obtenir une concentration finale de 80 µg/L

En bleu foncé : moyenne des aires brutes des 5 analyses d'une solution mère à 80 µg/L diluée d'un facteur 20 dans un mélange cyclohexane/dichlorométhane (50:50) puis concentrée d'un facteur 20 par évaporateur rotatif

En bleu clair : moyenne des aires brutes des 5 analyses d'une solution mère à 80 µg/L diluée d'un facteur 240 dans un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (40:60) puis concentrée d'un facteur 240 sous flux d'azote

Les barres d'erreur correspondent à l'écart type entre les 5 déterminations

Les aires brutes obtenues après concentration par évaporateur rotatif sont globalement plus élevées qu'après concentration sous flux d'azote. La concentration sous flux d'azote semble entraîner une perte en composés d'intérêt plus importante qui peut être expliquée par un facteur de concentration beaucoup plus important. Néanmoins l'ensemble des HAP semble être affecté de manière égale et répétable. Les aires brutes obtenues après évaporation sous flux d'azote sont légèrement moins variables (environ 20 %) qu'après évaporation par évaporateur rotatif (environ 30 %) (figure 64). Une étude comparant l'évaporation sous flux d'argon et par évaporateur rotatif a également montré que la récupération des HAP après ces deux techniques pouvait être variable (autour de 10 % dans les deux cas) (Filipkowska, 2005).

Malgré les pertes et les variations que sont susceptibles d'entraîner les procédures d'évaporation, ces étapes restent nécessaires à la concentration des extraits en composés d'intérêt. De plus, les aires relatives observées après concentration sous flux d'azote et par évaporateur rotatif sont cohérentes entre elles et globalement peu variables.

5.1.1.5. Choix d'un étalon interne adapté à la méthodologie UAE/SPE

L'addition d'un étalon interne à l'échantillon permet de réduire les variabilités induites par l'extraction, la concentration puis l'injection en GC-MS. Deux étalons internes sont testés : le nonadécane et le benzo(*a*)anthracène-d12. Le nonadécane qui appartient à la famille des hydrocarbures a notamment été sélectionné pour sa stabilité dans le temps. Ce composé, dont la masse moléculaire (MM = 268 g/mol) et la température d'ébullition (330 °C) sont proches de celles des HAP (MM de 128 à 278 g/mol et températures d'ébullition de 80 à 536 °C), est généralement non présent dans les matrices fruitières qui contiennent principalement des alcanes linéaires avec un nombre pair de carbones. Le benzo(*a*)anthracène-d12 est choisi pour sa structure et ses propriétés chimiques similaires à celle des HAP testés permettant d'aboutir sur des caractéristiques d'évaporation et d'éluion proches des analytes cibles. Les composés deutérés sont fréquemment sélectionnés comme étalons interne dans les études visant à déterminer les HAP dans diverses matrices (Helaleh, 2005 ; Martorell, 2010).

La répétabilité et la fidélité intermédiaire sont évaluées pour le nonadécane (méthode UAE/SPE 1) et le benzo(*a*)anthracène-d12 (méthode UAE/SPE 2). Ces essais sont réalisés avec des pommes additionnées à 4 µg/kg en HAP selon la procédure décrite dans la section 3.6.2 du chapitre 3 matériels et méthodes. La répétabilité et la fidélité intermédiaire des résultats sont estimées par le calcul des coefficients de variation, rapport de l'écart type des mesures à leur moyenne. Les résultats ainsi obtenus sont reportés en tableau 45.

Tableau 45 : Coefficients de variation (CV %) pour les essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire réalisés à 4 µg/kg avec la pomme pour les méthodes UAE/SPE

	CV (%) <u>méthode UAE/SPE 1</u>		CV (%) <u>méthode UAE/SPE 2</u>	
	Répétabilité (n=3)	Fidélité intermédiaire (n=9)	Répétabilité (n=3)	Fidélité intermédiaire (n=9)
HAP légers				
Naphtalène	17 %	25 %	11 %	26 %
Acénaphthylène	36 %	57 %	1 %	17 %
Acénaphtène	12 %	39 %	5 %	6 %
Fluorène	4 %	28 %	7 %	15 %
Phénanthrène	8 %	35 %	8 %	42 %
Anthracène	4 %	22 %	8 %	20 %
HAP lourds				
Fluoranthène	18 %	27 %	19 %	19 %
Pyrène	13 %	28 %	4 %	9 %
Benzo(a)anthracène	3 %	17 %	1 %	3 %
Chrysène	2 %	21 %	7 %	8 %
Benzo(b)fluoranthène	12 %	19 %	10 %	8 %
Benzo(a)pyrène	7 %	20 %	6 %	12 %
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	4 %	26 %	2 %	25 %
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	6 %	26 %	9 %	23 %
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	7 %	27 %	2 %	22 %

Les coefficients de variations sont déterminés à partir des aires relatives, les étalons interne utilisés sont le nonadécane pour la méthode UAE/SPE 1 et le benzo(a)anthracène-d12 pour la méthode UAE/SPE 2

n : nombre d'échantillons extraits

CV : coefficient de variation

Les coefficients de variations (CV) obtenus pour la répétabilité de la méthode UAE/SPE 1 utilisant le nonadécane comme étalon interne sont inférieurs à 20 % excepté pour l'acénaphthylène dont le CV est de 36 % (tableau 45). La mise en place du benzo(a)anthracène-d12 avec la méthode UAE/SPE 2 permet une réduction des CV, avec des valeurs généralement inférieures à 10 %, pour la plupart des HAP étudiés.

Pour l'anthracène, le benzo(a)anthracène, le chrysène, le benzo(b)fluoranthène et le benzo(a)pyrène, les CV obtenus pour la fidélité intermédiaire avec le nonadécane varient de 17 à 22 %. Pour les autres composés, les CV dépassent les 25 % et des valeurs plus importantes sont observées pour les HAP légers avec une valeur maximale de 57 % atteinte pour l'acénaphthylène. Il semble donc que la méthode UAE/SPE 1 soit peu adaptée à la détermination des HAP légers. L'utilisation du benzo(a)anthracène-d12 comme étalon interne pour la méthode UAE/SPE 2 permet d'obtenir des CV pour la fidélité intermédiaire inférieurs à 25 % pour les HAP lourds. En comparaison des HAP lourds, les CV restent globalement plus élevés pour les HAP légers avec 26 % pour le naphtalène et 42 % pour le phénanthrène (tableau 45).

Les résultats des CV obtenus pour la répétabilité des HAP lourds sont cohérents avec ceux de la littérature qui varient généralement entre 3 et 30 % dans la pomme (Camargo, 2003 ; Jánská, 2006). L'étude de Camargo *et al.* (2003) présente des CV entre 3 % pour le benzo(*a*)pyrène et le benzo(*ghi*)perylène et 13 % pour le fluoranthène (Camargo, 2003). Les 6 répliquats dans le cadre des essais de répétabilité sont réalisés à des concentrations entre 2,9 et 4,6 µg/kg, ce qui est proche des conditions utilisées avec la pomme (4 µg/kg). Dans la littérature, les essais de répétabilité montrent des CV jusqu'à 30 % pour le naphthalène, le benzo(*k*)fluoranthène et le dibenzo(*ah*)anthracène après l'extraction des pommes par soxhlet (Jánská, 2006). Les CV obtenus pour la répétabilité en UAE/SPE avec une détection en GC-MS sont cohérents avec ceux observés avec l'extraction par soxhlet et une séparation par chromatographie liquide couplée à un détecteur de fluorescence (LC-FLD) dans la pomme (Jánská, 2006). Concernant la fidélité intermédiaire, exprimant la variabilité des résultats sur différents jours dans un même laboratoire, aucune donnée relative aux fruits n'a été trouvée dans la littérature pour comparaison.

De bonnes performances sont obtenues pour le benzo(*a*)anthracène avec la méthode UAE/SPE 2, avec 1 % de variation pour les essais de répétabilité (tableau 45), ce qui peut être dû à l'utilisation du benzo(*a*)anthracène-d12 comme étalon interne qui possède des caractéristiques d'extraction similaires à son homologue non deutéré. Globalement, une plus faible variabilité des résultats est observée avec le benzo(*a*)anthracène-d12 par rapport au nonadécane. Cette amélioration s'explique notamment par la faible rétention du nonadécane sur le support SPE. Le nonadécane est environ 10 fois plus retrouvé dans le solvant servant à rincer la cartouche SPE que dans l'éluat (figure 62). L'élution visant à récupérer les HAP retenus sur le support SPE entraîne donc une récupération très incomplète du nonadécane après l'étape de purification.

La méthode UAE/SPE 2 permet d'obtenir une variabilité cohérente pour l'ensemble des HAP pour la concentration testée de 4 µg/kg et semble un peu plus fidèle que la méthode UAE/SPE 1 pour une détermination des HAP à partir de 166 g/mol.

5.1.1.6. Séparation et détection en GC-MS

5.1.1.6.1. Introduction

Les extraits obtenus, après UAE/SPE puis concentration, sont analysés par GC-MS (voir sections 3.2.2.1 et 3.5.2.3, partie « Matériels et Méthodes »). Les conditions analytiques initialement fixées au laboratoire (Poinot, 2014) pour un appareil de type Varian 3800 GC couplé à un spectromètre de masse à trappe ionique Saturn 2000 ont été adaptées à un nouvel appareil de GC-MS possédant un analyseur de masse quadripolaire de type Shimadzu QP 2010. Ce choix a été dicté par le fait que (i) le précédent appareil engendrait une variabilité importante lors d'analyses de solutions standards en HAP faiblement concentrées, (ii) que l'analyse au moyen d'un analyseur de type trappe ionique peut conduire à d'importantes « déformations » spectrales avec notamment des phénomènes de protonation des ions moléculaires, (iii) que le modèle de trappe ionique conduit nécessairement à une perte sèche de la moitié des ions produits lors de l'éjection vers le détecteur d'ions et que, (iv)

l'isolement d'ions multiples est relativement compliqué à mettre en œuvre au moyen d'un analyseur de type trappe ionique.

5.1.1.6.2. Conditions de séparation en GC-MS

Les teneurs étudiées en HAP ayant été diminuées d'un facteur 1 000 (mg/kg au µg/kg), le mode splitless de l'injection est conservé. Ainsi, l'intégralité de l'extrait injecté est analysée ce qui permet une détection sensible des composés présents en faibles quantités dans l'échantillon. Concernant le volume injecté, il est réduit de 5 µL à 1 µL. L'injection d'un plus faible volume d'échantillon permet de réduire le rapport signal/bruit des pics de HAP.

La séparation est opérée sur phase stationnaire très peu polaire de type DB5-MS. Cette phase a été conservée car elle permet d'obtenir (i) de très bonnes résolutions entre pics de HAP et (ii) de pouvoir éluer de façon efficace des analytes de poids moléculaires relativement élevés (jusqu'à 278 g/mol pour le dibenzo(*ah*)anthracène). C'est, de plus, le type de phase stationnaire le plus répandu pour la séparation de HAP dans les matrices alimentaires (Górna-Binkul, 1996 ; Abou-Arab, 2014 ; Wu, 2016).

5.1.1.6.3. Conditions de détection en GC-MS

Après ionisation électronique dans la source du spectromètre de masse couplé au chromatographe, la détection des HAP est réalisée tout d'abord par un balayage total des ions (mode « full scan »). Cette étape est réalisée au moyen d'une solution standard en HAP relativement concentrée (1 g/L). Cela permet expérimentalement de repérer les rapports m/z des ions les plus pertinents à sélectionner pour l'intégration de chaque pic.

Les faibles rapports signal/bruit obtenus par balayage total n'ont pas permis d'envisager une quantification comprise entre 0 et 10 µg/kg tel que cela était réalisé au moyen de la procédure initiale (Poinot, 2014). La sensibilité est augmentée par isolement des ions en mode SIM ; les rapports m/z des ions isolés lors des analyses des HAP sont précisés dans la section 3.5.2.3. La durée totale de l'analyse est segmentée et chaque segment d'analyse est dédié à la détection de plusieurs composés. Un ou deux ions spécifiques sont sélectionnés pour chacun des composés. Le mode SIM permet le balayage de l'ensemble des rapports masse/charge des ions sélectionnés dans un temps donné. Le temps consacré pour chaque ion diminue avec l'augmentation du nombre d'ions sélectionnés.

Le mode SIM limite la détection à certains ions (ratios masse/charge) préalablement sélectionnés et non à une détection de l'ensemble des spectres de masse. La détection sélective en MS avec le mode SIM permet d'éviter la détection de composés issus de la matrice et éventuellement co-élus à ceux des analytes. De plus, en mode SIM la durée totale de l'analyse est segmentée. Chaque segment est dédié à la détection d'un faible nombre d'ions afin d'éviter une perte de sensibilité.

5.1.2. Validation d'une stratégie combinant la HS-SPME et l'UAE/SPE pour l'extraction et la détermination des HAP à l'état de traces dans diverses matrices fruitières

5.1.2.1. Introduction

La variabilité des résultats avec la méthode UAE/SPE 2 a été étudiée à travers la réalisation des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour la pomme (résultats présentés précédemment en tableau 45). Afin de valider la méthodologie pour la détermination des HAP à des concentrations inférieures à 10 µg/kg, la linéarité des résultats est vérifiée et la sensibilité est évaluée. La linéarité de la méthode UAE/SPE 2 est testée pour chacun des 16 HAP au moyen d'ajouts équivalents compris entre 0 et 10 µg/kg à des pommes du commerce. Néanmoins, la linéarité n'est pas vérifiée pour les HAP les plus légers avec des données de linéarité inutilisables liées à des R^2 très faibles voire nuls (tableau 46).

Tableau 46 : Données de linéarité pour les HAP légers entre 0 et 10 µg/kg avec la méthode UAE/SPE 2

Composés	Pente	R^2
Naphtalène	0,1708	0
Acénaphthylène	0,0143	0,6023
Acénaphthène	0,0195	0
Fluorène	0,0267	0
Phénanthrène	0,0683	0
Anthracène	0,0176	0,9503

Ce manque de linéarité peut notamment s'expliquer par la co-extraction de composés de la matrice induisant la présence d'un bruit de fond important au niveau des temps de rétention de ces composés (entre environ 9 et 18 min), comme le montre la figure 65.

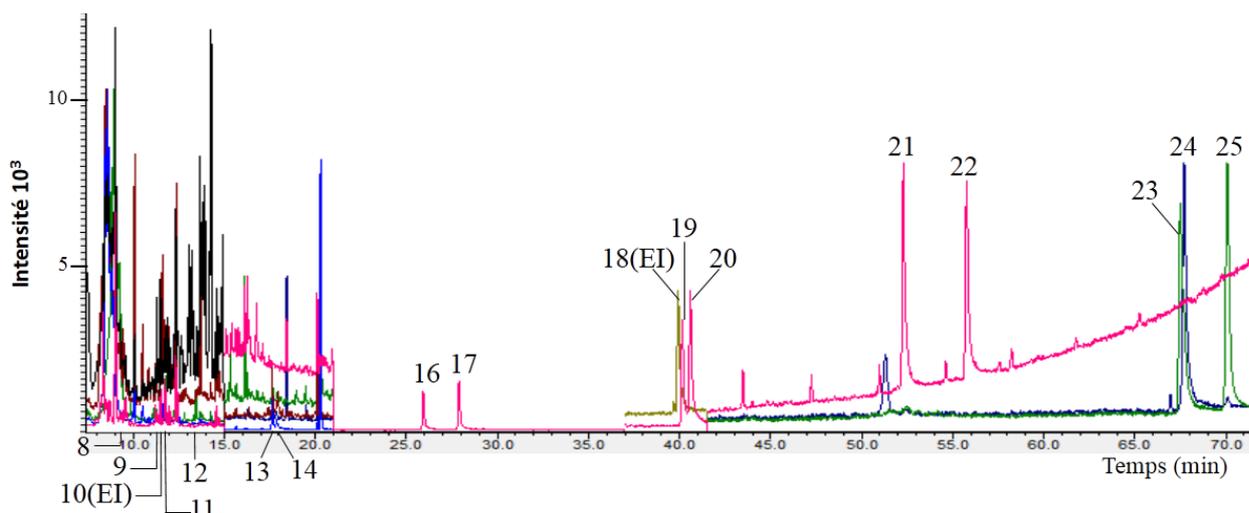


Figure 65 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS pour une pomme additionnée en HAP à 10 µg/kg extraits de la pomme avec la méthode UAE/SPE 2

EI : étalon interne, les chiffres au-dessus des pics correspondent aux composés du tableau 47, détection sélection d'ions de rapports m/z compris entre 128 et 166 (avant 21 min) et compris entre 202 et 278 (entre 25 et 72 min)

Les conditions de séparation et de détection sont précisées dans la section 3.5.2.3 du chapitre 3

Le bruit de fond important en début du chromatogramme peut empêcher la détection d'un signal correspondant aux faibles quantités en HAP légers dans l'échantillon de pomme. Les faibles teneurs étudiées pour les HAP ne permettent pas de différencier le signal du bruit de fond pour les composés les plus légers. La méthode UAE/SPE 2 n'est donc pas adaptée à la détection des HAP légers présents en faible concentration dans les pommes. En raison d'un bruit de fond moins élevé pour des rapports m/z supérieurs à 200, elle est applicable à la quantification de HAP de poids moléculaires à partir de 202 g/mol.

Pour les HAP légers, leur volatilité suffisante permet d'envisager une extraction par HS-SPME, cette méthodologie est d'ores et déjà utilisée pour le dosage des BTEX (voir chapitre 4), l'objet de cette partie est de démontrer qu'une stratégie combinant les deux méthodologies d'extraction (UAE/SPE et HS-SPME) peut permettre une détermination cohérente à la fois des HAP lourds et des HAP légers dans les matrices fruitières que sont la pomme, la poire, la prune et le raisin. Les critères de validation du dosage des HAP lourds (voir tableau 47) par UAE/SPE seront tout d'abord présentés (partie 5.1.2.2) puis ceux du dosage des HAP légers (voir tableau 47) par HS-SPME (partie 5.1.2.3).

Tableau 47 : Temps de rétention et ions utilisés pour la détection des HAP ciblés par les différentes méthodologies

Composés	Abréviation	ion SIM I	N° CAS	t _R † (min)	
				Méthodes UAE/SPE et UAE/MEPS	Méthodes HS-SPME
1 Benzène	B	78	71-43-2		13,6
2 Toluène	T	91	108-88-3		29,8
3 Ethylbenzène-d10*	E-d10	116	25837-05-2		26,0
4 Ethylbenzène	E	91	100-41-4		26,4
5 <i>m/p</i> -Xylènes	<i>m/p</i> -X	91	108-38-3/106-42-3		27,0
6 <i>o</i> -Xylène	<i>o</i> -X	91	95-47-6		28,7
7 Nonane	No	43	111-84-2		28,9
8 Naphtalène	NPH	128	91-20-3	9,0	42,3
9 Acénaphtylène	ACY	152	208-96-8	11,8	47,9
10 Acénaphène-d10*	ACP-d10	164	15067-26-2	12,1	48,4
11 Acénaphène	ACP	153	83-32-9	12,2	48,5
12 Fluorène	FLR	166	86-73-7	13,7	51,0
13 Phénanthrène	PHE	178	85-01-8	17,9	57,2
14 Anthracène	ANT	178	120-12-7	18,2	57,6
15 Nonadécane	Nd	57	629-92-5	19,0	
16 Fluoranthène	FA	202	206-44-0	26,2	
17 Pyrène	PYR	202	129-00-0	28,2	
18 Benzo(<i>a</i>)anthracène-d12*	BaA-d12	240	1718-53-2	40,4	
19 Benzo(<i>a</i>)anthracène	BaA	228	56-55-3	40,7	
20 Chrysène	CHR	228	218-01-9	41,1	
21 Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	BbFA	252	205-99-2	53,0	
22 Benzo(<i>a</i>)pyrène	BaP	252	50-32-8	56,7	
23 Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	IP	276	193-39-5	68,5	
24 Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	DBahA	278	53-70-3	68,7	
25 Benzo(<i>ghi</i>)perylène	BghiP	276	191-24-2	71,0	

UAE/SPE : extraction assistée par les ultrasons suivie d'une extraction en phase solide

UAE/MEPS : extraction assistée par les ultrasons suivie d'une micro-extraction par solide compacté

HS-SPME : micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête

* étalons internes

I ion correspondant à l'ion majoritaire du spectre de masse utilisé pour la détection sélective d'ion (mode SIM)

† t_R : temps de rétention obtenus avec les programmations de températures suivante pour l'UAE/SPE et l'UAE/MEPS 80 °C pendant 1 min, 60 °C/min jusqu'à 200 °C, 2 °C/min jusqu'à 330 °C pendant 5 min ; pour la HS-SPME 40 °C pendant 2 min, 2 °C/min jusqu'à 55 °C pendant 5 min, 4 °C/min jusqu'à 100 °C pendant 5 min, 60 °C/min jusqu'à 200 °C, 2 °C/min jusqu'à 250 °C, 30 °C/min jusqu'à 300 °C pendant 5 min

En gris foncé : composés présentés et discutés en chapitre 4

5.1.2.2. Validation du dosage des HAP lourds dans différentes matrices fruitières par UAE/SPE

5.1.2.2.1. Linéarité des HAP lourds pour une gamme de concentrations de 0 à 10 µg/kg

La linéarité des mesures entre 0 et 10 µg/kg pour 9 HAP lourds est testée et appliquée à 4 fruits différents au moyen de la méthode UAE/SPE 2 (section 3.6.1 du chapitre 3 présentant les matériels et méthodes). Les droites obtenues pour le benzo(*ghi*)perylène, le benzo(*b*)fluoranthène, le chrysène et le pyrène sont présentées pour un échantillon de pomme du commerce en figure 66.

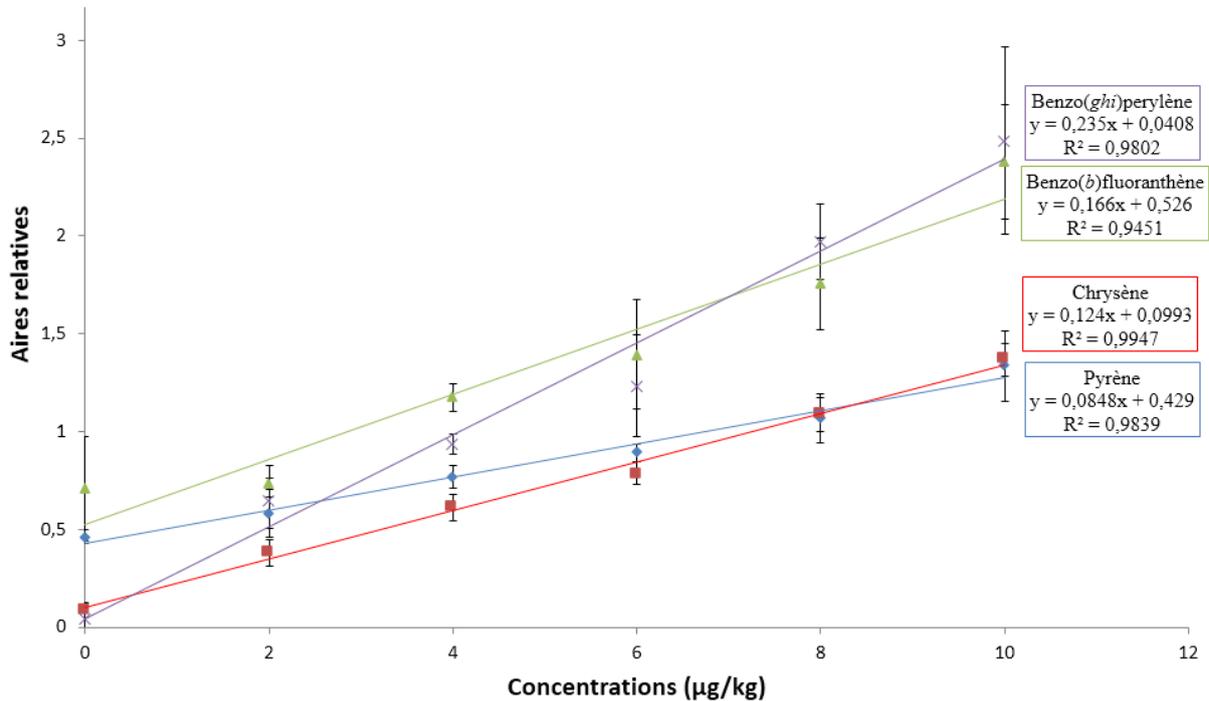


Figure 66 : Droites d'étalonnage pour le benzo(*ghi*)perylène, benzo(*b*)fluoranthène, chrysène, pyrène réalisées avec la méthode UAE/SPE 2 pour des ajouts compris entre 0 et 10 µg/kg à une pomme
Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les valeurs des 3 étalonnages réalisés

Pour les HAP lourds dont la linéarité est vérifiée entre 0 et 10 µg/kg, les valeurs des pentes, des coefficients de détermination (R^2) et des ordonnées à l'origine des régressions linéaires obtenues avec la méthode UAE/SPE 2 pour la pomme, la poire, la prune et le raisin sont regroupées dans le tableau 48.

Tableau 48 : Données de linéarité obtenues pour les HAP lourds avec la méthode UAE/SPE 2 pour différentes matrices fruitières

Composés	Pomme			Poire			Prune			Raisin		
	Pente	Origine	R ²									
Fluoranthène	0,0621 ^a	0,4832	0,9834	0,0841 ^a	0,0641	0,9951	0,0709 ^a	0,360	0,9700	0,0829 ^a	0,491	0,9639
Pyrène	0,0848 ^a	0,4287	0,9839	0,101 ^a	0,0811	0,9942	0,0952 ^a	0,2875	0,9848	0,106 ^a	0,381	0,9578
Benzo(<i>a</i>)anthracène	0,113 ^a	0,0445	0,9928	0,113 ^a	0	0,9974	0,122 ^a	0	0,9961	0,129 ^a	0	0,9809
Chrysène	0,124 ^a	0,0993	0,9947	0,133 ^a	0	0,9969	0,146 ^a	0	0,9893	0,152 ^a	0	0,9700
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	0,166 ^a	0,526	0,9451	0,165 ^a	0,428	0,9342	0,146 ^a	0,475	0,9186	0,157 ^a	0,453	0,9357
Benzo(<i>a</i>)pyrène	0,211 ^a	0	0,9770	0,186 ^a	0,0143	0,9831	0,184 ^a	0	0,9891	0,192 ^a	0	0,9927
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	0,258 ^a	0,0369	0,9804	0,233 ^a	0	0,9971	0,237 ^a	0	0,9933	0,241 ^a	0	0,9595
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	0,224 ^a	0	0,9693	0,196 ^a	0	0,9968	0,189 ^a	0	0,9939	0,198 ^a	0	0,9684
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	0,235 ^a	0,0408	0,9802	0,208 ^a	0	0,9989	0,212 ^a	0	0,9914	0,216 ^a	0	0,9716

6 points de concentrations (0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg/kg) sont analysés en triplicats

a : indique pour chaque composé les pentes qui ne sont pas significativement différentes; méthode HSD (honest significant difference) Tukey : 95%

Le calcul du coefficient de détermination (R^2) permet, pour chaque composé extrait dans les différents fruits, de vérifier la linéarité de l'étalonnage pour la méthode UAE/SPE 2. Pour l'ensemble des fruits étudiés, les R^2 obtenus pour chaque HAP lourds varient entre 0,9186 pour le benzo(*b*)fluoranthène dans la prune et 0,9989 pour le benzo(*ghi*)perylène dans la poire.

Le benzo(*b*)fluoranthène montre de faibles R^2 dans l'ensemble des fruits étudiés (entre 0,9186 et 0,9451). La valeur médiane obtenue pour les R^2 avec la méthode UAE/SPE 2 pour l'ensemble des HAP dans les différents fruits est de 0,9836 (ou 0,9869 si les valeurs de R^2 pour le benzo(*b*)fluoranthène ne sont pas prises en compte).

La comparaison des performances de linéarité avec les données de la littérature est notamment entravée par le manque d'information sur les gammes de concentrations étudiées dans les fruits et légumes. Des gammes étudiant les HAP entre 10 et 100 ng par injection montrent des R^2 supérieurs à 0,989 (Tuteja, 2011). Pour des concentrations en HAP comprises entre 2 et 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, les R^2 obtenus avec le radis sont supérieurs à 0,996 (Lei, 2011). Les R^2 obtenus avec la méthode UAE/SPE 2 dans les différents fruits sont pour certains inférieurs à ceux indiqués dans la littérature. Néanmoins, les gammes de cette étude ne s'étendent que sur une décade et étudient 6 points de concentrations entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La réalisation de gamme d'étalonnage sur un grand nombre de décades avec un faible nombre de points concentrations étudiés peut conduire à des R^2 plus élevés. Les résultats de linéarité observés pour les HAP lourds entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ extraits avec la méthode UAE/SPE 2 dans les différents fruits peuvent donc être considérés comme corrects et globalement cohérents avec les données extraites de la littérature.

La comparaison des pentes pour les différents fruits est réalisée grâce au test ANOVA. Les résultats de ce test montrent que pour la totalité des HAP lourds, le changement de matrice fruitière n'induit pas de variation significative (95 %) de la pente.

L'extraction par UAE/SPE ne semble donc pas être dépendante de la matrice extraite. La méthode UAE/SPE 2 peut donc potentiellement être transposée à n'importe quelle matrice fruitière.

Quelques ordonnées à l'origine (point à 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) se révèlent assez élevées pour certains composés (tableau 48), ce qui indique une présence de HAP dans les fruits étudiés, provenant du commerce. Le contenu intrinsèque des fruits du commerce sera étudié dans la section 5.2.3.1.

5.1.2.2.2. Limites de détection et de quantification des HAP lourds

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont ensuite calculées avec la méthode UAE/SPE 2 selon la procédure décrite dans la section 3.6.3 du chapitre 3 (page 149). Les valeurs obtenues pour les LOD et LOQ avec la pomme, la poire, la prune et le raisin sont données dans le tableau 49.

Tableau 49 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) obtenus pour les HAP lourds avec la méthode UAE/SPE 2 pour différentes matrices fruitières ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de masse fraîche)

Composés	Pomme		Poire		Prune		Raisin	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
	$(\mu\text{g}/\text{kg})$		$(\mu\text{g}/\text{kg})$		$(\mu\text{g}/\text{kg})$		$(\mu\text{g}/\text{kg})$	
Fluoranthène	0,089	0,297	0,115	0,382	0,088	0,295	0,075	0,249
Pyrène	0,080	0,268	0,091	0,303	0,078	0,260	0,069	0,231
Benzo(<i>a</i>)anthracène	0,128	0,428	0,126	0,419	0,093	0,312	0,087	0,291
Chrysène	0,100	0,333	0,099	0,330	0,072	0,241	0,068	0,226
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	0,160	0,533	0,112	0,375	0,094	0,314	0,081	0,268
Benzo(<i>a</i>)pyrène	0,172	0,572	0,133	0,444	0,111	0,370	0,102	0,340
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	0,135	0,449	0,138	0,459	0,107	0,356	0,086	0,287
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	0,125	0,418	0,141	0,472	0,107	0,356	0,093	0,310
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	0,113	0,378	0,115	0,384	0,092	0,307	0,077	0,255

Avec la méthode UAE/SPE 2, les valeurs des LOD et LOQ sont globalement plus faibles pour la prune et le raisin que pour la pomme et la poire. Les LOD dans les différents fruits varient entre 0,068 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. pour le chrysène dans le raisin et 0,172 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. pour le benzo(*a*)pyrène dans la pomme. Les LOQ sont quant à elles comprises entre 0,226 et 0,572 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w.. Ces faibles valeurs permettent, avec la méthode UAE/SPE 2, la quantification des HAP lourds à des teneurs inférieures à 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans les différents fruits et leur détection à des teneurs inférieures à 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Ces valeurs sont cohérentes avec celles trouvées dans la littérature pour les HAP dans les fruits et légumes. Des LOD entre 0,01 et 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sont notamment déterminées pour les HAP (MM entre 128 et 278 g/mol) dans la pomme (Jánská, 2006). Pour les légumes, des limites de détection comprises entre 0,07 et 1,29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sont trouvées (Soceanu, 2014).

Les faibles limites obtenues avec la méthode UAE/SPE 2 sont compatibles avec la recherche des HAP lourds à l'état de trace dans les échantillons de fruits.

5.1.2.3. Validation du dosage des HAP légers par HS-SPME

5.1.2.3.1. Séparation des HAP légers en GC-MS après extraction par HS-SPME

Les HAP légers étant des composés assez volatils, l'utilisation d'une extraction par HS-SPME peut être envisagée pour leur détermination. La méthode d'analyse en GC-MS pour des extraits HS-SPME est donc optimisée dans ce sens. Les modifications de la méthode d'analyse consistent à modifier le gradient de températures en reprenant celui utilisé en

UAE/SPE. La méthode est modifiée à partir de 30,75 min (à 100 °C) avec une augmentation de 60 °C/min jusqu'à 200 °C, de 2°C/min jusqu'à 250 °C et enfin de 30° C/min jusqu'à 300 °C. La température finale de 300 °C est maintenue pendant 5 minutes. La durée totale du programme est 64,08 min. Cette modification permet la détection des HAP légers à la suite des BTEX (figure 67).

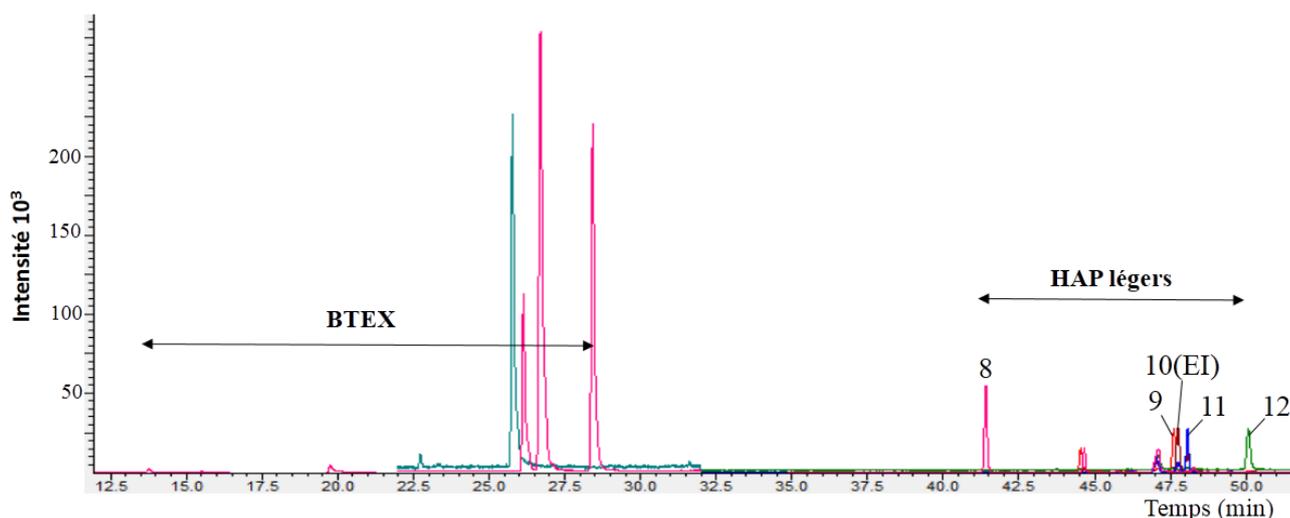


Figure 67 : Chromatogramme obtenu en GC-qMS avec la méthode HS-SPME 2 pour un échantillon de pomme additionné en HAP et BTEX à 10 µg/kg

EI : étalon interne, les chiffres au-dessus des pics correspondent aux composés du tableau 47, détection sélective d'ions de rapports m/z compris entre 78 et 91 (avant 30 min) et compris entre 128 et 166 (entre 40 et 52 min)

Gradient de température : température initiale 40 °C maintenue 2 min ; 2 °C/min jusqu'à 55 °C maintenue 5 min ; 4 °C/min jusqu'à 100 °C maintenue 5 min ; 60 °C/min jusqu'à 200 °C ; 2 °C/min jusqu'à 250 °C ; 30 °C/min jusqu'à 300 °C maintenue 5 min.

Pour chacun des HAP extraits par HS-SPME, les caractéristiques des pics obtenus en GC-MS sont rassemblées en tableau 47.

5.1.2.3.2. Choix de la fibre d'extraction en HS-SPME pour la détermination des HAP légers

La méthode HS-SPME initialement mise en place prévoyait uniquement la détermination des BTEX. La fibre CAR/PDMS alors utilisée s'est révélée peu adaptée à la récupération des HAP, composés moins volatils que les BTEX. Des revêtements PDMS d'épaisseur comprises entre 7 et 100 µm sont fréquemment utilisés dans la littérature pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques monocycliques et polycycliques à partir d'échantillons environnementaux et alimentaires (Doong, 2000 ; Lei, 2011 ; Menéndez, 2000 ; Tankiewicz, 2013). Le revêtement PDMS d'épaisseur 7 µm n'est pas retenu car de meilleures capacités d'extraction sont attendues avec des supports d'épaisseur plus importante (30 et 100 µm). Des supports PDMS de 30 et de 100 µm d'épaisseur sont donc sélectionnés et testés pour la récupération des HAP en HS-SPME à partir d'un échantillon de pomme.

Des extractions réalisées en HS-SPME à partir d'échantillons de pomme additionnés de HAP à 10 µg/kg avec des fibres possédant des revêtements CAR/PDMS de 75 µm d'épaisseur,

PDMS de 30 μm et 100 μm sont comparées. Les aires brutes obtenues pour chaque HAP léger sont regroupées en tableau 50.

Tableau 50 : comparaison des aires brutes obtenues après HS-SPME, pour un échantillon de pomme additionné en HAP légers à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, avec des fibres ayant différents revêtements CAR/PDMS 75 μm , PDMS 30 μm et PDMS 100 μm

Type de fibre	CAR/PDMS 75 μm	PDMS 30 μm	PDMS 100 μm
Naphtalène	440223	47654	171452
Acénaphtylène	95606	46240	152423
Acénaphène	196579	45020	165421
Acénaphène-d10	171494	36222	116243
Fluorène	23346	47537	147042
Phénanthrène	3667	55484	88445
Anthracène	1823	54081	81974

D'importantes aires brutes pour les composés les plus légers sont obtenus pour la fibre CAR/PDMS. Cependant, une faible extraction des composés tels que le phénanthrène et l'anthracène est observée. Globalement, la fibre CAR/PDMS 75 μm s'avère être la plus adaptée à l'extraction des composés les plus volatils. La fibre comportant un revêtement PDMS de 30 μm permet une bonne extraction de l'ensemble des HAP légers et notamment du phénanthrène et de l'anthracène. Les aires brutes obtenues avec la fibre comportant un revêtement PDMS de 30 μm sont homogènes ce qui montre une extraction similaire de tous les HAP légers étudiés. L'utilisation de la fibre PDMS de 100 μm pour l'analyse d'une pomme polluée à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ permet d'améliorer très nettement l'extraction de tous les HAP légers par rapport à la fibre PDMS d'épaisseur 30 μm puisque les aires brutes obtenues avec la fibre PDMS 100 μm sont 1,5 à 3,7 fois supérieures à celles trouvées avec la fibre PDMS de 30 μm . Des valeurs plus importantes pour les aires brutes à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ permettent d'envisager une bonne détection des composés à de plus faibles concentrations avec la fibre PDMS d'épaisseur 100 μm . Doong *et al.* ont également montré l'amélioration de l'efficacité de l'extraction des HAP avec l'augmentation de l'épaisseur du revêtement PDMS (Doong, 2000). Les revêtements épais sont également connus pour être plus particulièrement adaptés à la récupération des composés volatils (King, 2003).

La fibre CAR/PDMS d'épaisseur 75 μm ayant montré la meilleure capacité d'extraction pour les HAP les plus légers, et la fibre PDMS d'épaisseur 100 μm étant plus particulièrement adaptée à l'extraction des HAP de masse molaire comprise entre 166 et 178 g/mol , ces deux supports sont testés afin de vérifier la fidélité de l'extraction pour les HAP à 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

5.1.2.3.3. Essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour la détermination des HAP légers par HS-SPME

Différents paramètres sont utilisés pour déterminer la fidélité de la réponse analytique des HAP légers par HS-SPME :

- la méthode HS-SPME 1 utilise une fibre possédant un revêtement CAR/PDMS d'épaisseur 75 µm et le nonane comme étalon interne
- la méthode HS-SPME 2 met en œuvre une fibre avec un revêtement CAR/PDMS d'épaisseur 75 µm et l'acénaphthène-d10 comme étalon interne
- la méthode HS-SPME 3 utilise une fibre ayant un revêtement PDMS d'épaisseur 100 µm et l'acénaphthène-d10 comme étalon interne

Les coefficients de variation obtenus, pour ces différentes méthodes HS-SPME, lors des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire réalisés avec une pomme additionnée de HAP à 4 µg/kg sont présentés dans le tableau 51.

Tableau 51 : Coefficients de variation (CV %) des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire obtenus pour les méthodes HS-SPME avec les HAP légers introduits à 4 µg/kg dans des pommes du commerce

	CV (%) <u>méthode HS-SPME 1</u>		CV (%) <u>méthode HS-SPME 2</u>		CV (%) <u>méthode HS-SPME 3</u>	
	Répétabilité (n=3)	Fidélité intermédiaire (n=8)	Répétabilité (n=4)	Fidélité intermédiaire (n=12)	Répétabilité (n=3)	Fidélité intermédiaire (n=9)
Naphtalène	4%	24%	10%	23%	2%	7%
Acénaphtylène	17%	41%	18%	17%	3%	10%
Acénaphthène	19%	36%	13%	23%	9%	10%
Fluorène	25%	43%	4%	30%	9%	15%
Phénanthrène	26%	87%	nd	nd	16%	35%
Anthracène	40%	67%	nd	nd	16%	34%

Les coefficients de variations sont déterminés à partir des aires relatives

méthode HS-SPME 1 : fibre CAR/PDMS 75 µm et nonane comme étalon interne

méthode HS-SPME 2 : fibre CAR/PDMS 75 µm et acénaphthène-d10 comme étalon interne

méthode HS-SPME 3 : fibre PDMS 100 µm et acénaphthène-d10 comme étalon interne

n : nombre d'échantillons extraits

CV : coefficient de variation

nd : non détecté

Les essais de répétabilité avec la méthode HS-SPME 1, utilisant le nonane comme étalon interne, donnent des coefficients de variation supérieurs à 17 % excepté pour le naphtalène (CV=4 %). En ce qui concerne la fidélité intermédiaire, les coefficients de variation atteignent jusqu'à 87 % pour le phénanthrène (tableau 51). Ces résultats montrent que la méthode HS-SPME 1 est adaptée à l'extraction des composés les plus volatils ($128 \text{ g/mol} \leq \text{MM} \leq 166$

g/mol). Les valeurs de fidélité sont critiques pour le phénanthrène et l'anthracène en raison d'une faible extraction de ces 2 HAP au moyen d'une fibre CAR/PDMS (tableau 50).

Avec la méthode HS-SPME 2, utilisant l'acénaphène-d10 comme étalon interne, les coefficients de variation obtenus (tableau 51) pour les HAP légers lors des essais de répétabilité sont compris entre 4 % pour le fluorène et 18 % pour l'acénaphylène. Pour la fidélité intermédiaire, les CV varient entre 17 et 30 %. En ce qui concerne le phénanthrène et l'anthracène, le signal à 4 µg/kg ne peut pas être différencié du bruit de fond avec la méthode HS-SPME 2. L'application de l'acénaphène-d10 à la méthode HS-SPME 2 a permis une amélioration globale de la variabilité des résultats par rapport à la méthode HS-SPME 1. Néanmoins, la méthode HS-SPME 2 est inadaptée à la détermination du phénanthrène et de l'anthracène dont la volatilité est moins importante que celle des autres HAP légers.

Les coefficients de variation obtenus (tableau 51) pour la répétabilité des HAP de masse moléculaire jusqu'à 166 g/mol avec la méthode HS-SPME 3, utilisant un support PDMS d'épaisseur 100 µm et l'acénaphène-d10 comme étalon interne, sont inférieurs à 10 %. Les CV pour la fidélité intermédiaire n'excèdent pas 15 % pour ces composés. En ce qui concerne le phénanthrène et l'anthracène, les CV sont de 16 % pour la répétabilité et atteignent jusqu'à 35 % pour la fidélité intermédiaire. Pour ces deux composés, les CV obtenus avec la méthode HS-SPME 3 sont acceptables en raison de la capacité de la fibre PDMS à pouvoir les extraire (tableau 50).

La fibre PDMS d'épaisseur 100 µm permet la détection et la quantification de l'ensemble des HAP légers, ce qui ne pouvait pas être envisagé avec le revêtement CAR/PDMS d'épaisseur 75 µm.

La HS-SPME trouve très peu d'application pour l'extraction des HAP dans les matrices fruitières. Les performances des méthodes développées sont donc comparées aux résultats observés pour les légumes avec la HS-SPME et un détecteur à ionisation de flamme (Lei, 2011). Les CV obtenus pour l'extraction des HAP avec les méthodes HS-SPME 2 et 3 (tableau 51) sont supérieurs à ceux observés dans les travaux de Lei *et al.* (Lei, 2011). Les CV pour les essais de répétabilité en HS-SPME avec des radis varient de 3 à 12 %, cependant, la concentration testée est 25 fois plus élevée (100 µg/kg) que celle utilisée pour la pomme (4 µg/kg).

5.1.2.3.4. Vérification de la linéarité des courbes d'étalonnage pour la détermination de HAP légers à des teneurs inférieures à 10 µg/kg par HS-SPME (méthodes HS-SPME 2 et 3)

La méthode HS-SPME 2, globalement plus fidèle que la méthode HS-SPME 1, est appliquée à la détermination des 4 HAP les plus légers entre 0 et 10 µg/kg afin de vérifier la linéarité des résultats. Les droites ainsi obtenues pour le naphthalène, l'acénaphène, l'acénaphylène et le fluorène sont présentées en figure 68.

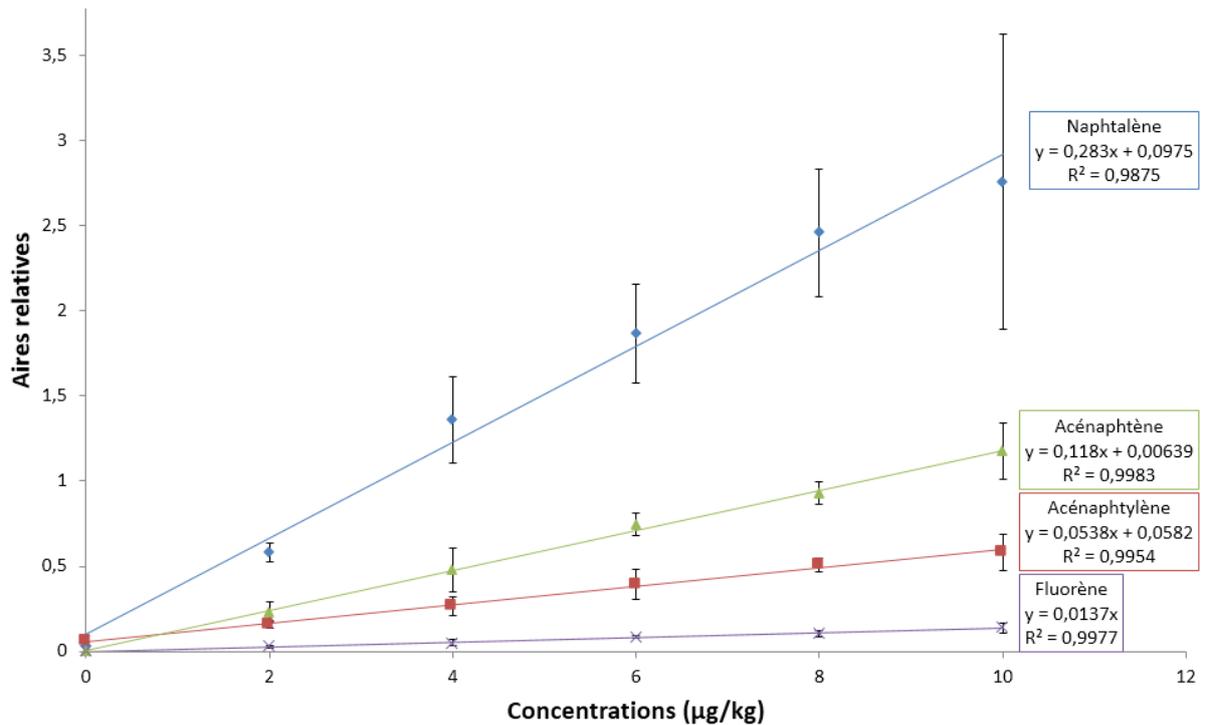


Figure 68 : Droites d'étalonnage réalisées avec la pomme pour des ajouts compris entre 0 et 10 µg/kg pour les 4 HAP les plus légers (méthode HS-SPME 2)

Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les valeurs des 3 étalonnages réalisés

La linéarité de la réponse analytique en fonction de la quantité de HAP léger introduite entre 0 et 10 µg/kg avec la méthode HS-SPME 2 permet d'obtenir des R² compris entre 0,9875 et 0,9983. Les bons résultats obtenus avec la pomme ont conduit à tester la capacité de la méthode HS-SPME 2 à être utilisée avec d'autres matrices fruitières.

Les gammes d'étalonnage pour les HAP entre 0 et 10 µg/kg sont réalisées avec la méthode HS-SPME 2 pour différents fruits que sont la poire, la prune et le raisin. Les résultats de linéarité obtenus avec ces fruits sont ensuite comparés à ceux déterminés avec la pomme (tableau 52).

Tableau 52 : Données de linéarité pour les HAP légers extraits à partir de différentes matrices fruitières avec la méthode HS-SPME 2

Composés	Pomme			Poire			Prune			Raisin		
	Pente	R ²	Origine									
Naphthalène	0,283 ^a	0,9875	0,0975	0,247 ^a	0,9653	0,147	0,277 ^a	0,9469	0,125	0,469	0,9436	0,265
Acénaphtylène	0,0538	0,9954	0,0582	0,0961 ^a	0,9923	0	0,108 ^a	0,9959	0	0,110 ^a	0,9902	0,0248
Acénaphène	0,118 ^a	0,9983	0,00639	0,122 ^a	0,9903	0	0,128 ^a	0,9923	0	0,121 ^a	0,9857	0
Fluorène	0,0137 ^a	0,9977	0	0,0157 ^a	0,9906	0	0,0154 ^a	0,9896	0	0,0116 ^a	0,9868	0

6 points de concentrations (0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg/kg) sont analysés en triplicats

^a indique pour chaque composé les pentes qui ne sont pas significativement différentes; méthode HSD (honest significant difference) Tukey : 95%

Pour chaque composé extrait dans les différents fruits, la linéarité de l'étalonnage pour la méthode HS-SPME 2 est vérifiée par le calcul du coefficient de détermination (R²). Les valeurs sont comprises entre 0,9436 pour le naphthalène dans le raisin et 0,9983 pour l'acénaphène dans la pomme (tableau 52). La valeur médiane de R² trouvée pour les 4 HAP légers dans les différents fruits est de 0,990. Cette valeur est cohérente avec celles pouvant être trouvées dans la littérature pour les fruits et légumes. Des R² autour de 0,998 sont, par exemple, indiqués par Soceanu *et al.* pour la tomate (Soceanu, 2012). Dans une étude concernant les HAP dans des aliments végétaux, des R² entre 0,993 et 0,999 sont obtenus (Rey-Salgueiro, 2008b).

La méthode HS-SPME 2 est adaptée à la quantification des 4 HAP les plus légers entre 0 et 10 µg/kg dans les différentes matrices fruitières étudiées.

Les pentes obtenues pour les différents fruits sont ensuite comparées grâce au test ANOVA. Les résultats de ce test montrent que pour la majorité des HAP, le changement de matrice fruitière n'induit pas globalement de variation significative (95 %) de la pente. Seules les pentes obtenues pour le naphthalène dans le raisin et pour l'acénaphtylène dans la pomme sont significativement différentes des pentes obtenues pour ces composés avec les autres fruits.

Pour les 4 HAP légers, leur contenu dans chacun des fruits étudiés peut être déterminé grâce à l'utilisation des pentes présentées en tableau 52. Néanmoins, la méthode HS-SPME 2 ne semble pas totalement transposable à n'importe quelle matrice fruitière.

La méthode HS-SPME 3 permet, par rapport aux méthodes HS-SPME 1 et HS-SPME 2, d'obtenir une réponse analytique suffisante pour le phénanthrène et l'anthracène pour des teneurs de l'ordre de 4 µg/kg. Elle est appliquée à l'établissement de gammes d'étalonnage entre 0 et 10 µg/kg. De très faibles concentrations en HAP ayant été déterminées pour certains fruits étudiés (section 5.2), des points à 0,2, 0,5 et 1 µg/kg sont ajoutés pour réaliser les

gamme d'étalonnage avec la méthode HS-SPME 3. Les droites obtenues pour les HAP légers sont présentées en figure 69.

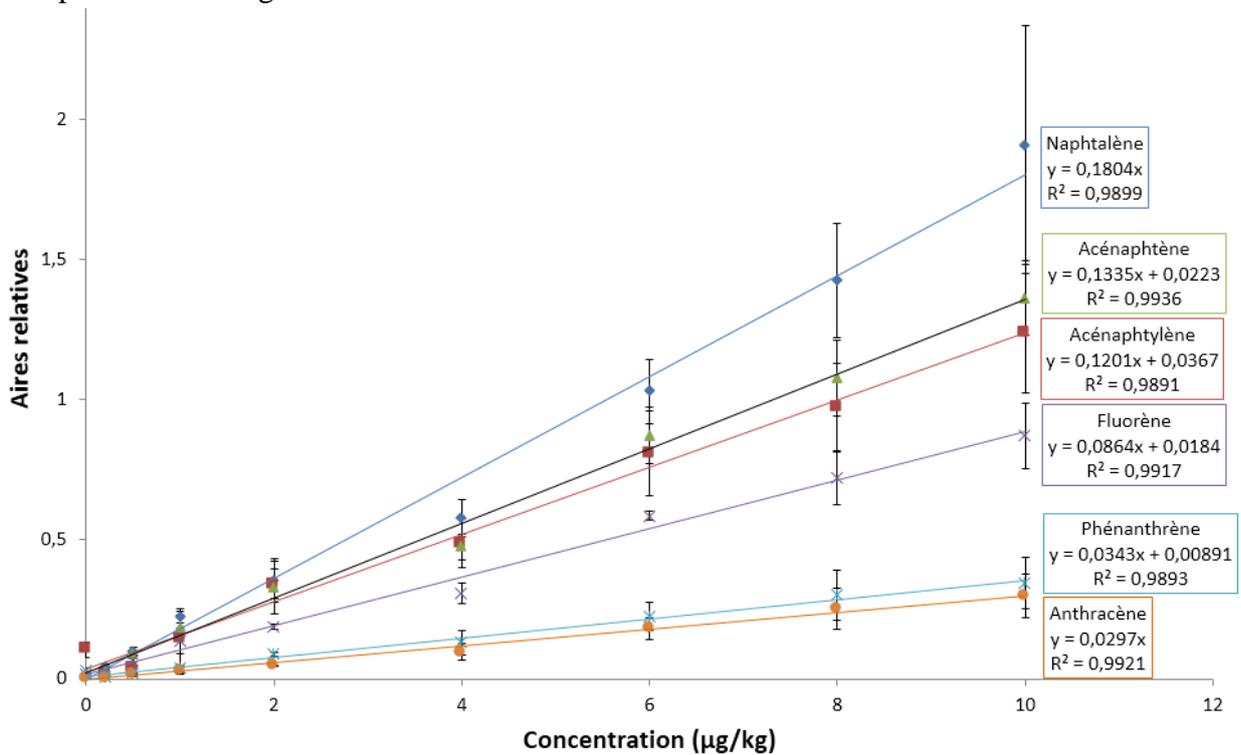


Figure 69 : Droites d'étalonnage réalisées avec la pomme pour les HAP légers entre 0 et 10 µg/kg extraits avec la méthode HS-SPME 3

Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les valeurs relatives des 3 étalonnages réalisés

Les coefficients de détermination (R^2) des droites obtenues pour les HAP légers dans la pomme avec la méthode HS-SPME 3 sont compris entre 0,9891 et 0,9936.

Les données de linéarité de la figure 69 sont reprises dans les deux premières colonnes du tableau 53. Les pentes des droites d'étalonnage établies pour les HAP légers avec 9 niveaux d'ajouts entre 0 et 10 µg/kg seront utilisées pour déterminer les quantités en naphtalène dans les pommes récoltées en Normandie ainsi que dans les pommes exposées aux fumées de combustion de biomasse (section 5.2.5 page 259).

Le tableau 53 présente également les pentes et les R^2 pour des droites d'étalonnage avec 6 points de concentrations entre 0 et 10 µg/kg pour les HAP légers afin de permettre la comparaison avec les précédents résultats des méthodes HS-SPME 2.

Tableau 53 : Données de linéarité obtenues pour des ajouts en HAP entre 0 et 10 µg/kg dans la pomme avec les méthodes HS-SPME 2 et HS-SPME 3

	Données de linéarité entre 0 et 10 µg/kg					
	<u>Méthode HS-SPME 3</u>				<u>Méthode HS-SPME 2</u>	
	9 points de gamme ^a		6 points de gamme ^b		6 points de gamme ^b	
	R ²	pente	R ²	pente	R ²	pente
Naphtalène	0,9899	0,180	0,9859	0,180	0,9875	0,283
Acénaphthylène	0,9891	0,120	0,9935	0,113	0,9954	0,0538
Acénaphthène	0,9936	0,133	0,9910	0,134	0,9983	0,118
Fluorène	0,9917	0,0864	0,9898	0,0877	0,9977	0,0137
Phénanthrène	0,9893	0,0343	0,9884	0,0327		
Anthracène	0,9921	0,0297	0,9884	0,0297		

^a gamme réalisée sur 9 points en triplicat : 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, et 10 µg/kg

^b gamme réalisée sur 6 points en triplicat : 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg/kg

en gris foncé les résultats pour les HAP légers avec la méthode HS-SPME 2 déjà présentés section 5.1.2.3.4

La comparaison des données de linéarité avec les 6 et les 9 points de gamme pour la méthode HS-SPME 3 (tableau 53) montre tout d'abord le bon alignement des points en bas de gamme (0,2 à 1 µg/kg) avec le reste des points. Les pentes et les R² ne sont que très peu modifiés par l'ajout des points réalisés à de faibles concentrations.

Les R² obtenus avec la méthode HS-SPME 3 avec les 6 points de gamme sont compris entre 0,9859 pour le naphtalène et 0,9935 pour l'acénaphthylène (tableau 53). Ces valeurs sont globalement similaires à celles trouvées pour la méthode HS-SPME 2 avec laquelle les R² varient entre 0,9875 et 0,9977. Les données obtenues avec la méthode HS-SPME 3 sont donc également cohérentes avec les valeurs de la littérature (Rey-Salgueiro, 2008b ; Soceanu, 2012).

En ce qui concerne les pentes, la méthode HS-SPME 3 permet d'obtenir des valeurs supérieures à celles observées pour la méthode HS-SPME 2 excepté pour le naphtalène (tableau 53). Le revêtement CAR/PDMS d'épaisseur 75 µm permet donc une meilleure adsorption du naphtalène et le support PDMS d'épaisseur 100 µm est plus favorable à la récupération des HAP légers de masse moléculaire comprise entre 152 et 178 g/mol.

5.1.2.3.5. Détermination des limites de détection et de quantification des HAP légers par HS-SPME pour différentes matrices fruitières

Limites de détection et de quantification pour différentes matrices fruitières

Les limites de détection et de quantification de la méthode HS-SPME 2 sont déterminées pour 4 fruits distincts : la pomme, la poire, la prune et le raisin (tableau 54).

Tableau 54 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour les HAP légers avec la méthode HS-SPME 2 dans différentes matrices fruitières en µg/kg de masse fraîche

Composés	Pomme		Poire		Prune		Raisin	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
	(µg/kg)		(µg/kg)		(µg/kg)		(µg/kg)	
Naphthalène	0,004	0,013	0,001	0,005	0,001	0,004	0,009	0,032
Acénaphthylène	0,015	0,052	0,004	0,014	0,005	0,018	0,049	0,164
Acénaphthène	0,008	0,027	0,003	0,009	0,004	0,013	0,051	0,171
Fluorène	0,067	0,222	0,028	0,093	0,041	0,137	0,543	1,809

Les LOD sont faibles avec des valeurs comprises entre 0,001 µg/kg w.w. pour le naphthalène dans la poire et la prune et 0,543 µg/kg w.w. pour le fluorène dans le raisin (tableau 54). Pour les LOQ les valeurs varient de 0,004 µg/kg w.w. à 1,809 µg/kg w.w..

La comparaison des pentes obtenues avec la méthode HS-SPME 2 pour les différents fruits a montré que les valeurs sont généralement identiques pour un HAP donné. Or, les LOD et LOQ sont différentes selon la matrice fruitière extraite et sont plus élevées dans le raisin, puis la pomme, la prune et la poire. L'extraction par HS-SPME au moyen de la fibre CAR/PDMS 75 µm est dépendante de la matrice pour de très faibles quantités de HAP étudiées. Il semble qu'une co-extraction plus importante de composés de la matrice ait lieu avec le raisin.

Limites de détection et de quantification pour la pomme

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) des HAP légers sont déterminées au moyen des 2 méthodes HS-SPME 2 et HS-SPME 3 pour la pomme (tableau 55).

Tableau 55 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) déterminées pour les HAP légers dans la pomme

	<u>Méthode HS-SPME 2</u>		<u>Méthode HS-SPME 3</u>	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
	(µg/kg)		(µg/kg)	
Naphtalène	0,004	0,013	0,002	0,008
Acénaphthylène	0,015	0,052	0,007	0,023
Acénaphthène	0,008	0,027	0,006	0,019
Fluorène	0,067	0,222	0,008	0,026
Phénanthrène	nd	nd	0,028	0,095
Anthracène	nd	nd	0,034	0,112

nd : non déterminées

Pour la méthode HS-SPME 2 les LOD varient entre 0,004 µg/kg w.w. pour le naphthalène et 0,067 µg/kg w.w. pour le fluorène. Les LOQ sont quant à elles comprises entre 0,013 et 0,222

$\mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. (tableau 55). Les limites pour le phénanthrène et l'anthracène n'ont pas été déterminées car elles sont supérieures à $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ au moyen de cette méthode (teneur testée pour les essais de fidélité).

En ce qui concerne la méthode HS-SPME 3, les LOD varient entre $0,002 \mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. pour le naphthalène et $0,034 \mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. pour l'anthracène. Pour les LOQ, les valeurs sont comprises entre $0,008$ et $0,112 \mu\text{g}/\text{kg}$ w.w. (tableau 54). Les LOD et LOQ trouvées pour le phénanthrène et l'anthracène avec la méthode HS-SPME 3 sont faibles mais sont 3 à 17 fois supérieures à celles trouvées pour les autres HAP légers.

Les LOD et LOQ obtenues avec la méthode HS-SPME 2 pour les HAP légers de masse moléculaire comprise entre 128 et $166 \text{ g}/\text{mol}$ sont jusqu'à 8 fois supérieures à celles observées avec la méthode HS-SPME 3. La méthode HS-SPME 3 s'avère donc être beaucoup plus sensible que la méthode HS-SPME 2 pour la détection des HAP légers dans les échantillons de pommes. Pour les deux méthodes les LOD sont cohérentes avec celles observées pour les HAP extraits par HS-SPME dans les radis avec des valeurs comprises entre $0,11$ et $2,32 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Lei, 2011).

Les limites des méthodes HS-SPME 2 et 3 sont faibles et adaptées à la détermination de HAP en très faibles concentrations dans les pommes.

5.1.2.4. Conclusion sur les méthodes HS-SPME et UAE/SPE

Parmi les techniques permettant l'extraction des HAP légers à partir des échantillons de pomme, la méthode HS-SPME 3 présente les meilleures performances. La méthode UAE/SPE 2 se révèle quant à elle être la plus adaptée à la récupération des HAP lourds.

La stratégie combinant la procédure HS-SPME 3 et UAE/SPE 2 permet une détermination sensible et répétable du contenu en HAP dans la pomme (tableau 56).

Tableau 56 : Stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE : meilleures performances pour la détermination des HAP dans la pomme

	pende	R ²	Répétabilité (n=3) (CV %)	Fidélité intermédiaire (n=9)	LOD	LOQ
					(µg/kg)	
HAP légers (méthode HS-SPME 3)						
Naphtalène	0,180	0,9899	2%	7%	0,002	0,008
Acénaphthylène	0,120	0,9891	3%	10%	0,007	0,023
Acénaphène	0,133	0,9936	9%	10%	0,006	0,019
Fluorène	0,0864	0,9917	9%	15%	0,008	0,026
Phénanthrène	0,0343	0,9893	16%	35%	0,028	0,095
Anthracène	0,0297	0,9921	16%	34%	0,034	0,112
HAP lourds (méthode UAE/SPE 2)						
Fluoranthène	0,0621	0,9834	19 %	19 %	0,089	0,297
Pyrène	0,0848	0,9839	4 %	9 %	0,080	0,268
Benzo(a)anthracène	0,113	0,9928	1 %	3 %	0,128	0,428
Chrysène	0,124	0,9947	7 %	8 %	0,100	0,333
Benzo(b)fluoranthène	0,166	0,9451	10 %	8 %	0,160	0,533
Benzo(a)pyrène	0,211	0,9970	6 %	12 %	0,172	0,572
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	0,258	0,9804	2 %	25 %	0,135	0,449
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	0,224	0,9693	9 %	23 %	0,125	0,418
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	0,235	0,9802	2 %	22 %	0,113	0,378

5.1.3. Validation d'une méthodologie de dosage rapide des HAP dans les pommes par UAE/MEPS

L'utilisation d'une stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE comporte de nombreuses étapes pour la détermination des HAP à l'état de traces dans les matrices fruitières. Une nouvelle méthodologie plus rapide et permettant la suppression des procédures d'évaporation ainsi que la réduction des quantités de solvant utilisées est recherchée. L'étape d'extraction assistée par les ultrasons (UAE) est conservée car elle favorise le transfert des analytes « semi-volatils » d'un échantillon solide vers un milieu liquide. L'extraction par solvant étant peu sélective et les concentrations en composés d'intérêt recherchées étant faibles, une étape de purification des extraits est nécessaire. Concernant l'étape de purification, le choix des méthodologies appliquées aux HAP dans les fruits est relativement restreint et souvent limité à la SPE ou la chromatographie d'exclusion. La recherche est donc étendue à d'autres matrices et le choix s'est finalement porté sur l'utilisation de la micro-extraction par solide compacté (MEPS).

Les HAP étant des composés hydrophobes, leur extraction en MEPS nécessite qu'ils soient contenus dans une matrice polaire (Silva, 2014). La méthodologie d'extraction assistée par les ultrasons est donc menée avec l'éthanol comme solvant pour l'extraction des HAP à partir des échantillons de pomme. La procédure MEPS est assimilable à une chromatographie de partage et se substitue à la fois à l'étape de purification et à l'étape de concentration de l'extrait avant analyse. La concentration de l'extrait à travers plusieurs passages sur le support de rétention choisi permet également l'élimination d'éléments indésirables de la matrice n'ayant pas d'affinité pour le support. La capacité de rétention du support peut s'avérer être un facteur limitant, en raison de la faible quantité de solide compacté présent dans la seringue d'extraction. Néanmoins, les faibles teneurs en HAP présentes dans les fruits ne devraient pas entraîner la saturation du support. Cette technique s'est, de plus, montrée efficace pour l'extraction de composés volatils dans des matrices alimentaires aqueuses (Haider, 2014) et pour l'extraction spécifique de HAP dans différentes eaux (El-Beqqali, 2006 ; Fu, 2012 ; Quinto, 2012). Dans un premier temps, l'optimisation de la procédure MEPS (partie 5.1.3.1) sera présentée et discutée. La validité de la méthode sera vérifiée et ses performances seront comparées à celles de la stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE (partie 5.1.3.2).

5.1.3.1. Optimisation de la procédure d'extraction des HAP par MEPS dans la pomme

L'optimisation de la procédure consiste à déterminer les paramètres permettant l'extraction la plus efficiente des HAP en MEPS après extraction UAE des échantillons de pomme. Deux supports de rétention en MEPS ainsi que différents volumes de prélèvement sont testés.

5.1.3.1.1. Sélection du support d'extraction MEPS

De nombreux supports de MEPS sont actuellement disponibles. On retrouve parmi ces supports des « phase inverses » à base de silice (C2, C8, C18), des échangeurs de cations (SCX), HILIC, carbonés, des polymères à empreinte moléculaire (MIP) et des copolymères de type polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) (Abdel-Rehim, 2011). Pour la sélection des supports testés, le choix s'est porté (i) sur un support de phase inverse de type C18 susceptible

de retenir par partage les composés les plus hydrophobes et (ii) sur un support de type PEP (polar enhanced polymer) correspondant à un copolymère PS-DVB possédant des groupements fonctionnels urée pouvant potentiellement retenir fortement par interaction π - π les noyaux aromatiques des HAP. Un même extrait est utilisé pour tester ces 2 supports. Cet extrait est issu de l'extraction par ultrasons de 20 g de pomme broyée additionnés d'une solution de HAP à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 5 fois 150 μL de l'extrait sont aspirés puis évacués de chacun des deux supports, les HAP retenus sont ensuite élués avec 75 μL de dichlorométhane. 1 μL de l'éluat est ensuite injecté pour l'analyse en GC-MS. Les aires brutes après analyse par GC-MS en mode SIM sont présentées en tableau 57.

Tableau 57 : Comparaison des supports MEPS C18 et PEP pour la récupération des HAP dans la pomme

	Aires brutes	
	Support C18	Support PEP
HAP légers		
Acénaphylène	333	2595
Acénaphène	271	1674
Fluorène	nq	1999
Phénanthrène	581	3955
Anthracène	272	2668
HAP lourds		
Fluoranthène	830	3813
Pyrène	691	3478
Benzo(<i>a</i>)anthracène	752	2836
Chrysène	646	2667
Benzo(<i>a</i>)anthracène-d12	704	2730
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	1029	3131
Benzo(<i>a</i>)pyrène	1369	3108
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	1502	2852
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	1221	2669
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	1237	2723

nq : non quantifiable en raison de la présence d'un pic interférent

valeurs en aires brutes obtenues après extraction par UAE (15 min, 30°C) de 20 g de broyat de pomme pollués à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (100 μL solution HAP/BTEX 2) additionnés de 100 μL de solution étalon interne 3 (sans acénaphène-d10) et de 25 mL d'éthanol. 5x150 μL d'extrait sont aspirés puis évacués avec une seringue MEPS contenant un sorbant C18 ou PEP, l'éluat est réalisée avec 75 μL de dichlorométhane.

Le naphthalène n'est pas recherché

Les deux supports sélectionnés comme sorbants pour la MEPS permettent la rétention des composés apolaires hydrophobes que sont les HAP. La comparaison des analyses de l'extrait UAE d'une pomme polluée à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ purifié par MEPS avec les deux supports montre que le sorbant PEP permet d'obtenir des aires brutes plus importantes qu'avec le sorbant C18 (tableau 26). Pour les HAP les plus lourds (MM \geq 228 g/mol) les aires brutes obtenues avec le support PEP sont 2 à 4 fois supérieures à celles observées avec le support C18. Ce facteur de différence est d'environ 5 pour le fluoranthène et le pyrène (MM = 202 g/mol). Pour les HAP

légers (MM entre 152 et 178 g/mol) le support PEP permet d'obtenir des aires brutes 6 à presque 10 plus élevées qu'avec le support C18.

La différence entre ces deux supports peut être expliquée par la capacité variable des HAP à y être retenu. Les composés les plus lourds sont plus hydrophobes et plus solubles dans le réseau C18 contrairement aux HAP légers qui se trouvent plus facilement solubilisé dans le solvant d'extraction (éthanol). Les composés légers ont donc tendance à rester en solution et sont donc moins retrouvés au niveau du support C18. A l'inverse, le support PS-DVB (PEP) met en jeu des interactions π - π qui sont sensiblement identiques pour tous les HAP. L'ensemble des HAP vont donc s'adsorber de façon équivalente sur le support PEP.

Le sorbant PEP apparaît être le plus adapté à la récupération de l'ensemble des HAP, il est donc sélectionné pour la purification des extraits de pomme obtenus après UAE.

5.1.3.1.2. Reproductibilité des résultats avec différents supports de type PEP pour l'extraction en MEPS

Les supports de type « PEP » pour la MEPS sont assez récents et relativement peu répandus au niveau de leurs applications. Il est aussi généralement admis que chaque support possède une durée de vie de l'ordre de 200 essais (passages). Par conséquent, la reproductibilité d'un lot de 3 supports PEP est testée, le but étant de vérifier que la méthodologie envisagée peut être appliquée sur le long terme. Les tests utilisent un même extrait UAE provenant d'un broyat de pomme additionné en HAP à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La comparaison des résultats obtenus après purification avec les 3 supports PEP permet de déterminer si les modèles testés possèdent les mêmes capacités de rétention et si des résultats similaires peuvent être obtenus (tableau 58).

Tableau 58 : Comparaison des résultats obtenus en MEPS avec 3 supports PEP

	Aires relatives avec les supports			CV %
	PEP 1	PEP 2	PEP 3	
Acénaphthylène	1,74	1,81	1,77	2 %
Acénaphthène	1,14	1,26	1,21	5 %
Fluorène	1,41	1,53	1,42	5 %
Phénanthrène	2,20	2,45	2,12	8 %
Anthracène	2,10	1,95	1,76	9 %
Fluoranthène	1,21	1,58	1,57	15 %
Pyrène	1,33	1,68	1,75	14 %
Benzo(<i>a</i>)anthracène	1,17	1,16	1,22	3 %
Chrysène	1,04	1,09	1,13	4 %
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	1,18	1,13	1,19	3 %
Benzo(<i>a</i>)pyrène	1,10	0,87	1,07	12 %
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	1,16	0,63	0,80	31 %
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	0,93	0,55	0,67	27 %
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	1,00	0,64	0,71	24 %

CV : coefficient de variation calculé en rapportant l'écart type de la série de données pour un composé à la moyenne
 Valeurs en aires relatives obtenues après extraction par UAE (15 min, 30°C) de 20 g de broyat de pomme pollués à 10 µg/kg (100 µL [solution HAP/BTEX 2](#)) additionnés de 100 µL de [solution étalon interne 3](#) et de 25 mL d'éthanol. L'extrait est centrifugé (10 min, température ambiante) et le broyat est éliminé par filtration. 6x200 µL d'extrait sont aspirés puis évacués avec un lot de 3 seringues MEPS contenant un sorbant PEP, l'élution est réalisée avec 50 µL de dichlorométhane. Une détermination est réalisée pour chaque support

Les aires relatives obtenues avec les trois supports PEP présentent de faibles écarts pour la majorité des HAP étudiés. Des variations pouvant excéder 20 % sont observés pour les HAP les plus lourds tels que l'indéno(1,2,3-*cd*)pyrène, le dibenzo(*ah*)anthracène et le benzo(*ghi*)perylène. Les écarts observés pour les 3 supports PEP sont globalement faibles si on prend en compte que ces aires relatives ne correspondent qu'à un seul essai par support. Il semble donc que le changement de modèle PEP permette de reproduire les résultats.

5.1.3.1.3. Détermination du volume d'extrait à prélever pour l'extraction en MEPS

En MEPS, le volume d'échantillon à extraire peut être prélevé selon le volume de la seringue en une ou plusieurs fois (Abdel-Rehim, 2010). La procédure peut être automatisée ce qui permet de renouveler le prélèvement un grand nombre de fois. 60 ou 40 aspiration de 50 µL d'un même échantillon sont par exemple utilisés pour extraire les HAP de l'eau (El-Beqqali, 2006 ; Fu, 2012). L'eau est une matrice d'extraction simple et la MEPS utilise un support sélectif ce qui minimise les risques de rétention de composés issus de la matrice. Dans des matrices plus complexes telles que les boues d'épuration ou le raisin, 250 µL et 100 µL sont respectivement prélevés en une seule fois (puis rejetés et ré-aspirés 10 fois) (Martínez-Moral, 2014 ; Mercolini, 2012).

L'extraction comprenant de multiples cycles de prélèvement peut s'effectuer à partir d'un même aliquot (plusieurs purifications en aspirant et rejetant un volume défini d'échantillon dans un même flacon) ou en aspirant plusieurs aliquots d'échantillon (chaque aliquot est prélevé une fois puis éliminé) (Abdel-Rehim, 2010). La procédure d'extraction est à optimiser en fonction de chaque application. De faibles quantités en HAP sont attendues après purification en MEPS des extraits UAE des échantillons de pomme. Or l'utilisation d'un volume important d'échantillon passant à travers le support MEPS et l'éluion avec une faible quantité de solvant permet d'augmenter la concentration de l'extrait en composés d'intérêt (Silva, 2014). En conséquence, plusieurs aliquots de l'extrait UAE sont aspirés afin de récupérer une quantité importante de HAP qui sont ensuite solubilisés dans un faible volume d'éluant. Le volume total à prélever est déterminé par une étude de l'évolution de l'aire relative des pics obtenus en GC-MS en fonction du volume d'extrait purifié en MEPS.

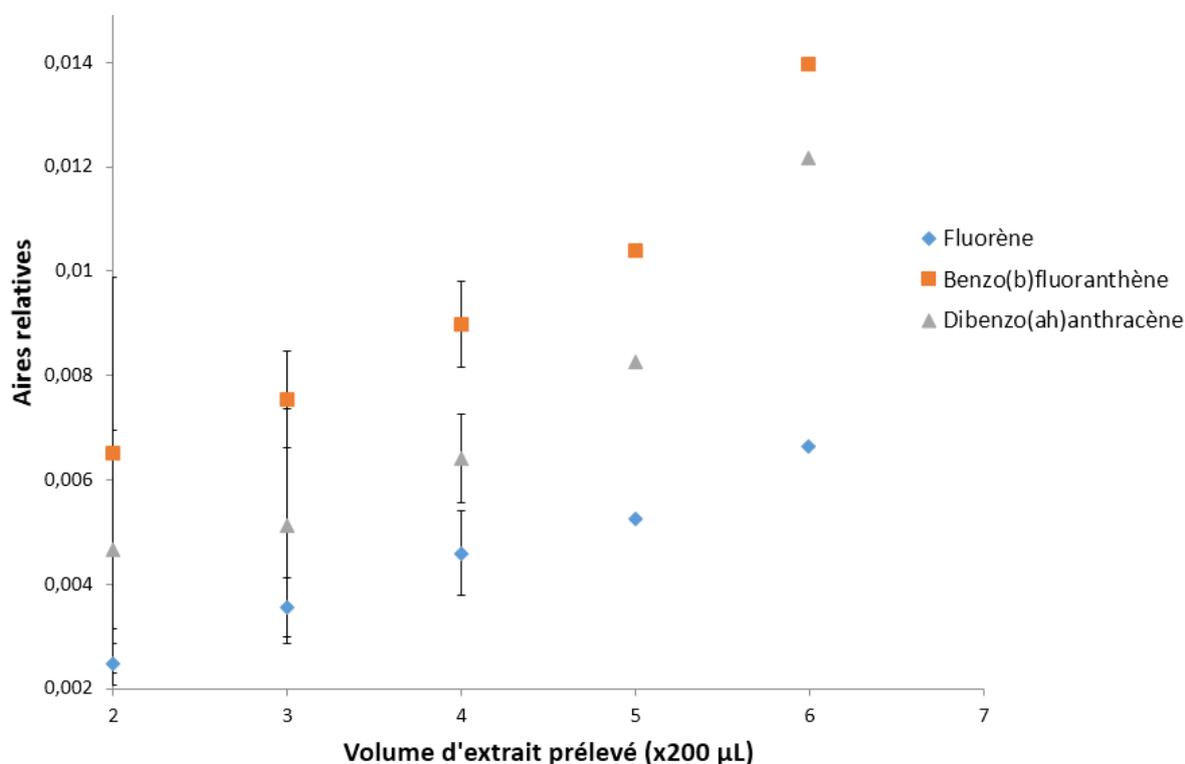


Figure 70 : Evolution de l'aire relative des pics de quelques HAP en fonction du volume d'extrait prélevé en MEPS
Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les valeurs des 2 essais réalisés
Pour 5x200 µL et 6x200 µL l'écart type n'est pas présenté car l'un des essais, jugé aberrant, n'a pas été pris en compte

La figure 70 représente l'évolution des aires relatives détectées en fonction du volume prélevé en MEPS pour quelques HAP. Une certaine variabilité expérimentale peut être observée ; elle s'explique notamment par l'ajout d'un micro-volume de la solution d'étalon interne (10 μL) qui ne peut se faire pour ce type de test qu'à la suite de l'élution avec le solvant (dichlorométhane). Globalement, une augmentation progressive de l'aire relative est corrélée au volume d'extrait aspiré en MEPS. Des résultats similaires sont obtenus pour l'ensemble des HAP. La saturation du sorbant PEP ne semble pas atteinte pour un prélèvement de 6 x 200 μL . Néanmoins, le prélèvement est limité à ce volume (6 x 200 μL) afin de conserver un temps relativement court pour réaliser l'ensemble de la procédure d'extraction.

5.1.3.1.4. Détermination des conditions d'élution optimales pour l'extraction en MEPS

Les HAP retenus par le support MEPS sont récupérés par élution. Le solvant d'élution doit être un solvant organique capable d'entraîner, avec un faible volume, l'ensemble des analytes retenus par le sorbant (Abdel-Rehim, 2010). La détermination des conditions optimales d'élution consiste à déterminer le solvant et le volume d'élution les plus favorables à la récupération des HAP. Les résultats obtenus après élution des HAP avec l'heptane et le dichlorométhane sont dans un premier temps comparés puis différents volumes d'élution sont ensuite testés.

Choix du solvant d'élution

Le dichlorométhane (DCM) et l'heptane, deux solvants dans lesquels les HAP montrent une très bonne solubilité, sont testés pour la récupération des composés d'intérêt après purification d'un extrait UAE de pomme additionnée en HAP à 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ avec la seringue MEPS PEP. La comparaison des résultats obtenus avec ces différents solvants d'élution permet de retenir celui ayant la meilleure capacité d'élution des HAP (tableau 59).

Tableau 59 : Comparaison des aires brutes obtenues en MEPS après élution avec l'heptane et le dichlorométhane

Aires brutes après élution en MEPS		
	Elution heptane	Elution DCM
Acénaphthylène	1539	1922
Acénaphène	1188	1471
Fluorène	1443	1621
Phénanthrène	3919	5130
Anthracène	1608	1933
Fluoranthène	3752	5379
Pyrène	2681	3877
Benzo(a)anthracène	1361	2233
Chrysène	1361	1985
Benzo(a)anthracène-d12	3131	4675
Benzo(b)fluoranthène	1298	nq
Benzo(a)pyrène	911	2441
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	969	2401
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	737	1845
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	1022	1910

nq : non quantifiable en raison de la présence d'un pic interférent

valeurs en aires brutes obtenues après extraction par UAE (15 min, 30°C) de 20 g de broyat de pomme pollués à 4 µg/kg (40 µL solution HAP/BTEX 2 + 60 µL dichlorométhane) additionnés de 100 µL de solution étalon interne 3 et de 25 mL d'éthanol. 5x200 µL d'extrait sont aspirés puis évacués avec une seringue MEPS contenant un sorbant PEP, l'élution est réalisée avec 50 µL de dichlorométhane (DCM) ou d'heptane.

Les aires brutes les plus faibles sont obtenues après élution avec l'heptane, ce solvant apparaît moins efficace pour la récupération des HAP que le dichlorométhane. Pour les HAP légers (jusqu'à 166 g/mol) un faible écart (entre 11 et 20 %) est observé entre les aires brutes après élution par le dichlorométhane ou l'heptane. En ce qui concerne les HAP plus lourds (MM > 166 g/mol) les aires brutes sont significativement améliorées lors de l'élution avec le dichlorométhane par rapport aux résultats observés avec l'heptane. Il semble donc que les HAP soient plus solubles dans le dichlorométhane que dans l'heptane.

Le dichlorométhane est donc le solvant finalement sélectionné pour l'élution et la récupération des HAP en MEPS.

Volume d'élution

Les essais précédents ont permis de sélectionner le dichlorométhane comme solvant d'élution. Les tests visent à présent à déterminer le volume de solvant nécessaire à l'élution et à la récupération optimale des HAP. Deux volumes d'élution faibles au regard du volume d'extrait UAE prélevé (5x200 µL) sont ainsi testés : 50 et 75 µL. Les aires brutes obtenues après analyse en GC-MS d'un extrait UAE de pomme polluée à 2 µg/kg puis purifié en MEPS à travers un support PEP sont présentées dans le tableau 60.

Tableau 60 : Comparaison des aires brutes obtenues avec différents volumes d'élution en MEPS et d'injection en GC/MS

	Aires brutes	
	élution 75 μ L DCM	élution 50 μ L DCM
Acénaphthylène	362	775
Acénaphthène	350	699
Fluorène	355	703
Phénanthrène	1487	3022
Anthracène	390	712
Fluoranthène	1797	3455
Pyrène	1089	1847
Benzo(<i>a</i>)anthracène	1127	815
Chrysène	314	738
Benzo(<i>a</i>)anthracène-d12	1619	3587
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	654	1054
Benzo(<i>a</i>)pyrène	430	721
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	529	934
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	591	633
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	210	979

Valeurs en aires brutes obtenues après extraction par UAE (15 min, 30°C) de 20 g de broyat de pomme pollués à 2 μ g/kg (20 μ L solution HAP/BTEX 2 + 80 μ L dichlorométhane) additionnés de 100 μ L de solution étalon interne 3 et de 25 mL d'éthanol. L'extrait est centrifugé (10 min, température ambiante) et le broyat est éliminé par filtration. 5x200 μ L d'extrait sont aspirés puis évacués avec une seringue MEPS contenant un sorbant PEP, l'élution est réalisée avec 50 ou 75 μ L de dichlorométhane (DCM) puis 1 μ L de l'extrait purifié est injecté en GC-MS.

Les aires brutes sont plus importantes lors de l'élution avec 50 μ L de DCM qu'avec 75 μ L. La diminution du volume d'élution permet donc d'obtenir un extrait purifié plus concentré en analytes d'intérêt.

En conséquence, l'extrait UAE purifié par MEPS est élué avec 50 μ L de DCM puis injecté en GC-MS pour la suite des expérimentations.

5.1.3.1.5. Taux de récupération des HAP par UAE/MEPS et vérification méthodologique

L'efficacité de l'extraction des HAP grâce à la procédure UAE/MEPS est estimée. La capacité de la méthode à récupérer chaque composé d'intérêt est déterminée par le calcul d'un taux de récupération, présenté dans le tableau 61.

Tableau 61 : Estimation du pourcentage de HAP récupéré avec la méthode UAE/MEPS

	Taux de récupération
Acénaphthylène	17 %
Acénaphène	18 %
Fluorène	25 %
Phénanthrène	76 %
Anthracène	31 %
Fluoranthène	75 %
Pyrène	46 %
Benzo(<i>a</i>)anthracène	51 %
Chrysène	43 %
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	48 %
Benzo(<i>a</i>)pyrène	56 %
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	92 %
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	106 %
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	75 %

Le taux de récupération est déterminé par le rapport de la moyenne des 4 analyses d'un échantillon additionné en HAP à 5 µg/kg après extraction en UAE/MEPS à la moyenne des 4 déterminations d'une solution de concentration équivalente analysée par injection directe.

Les taux de récupération déterminés pour les HAP sont compris entre 17 et 106 % (tableau 61). Pour l'acénaphthylène et l'acénaphène, les taux de récupération sont plus faibles (≤ 20 %), néanmoins, les essais menés précédemment ont montrés que la récupération ces composés est reproductible (tableau 58). De plus, le signal détecté est suffisamment important pour être différencié du bruit de fond même aux faibles concentrations recherchées. Les taux de récupération déterminés pour les HAP extraits de la pomme par MEPS sont cohérents avec ceux présentés pour les échantillons d'eau avec des valeurs comprises entre 56 et 85 % (Quinto, 2012).

La méthodologie UAE/MEPS est également vérifiée par la réalisation d'un test sur une pomme artificiellement additionnée de HAP.

Afin d'établir une adéquation entre la quantité réellement présente dans l'échantillon et la quantité de HAP estimée à partir de la pente des droites d'étalonnage, une pomme est artificiellement additionnée de HAP (section 3.7.2, chapitre 3, page 151). Un trou (diamètre environ 1 mm) est percé sur l'un des côtés d'une pomme (60 g) jusqu'au milieu de sa chair. Une quantité équivalente à 2,67 µg de HAP par kg est introduite dans l'orifice formé. L'analyse du côté de la pomme additionné de HAP est comparée à celle du côté non contaminé (tableau 62).

Tableau 62 : Estimation du niveau en HAP dans une pomme contaminée (2,67 µg/kg)

	Pomme côté non pollué	Pomme côté pollué (µg/kg)
HAP légers		
Acénaphthylène	nd	1,98
Acénaphthène	nd	2,74
Fluorène	nd	3,13
Phénanthrène	0,43	3,96
Anthracène	nd	2,77
HAP lourds		
Fluoranthène	nd	3,72
Pyrène	nd	3,57
Benzo(a)anthracène	nd	3,00
Chrysène	nd	2,94
Benzo(b)fluoranthène	nd	3,48
Benzo(a)pyrène	nd	3,03
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	nd	2,84
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	nd	2,76
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	nd	3,40

30 g de broyat de pomme additionné de HAP à 2,67 µg/kg ou non sont placés dans 25 mL d'éthanol et extraits par UAE (15 min, 30°C) puis soumis à une centrifugation (10 min, température ambiante). 6x200 µL d'extrait sont aspirés puis évacués avec une seringue MEPS contenant un sorbant PEP, l'éluion est réalisée avec 50 µL de dichlorométhane.

Estimations réalisées à partir des pentes d'étalonnage indiquées en section 5.1.3.2.2 page 242

Les teneurs retrouvées en HAP sont relativement variables (tableau 62) et sont dues à la difficulté de l'expérimentation ainsi qu'au fait qu'elle ne peut pas être répétée. Cette essai permet néanmoins de vérifier les niveaux de concentrations globalement atteints pour les différents HAP. Pour le côté de la pomme n'ayant pas été contaminé, seul le phénanthrène est retrouvé avec une concentration estimée à environ 0,4 µg/kg. La présence de ce seul HAP dans la partie non contaminée témoigne (i) d'une présence initiale de phénanthrène dans le fruit et (ii) d'une absence de transfert entre la partie contaminée et non contaminée de la pomme. En ce qui concerne le côté additionné en HAP, la teneur moyenne pour chaque composé est de l'ordre de 3 µg/kg. Cette valeur est cohérente à celle initialement introduite (2,67 µg/kg), l'estimation de la quantité en HAP dans la pomme est donc relativement fidèle à la quantité introduite. La méthodologie par UAE/MEPS permet par conséquent d'estimer de façon cohérente les teneurs rencontrées en HAP dans les pommes.

5.1.3.1.6. Test de conservation de l'extrait UAE pour extraction différée en MEPS

Au cours des campagnes de prélèvements d'échantillons, l'analyse des extraits HS-SPME doit être réalisée en priorité par rapport aux extraits UAE/MEPS en raison de la plus importante

volatilité des BTEX (section 4.1.3.2, page 166). Les extraits contenant les HAP sont conservés en attendant la fin des analyses des BTEX dans les échantillons. Le mode de conservation choisi est la réfrigération et les extraits sont réfrigérés après l'étape d'UAE car les HAP se trouvent dans un volume important de solvant (25 mL) ce qui permet de minimiser leur perte par volatilisation. La purification des échantillons en MEPS est réalisée après la période de réfrigération. Afin de s'assurer que la conservation par réfrigération n'a pas d'impact sur les quantités en HAP, un échantillon est analysé directement à la suite de l'extraction puis cette analyse est comparée à celle obtenue après réfrigération. Deux durées de conservation de l'extrait UAE sont testées, un week-end et une semaine, les analyses réalisées après purification des extraits par MEPS sont comparées dans le tableau 63.

Tableau 63 : Résultats (en aires relatives) des essais de conservation des extraits UAE pour extraction différée en MEPS

	Aires relatives			CV (%)
	Sans conservation	conservation 1 week-end	conservation 1 semaine	
Acénaphthylène	0,951	1,034	0,923	6 %
Acénaphthène	0,613	0,673	0,619	5 %
Fluorène	0,732	0,804	0,715	6 %
Phénanthrène	1,449	1,636	1,510	6 %
Anthracène	0,977	1,149	0,990	9 %
Fluoranthène	1,397	1,444	1,598	7 %
Pyrène	1,274	1,548	1,425	10 %
Benzo(<i>a</i>)anthracène	1,039	1,194	1,029	9 %
Chrysène	0,977	1,053	1,029	4 %
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	1,147	2,850	1,379	13 %
Benzo(<i>a</i>)pyrène	1,138	1,189	1,299	7 %
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	1,045	1,225	1,221	9 %
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	0,978	1,197	1,184	11 %
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	0,997	1,149	1,025	8 %

CV : coefficient de variation calculé en rapportant l'écart type de la série de données pour un composé à la moyenne
Valeurs en aires relatives obtenues après extraction par UAE (15 min, 30°C) de 20 g de broyat de pomme pollués à 4 µg/kg (40 µL solution HAP/BTEX 2 + 60 µL de dichlorométhane) additionnés de 100 µL de solution étalon interne 3 (sans acénaphthène-d10) et de 25 mL d'éthanol. L'extrait est centrifugé (10 min, température ambiante) et le broyat est éliminé par filtration. L'extrait est réfrigéré entre 2 et 6 °C et conservé 1 week-end ou une semaine au réfrigérateur. L'extrait à sa sortie est laissé environ 15 minutes à température ambiante puis 5x150 µL d'extrait sont aspirés puis évacués avec une seringue MEPS contenant un sorbant PEP, l'élution est réalisée avec 50 µL de dichlorométhane (DCM)

Les aires relatives obtenues après purification en MEPS d'un extrait UAE de pomme additionnée à 10 µg/kg en HAP et conservé un week-end ou une semaine au réfrigérateur ne présentent que de faibles écarts avec l'analyse de l'échantillon n'ayant pas subi de réfrigération. La conservation de l'extrait UAE pendant une semaine ne semble pas entraîner de perte importante en composés d'intérêt. Les extraits UAE peuvent donc être réfrigérés pendant une semaine pour permettre une détermination prioritaire des BTEX au cours des campagnes d'analyse d'échantillons.

5.1.3.2. Validation du dosage des HAP par UAE/MEPS et comparaison avec la stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE

L'ensemble des essais réalisés ont permis de définir les conditions optimales pour l'extraction en UAE et la purification en MEPS. La procédure étant optimisée, elle est soumise à des tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire (partie 5.1.3.2.1), ainsi qu'à la vérification des linéarités des résultats (partie 5.1.3.2.2) afin d'être validée. La sensibilité de la méthode couplant l'UAE et la MEPS est étudiée au moyen des limites de détection et de quantification (partie 5.1.3.2.3). Les résultats sont présentés et discutés en fonction des critères de validation obtenus au moyen de la stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE.

5.1.3.2.1. Essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire

La première étape de la validation de la méthode UAE/MEPS consiste à réaliser les essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire avec un échantillon de pomme additionné en HAP à 4 µg/kg. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 64.

Tableau 64 : Coefficients de variation (CV %) des essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire pour la détermination des HAP dans la pomme par UAE/MEPS

	<u>Méthode UAE/MEPS</u>			
	Répétabilité (n=3) CV (%)	Fidélité intermédiaire (n=9) CV (%)	Répétabilité (n=3) CV (%)	Fidélité intermédiaire (n=9) CV (%)
HAP légers			<u>Méthode HS-SPME 3</u>	
Acénaphthylène	5%	6%	3%	10%
Acénaphthène	4%	7%	9%	10%
Fluorène	3%	5%	9%	15%
Phénanthrène	6%	6%	16%	35%
Anthracène	6%	8%	16%	34%
HAP lourds			<u>Méthode UAE/SPE 2</u>	
Fluoranthène	1%	10%	19 %	19 %
Pyrène	4%	9%	4 %	9 %
Benzo(<i>a</i>)anthracène	1%	6%	1 %	3 %
Chrysène	2%	6%	7 %	8 %
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	5%	9%	10 %	8 %
Benzo(<i>a</i>)pyrène	3%	10%	6 %	12 %
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	11%	12%	2 %	25 %
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	3%	11%	9 %	23 %
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	5%	12%	2 %	22 %

n : nombre d'échantillons extraits

CV : coefficient de variation

En gris foncé : résultats présentés et discutés précédemment (section 5.1.2.4, page 229)

Les CV obtenus pour les essais de répétabilité avec la méthode UAE/MEPS sont compris entre 1 % pour le fluoranthène et le benzo(*a*)anthracène et 11 % pour l'indéno(1,2,3-

cd)pyrène. En ce qui concerne les essais de fidélité intermédiaire, les CV varient de 5 à 12 % (tableau 64).

Pour les HAP légers, les coefficients de variations sont plus faibles avec la méthode UAE/MEPS qu'avec la méthode HS-SPME 3, en particulier pour la fidélité intermédiaire. Pour les méthodes UAE/MEPS et UAE/SPE 2 les CV sont globalement similaires. Néanmoins, pour la fidélité intermédiaire les valeurs pour les HAP les plus lourds (MM entre 276 et 278 g/mol) n'excèdent pas 12 % avec la méthode UAE/MEPS alors que des valeurs entre 22 et 25 % sont observés avec la méthode UAE/SPE 2 (tableau 64)

A notre connaissance, pour la détermination des HAP, la MEPS n'a été appliquée que pour des échantillons d'eau (El-Beqqali, 2006 ; Fu, 2012 ; Quinto, 2012). Les CV obtenus en MEPS pour la répétabilité (n=5) dans des échantillons d'eau provenant de l'environnement additionnés de HAP à 1,5 µg/L sont compris entre 6 et 14 % (Fu, 2012). Concernant les essais de fidélité inter-journalière, les CV atteignent jusqu'à 16 % avec 18 déterminations (El-Beqqali, 2006).

Les variations observées pour la détermination des HAP avec la méthode UAE/MEPS dans la pomme sont cohérentes avec les données de la littérature pour la MEPS appliquée à la recherche de HAP dans l'eau.

5.1.3.2.2. Réalisation de l'étalonnage pour le dosage de HAP dans la pomme par UAE/MEPS

La méthode UAE/MEPS est ensuite appliquée pour l'établissement de gammes d'étalonnage entre 0 et 10 µg/kg. Au vue des faibles concentrations retrouvées dans les fruits (section 5.2), des points à 0,2, 0,5 et 1 µg/kg ont été ajoutés pour réaliser la gamme d'étalonnage avec la méthode UAE/MEPS. Les droites obtenues pour le pyrène, le benzo(*b*)fluoranthène, le chrysène et le benzo(*ghi*)perylène sont présentées en figure 71.

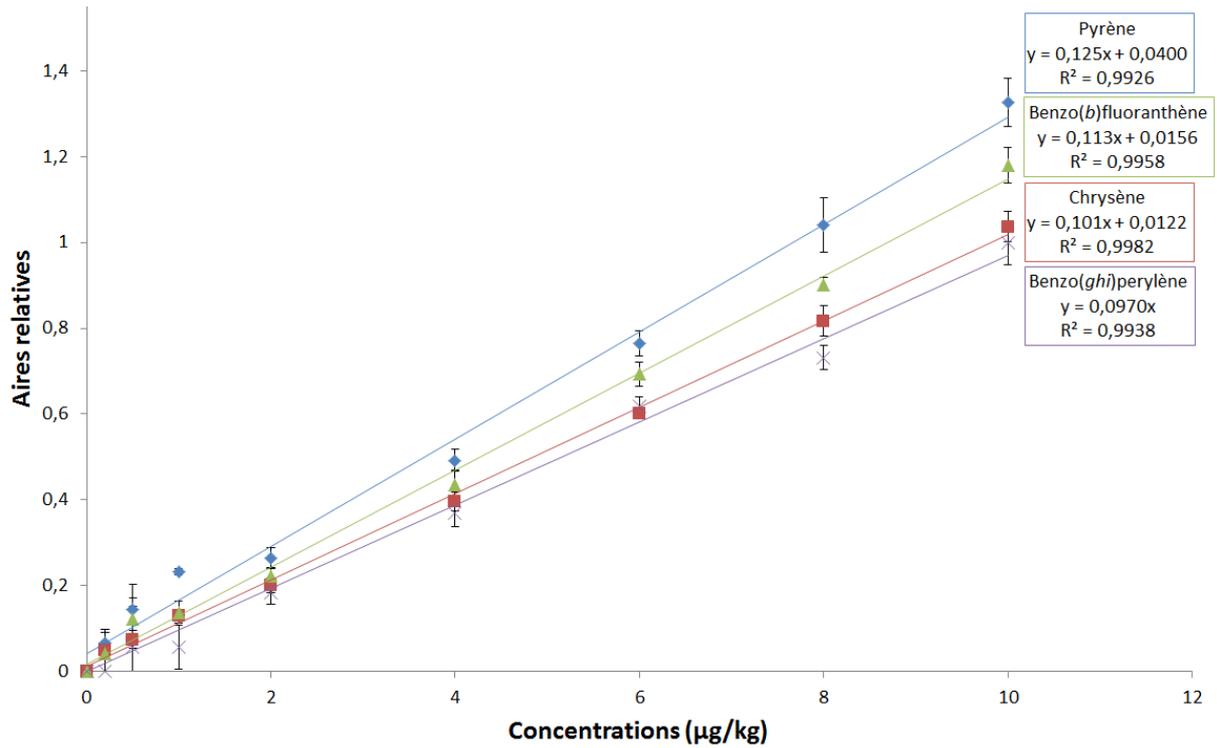


Figure 71 : Droites d'étalonnage pour le pyrène, le benzo(b)fluoranthène, le chrysène et le benzo(ghi)perylène réalisée dans la pomme additionnée en HAP entre 0 et 10 µg/kg avec la méthode UAE/MEPS

Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les valeurs des 3 étalonnages réalisés

Les R² sont compris entre 0,986 et 0,998, comme indiqué dans le tableau 65 qui regroupe les résultats de linéarité avec les pentes et les coefficients de détermination (R²) des régressions linéaires pour l'ensemble des HAP.

Tableau 65 : Données de linéarité en UAE/MEPS pour des ajouts en HAP entre 0 et 10 µg/kg dans la pomme et comparaison avec les performances de la méthode combinant la HS-SPME et l'UAE/SPE

Méthode UAE/MEPS		
	Pente	R ²
HAP légers		Méthode HS-SPME 3
Acénaphthylène	0,176	0,9928
Acénaphthène	0,110	0,9863
Fluorène	0,140	0,9921
Phénanthrène	0,203	0,9874
Anthracène	0,208	0,9950
HAP lourds		Méthode UAE/SPE 2*
Fluoranthène	0,112	0,9884
Pyrène	0,125	0,9926
Benzo(<i>a</i>)anthracène	0,113	0,9970
Chrysène	0,101	0,9982
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	0,113	0,9958
Benzo(<i>a</i>)pyrène	0,107	0,9979
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	0,109	0,9867
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	0,0903	0,9934
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	0,0970	0,9938

* Les essais de linéarité avec la méthode UAE/SPE 2 utilisent 6 points de concentrations : 0, 2, 4, 6, 8, 10 µg/kg
En gris foncé : résultats présentés et discutés précédemment (section 5.1.2.4 page 229)

Les R² obtenus pour les HAP entre 0 et 10 µg/kg extraits par UAE/MEPS sont compris entre 0,9863 pour l'acénaphthène et 0,9982 pour le chrysène.

Pour les HAP légers, les R² obtenus par UAE/MEPS sont similaires à ceux trouvés avec la méthode HS-SPME 3. En ce qui concerne les HAP lourds, les R² se trouvent améliorés avec la méthode UAE/MEPS par rapport à la méthode UAE/SPE 2. Les R² pour les HAP lourds avec la méthode UAE/MEPS sont supérieurs à 0,9867 alors que seuls le benzo(*a*)anthracène et le chrysène ont des R² dépassant cette valeur avec la méthode UAE/SPE 2.

Les gammes de calibration réalisées avec une méthode MEPS pour l'extraction des HAP entre 0,01 et 1 µg/kg dans des échantillons d'eau permettent d'obtenir des coefficients de corrélation R compris entre 0,9963 pour l'indéno(1,2,3-*cd*)pyrène et 0,9993 pour le phénanthrène soit des R² variant entre 0,9926 et 0,9986 (Quinto, 2012). Des valeurs de R² supérieures à 0,996 sont également retrouvés pour les HAP extraits par MEPS dans des échantillons d'eau (El-Beqqali, 2006 ; Fu, 2012).

Les performances de linéarité obtenues avec la méthode UAE/MEPS avec la pomme sont cohérentes avec celles observées dans la littérature. L'extraction des HAP par UAE/MEPS à partir d'échantillons de pomme permet d'obtenir des résultats linéaires pour des teneurs entre 0 et 10 µg/kg.

5.1.3.2.3. Détermination des limites de détection et de quantification pour le dosage des HAP dans la pomme par UAE/MEPS

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont ensuite déterminées pour l'ensemble des HAP extraits en UAE/MEPS. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 66.

Tableau 66 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour les HAP dans la pomme en UAE/MEPS

	<u>Méthode UAE/MEPS</u>			
	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
HAP légers			<u>Méthode HS-SPME 3</u>	
Acénaphthylène	0,036	0,120	0,007	0,023
Acénaphène	0,048	0,160	0,006	0,019
Fluorène	0,044	0,147	0,008	0,026
Phénanthrène	0,044	0,146	0,028	0,095
Anthracène	0,045	0,149	0,034	0,112
HAP lourds			<u>Méthode UAE/SPE 2</u>	
Fluoranthène	0,041	0,135	0,089	0,297
Pyrène	0,038	0,128	0,080	0,268
Benzo(a)anthracène	0,059	0,195	0,128	0,428
Chrysène	0,062	0,206	0,100	0,333
Benzo(b)fluoranthène	0,073	0,242	0,160	0,533
Benzo(a)pyrène	0,087	0,291	0,172	0,572
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	0,130	0,433	0,135	0,449
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	0,125	0,418	0,125	0,418
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	0,124	0,414	0,113	0,378

En gris foncé : résultats présentés et discutés précédemment (section 5.1.2.4 page 229)

Les LOD pour la méthode UAE/MEPS sont comprises entre 0,036 µg/kg w.w. pour l'acénaphthylène et 0,130 µg/kg w.w. pour l'indéno(1,2,3-*cd*)pyrène. Les LOQ pour les HAP varient de 0,120 à 0,433 µg/kg w.w. (tableau 66). Les valeurs sont plus élevées pour les composés les plus lourds (MM ≥ 276 g/mol) avec des LOD autour de 0,1 µg/kg et de 0,4 µg/kg pour les LOQ ; la détection pour chaque HAP étant similaires pour un même ajout en HAP, les différences entre les limites de détection et quantification sont essentiellement dues à un bruit de fond chromatographique plus élevé en fin d'analyse. Les LOD et LOQ obtenus après UAE/MEPS sont faibles et cohérentes avec la recherche de HAP de l'ordre de quelques µg/kg. Néanmoins, la méthode HS-SPME 3 permet la détection de plus faibles niveaux (inférieurs à 0,03 µg/kg) de HAP légers que la méthode UAE/MEPS (tableau 66). En ce qui concerne les HAP lourds, les LOD et LOQ obtenus pour la méthode UAE/MEPS sont environ 2 fois plus faibles que celles obtenues avec la méthode UAE/SPE 2, excepté pour les composés les plus lourds (MM entre 276 et 278 g/mol) pour lesquels les deux méthodes donnent des résultats identiques.

La méthode MEPS appliquée aux HAP dans l'eau permet d'obtenir des LOD très faibles, puisque inférieurs à 0,008 µg/L (Fu, 2012). L'eau est une matrice simple pour laquelle il n'existe généralement que très peu d'interférents organiques lors de l'analyse. La comparaison des limites obtenues avec la pomme a donc été étendue à d'autres composés extraits par MEPS à partir de matrices solides. Lors de l'extraction par MEPS de mélatonine et d'antioxydants dans des échantillons de raisin et de ses produits dérivés, les LOD atteignent jusqu'à 10 µg/kg (Mercolini, 2012). Néanmoins, l'analyse réalisée par HPLC-FLD, qui est moins sensible que la GC-MS, peut expliquer ces valeurs assez élevées. Après extraction de chlorophénols dans le sol par une méthode QuEChERS associée à la MEPS puis à une détection en GC-MS, les LOD obtenues sont comprises entre 0,118 et 0,894 µg/kg (Paredes, 2014).

Les limites obtenues pour les HAP extraits des pommes par UAE/MEPS sont donc assez cohérentes avec celles pouvant être trouvées dans la littérature pour la MEPS appliquée à des échantillons solides.

5.1.3.2.4. Comparaison de la méthodologie UAE/MEPS avec la stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE

L'utilisation d'une stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE pour la détermination des HAP à l'état de traces dans les matrices fruitières comporte de nombreuses étapes. La procédure UAE associée à la MEPS est une alternative beaucoup plus rapide puisque la MEPS se substitue à la fois à l'étape de purification et à l'étape de concentration de l'extrait avant analyse. Cette méthode permet donc d'éliminer les procédures d'évaporation et de réduire les quantités de solvant utilisées pour l'extraction. La méthode UAE/MEPS est également susceptible d'être appliquée à une plus grande diversité de matrice que la méthode HS-SPME dont l'efficacité d'extraction est influencée par la nature de la matrice extraite.

L'absence de méthodologie standardisée pour la détermination des HAP dans les fruits a été palliée par l'établissement et la validation de deux procédures d'extraction pour ces composés. Plusieurs phases d'optimisation ont été conduites pour améliorer les performances d'une méthodologie existante par UAE/SPE ; elles ont permis la détection de concentrations en HAP 1000 fois moins importantes et d'atteindre des niveaux de l'ordre de quelques dixièmes de µg/kg. Une nouvelle utilisation de la MEPS associée à l'UAE a ensuite été développée à travers l'application de cette méthodologie à l'extraction des HAP dans la pomme. La MEPS est une procédure permettant à la fois la purification et la concentration de l'extrait UAE réduisant ainsi de manière importante le temps dédié à la préparation de l'échantillon. Cette méthode, dont très peu d'applications sont dénombrées dans la littérature et qui n'a jamais été décrite pour la détermination d'hydrocarbures aromatiques dans le cas de matrices fruitières a été validée et propose de meilleures performances que la méthodologie UAE/SPE plus communément utilisée pour l'extraction des HAP.

Selon la littérature, la MEPS est une méthode qui n'a été appliquée que pour la détermination des HAP dans des échantillons d'eau (El-Beqqali, 2006 ; Fu, 2012 ; Quinto, 2012). Ce travail

représente donc la première application de la MEPS à la détection et la quantification des HAP dans une matrice alimentaire solide.

Chapitre 5 : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Partie 5.2 : Applications à des matrices fruitières

Chapitre 5 : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Partie 5.2 : Applications à des matrices fruitières

Les méthodologies analytiques optimisées sont appliquées à la détermination du contenu en HAP de pommes récoltées en milieu naturel en Normandie (section 5.2.1). Le contenu en HAP de fruits du commerce (pomme, poire, prune, raisin) et produits commerciaux à base de fruits est ensuite vérifié (section 5.2.2). Par la suite, les diverses matrices fruitières sont exposées à des émissions de gaz d'échappement provenant d'une motorisation diesel afin de déterminer les HAP susceptibles d'être retrouvées après exposition à ce type de pollution (section 5.2.3). Le modèle pomme est également exposé à des émissions liées à la combustion de végétaux afin d'identifier et de quantifier les HAP présents dans la peau et la chair des fruits contaminés (section 5.2.4).

5.2.1. Détermination des HAP dans des pommes récoltées en Normandie

Une campagne de prélèvement de pommes locales est réalisée dans les départements de la Manche et du Calvados en Normandie. Cette récolte a pour but de déterminer la quantité en HAP contenue dans les pommes provenant de 13 sites, dont 9 situés en zone urbaine ou aux alentours d'une agglomération, 2 à proximité d'une route nationale et 2 en zone rurale (tableau 67).

Tableau 67 : Détermination du contenu en HAP dans des pommes récoltées en Normandie (µg/kg masse fraîche)

HAP	NPH*	ACY	ACP	FLR	PHE	ANT	FA	PYR	BaA	CHR	BbF	BaP	IP	DBahA	BghiP	Somme
(µg/kg)																
Zone rurale																
Agy	0,02±0,01	nd	0,47±0,13	nd	0,54±0,05	nd	0,24±0,04	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,27±0,23
Livry	0,04±0,01	nd	nd	1,36±0,05	0,39±0,01	nd	0,22±0,05	0,17±0,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,18±0,17
Zone urbaine (plus de 100 000 habitants)																
Parc expo	nd	nd	0,21±0,02	0,98±0,43	0,42±0,11	nd	0,25±0,06	0,21±0,02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,07±0,64
IUT 1.1	0,05±0,01	nd	nd	nd	0,40±0,07	nd	0,25±0,02	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,70±0,10
IUT 1.2	0,08±0,01	nd	nd	nd	1,20±0,08	nd	0,35±0,13	0,20±0,08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,83±0,30
Rectorat	0,12±0,06	nd	0,39±0,01	0,43±0,04	2,04±0,32	<LOQ	0,78±0,16	0,42±0,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,18±0,66
Venoix	nd	nd	0,97±0,35	0,62±0,36	0,74±0,07	nd	0,32±0,18	0,33±0,16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,98±1,12
Zone périphérique d'une ville comptant plus de 100 000 habitants																
Bretteville	0,09±0,04	nd	nd	0,48±0,04	1,82±0,17	nd	0,75±0,06	0,52±0,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,66±0,38
Epron 1	0,04±0,02	nd	1,35±0,69	nd	1,41±0,13	<LOQ	0,53±0,04	0,41±0,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,74±0,93
Epron 2	nd	nd	0,41±0,09	1,50±0,70	0,71±0,07	nd	0,33±0,01	0,33±0,04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,28±0,91
Verson	0,86±0,19	nd	0,70±0,07	0,63±0,11	0,96±0,08	nd	0,43±0,16	0,29±0,10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,87±0,71
Zone urbaine (moins de 20 000 habitants)																

Saint-Lô	0,07±0,02	nd	0,32±0,01	nd	1,25±0,19	nd	0,32±0,10	0,21±0,11	nd	2,17±0,43						
Vire	0,06±0,01	nd	0,45±0,06	nd	0,90±0,16	<LOQ	0,28±0,09	0,16±0,02	nd	1,85±0,34						
A proximité d'une route nationale (RN 13)																
Romilly	0,05±0,02	nd	nd	nd	1,16±0,05	nd	0,52±0,01	0,26±0,03	nd	1,99±0,11						
Isigny	0,11±0,02	nd	0,25±0,06	nd	0,85±0,29	nd	0,53±0,02	0,42±0,13	nd	2,16±0,52						

nd : non détecté

HAP : abréviations du tableau 47

* le naphthalène est extrait avec la méthode HS-SPME 3, les autres HAP sont extraits avec la méthode UAE/MEPS

<LOQ : teneur inférieure à la limite de quantification

Les résultats du tableau 67 montrent, tout d'abord, que le benzo(*a*)pyrène, qui est le seul HAP reconnu comme cancérigène pour l'Homme par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), se trouve en quantité inférieure à la limite de détection ($<0,087 \mu\text{g/kg}$) dans l'ensemble des pommes récoltées. De plus, les composés les plus lourds ($\text{MM} \geq 228 \text{ g/mol}$) possédant les plus forts potentiels toxiques ne sont pas observés dans les pommes locales (Jánská, 2006). Parmi les HAP étudiés seuls le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène sont retrouvés dans l'ensemble des pommes récoltées en Normandie.

Dans les fruits analysés, l'acénaphthylène et l'antracène ne sont pas détectés ou sont en quantités trop faibles pour être quantifiés.

Pour les autres composés, la quantité maximale est retrouvée pour le phénanthrène avec environ $2 \mu\text{g/kg}$ sur le site du rectorat (zone urbaine). La majorité des composés est retrouvée en concentration inférieure à $1 \mu\text{g/kg}$. La plupart des études ayant trait à la détermination des HAP dans des milieux naturels (Abou-Arab, 2014 ; Jánská, 2006 ; Samsøe-Petersen, 2002 ; Soceanu, 2016) conduisent à l'obtention de teneurs inférieures à $1 \mu\text{g/kg}$ dans la pomme.

Le fluorène et le phénanthrène sont globalement retrouvés en concentrations plus importantes que les autres HAP. Les valeurs rencontrées pour ces deux composés peuvent dépasser $1 \mu\text{g/kg}$ contrairement aux quantités en autres HAP qui n'excèdent généralement pas cette valeur (excepté pour l'acénaphthène sur le site Epron 1). Parmi les HAP légers ($\text{MM} \leq 202 \text{ g/mol}$) le phénanthrène est le composé retrouvé en plus grande concentration dans les pommes provenant d'une zone urbaine en Egypte ($0,47 \pm 0,05 \mu\text{g/kg}$) et d'Allemagne ($1,92-8,01 \mu\text{g/kg}$) (Abou-Arab, 2014 ; Wennrich, 2002). De même, pour les pommes récoltées en République Tchèque, le phénanthrène ($3,10-5,33 \mu\text{g/kg}$) et le fluorène ($0,82-1,37 \mu\text{g/kg}$) sont prédominants dans les pommes par rapport aux autres HAP légers (Jánská, 2006).

Les 5 échantillons possédant une teneur globale en HAP supérieure à $3,2 \mu\text{g/kg}$ sont tous situés dans des zones urbaines ou péri-urbaines (tableau 67). Cependant ces teneurs globales sont relativement peu significatives entre les différents sites d'études (teneurs globales comprises entre $0,7$ et $4,2 \mu\text{g/kg}$). Ce phénomène peut notamment s'expliquer par le fait que les échantillons aient connu, au maximum, 4 jours sans pluie avant d'être récoltés. L'impact de la pluie sur la quantité de HAP peut être observé avec les résultats du site de l'IUT pour lequel deux prélèvements sont réalisés sur le même arbre à des dates différentes. La pluie est intervenue 2 jours avant le prélèvement IUT 1.1 tandis que les échantillons IUT 1.2 (même site de prélèvement) ont connu 4 journées sans pluie avant d'être récoltés. Les résultats pour ces deux prélèvements ne montrent qu'une faible variation de concentration pour la majorité des HAP détectés. Néanmoins, le phénanthrène est retrouvé en quantité 3 fois plus importante dans l'échantillon IUT 1.2 que dans l'échantillon IUT 1.1. La responsabilité de la pluie dans le lessivage des HAP sur les pommes ne peut donc pas être écartée.

Les milieux urbains et périurbains sélectionnés dans cette partie de la Normandie ne semblent pas représenter des sources de HAP suffisamment importantes pour permettre une contamination significative des échantillons de pomme. Ces pommes sont tout de même susceptibles d'être consommées par conséquent la quantité de HAP ingérée *via* la consommation de ces fruits est estimée.

5.2.2. Estimation de l'ingestion de HAP à travers la consommation des pommes récoltées en Normandie

Les concentrations en HAP estimées (tableau 67) dans les pommes locales récoltées en Normandie sont rapportées à la masse moyenne d'une pomme (150 g) afin d'avoir une estimation de l'absorption de ces contaminants chez l'Homme *via* la consommation des fruits (tableau 68).

Tableau 68 : Estimation de la quantité en HAP ingérée (en ng) lors de la consommation d'une pomme de 150 g

	NPH	ACY	ACP	FLR	PHE	ANT	FA	PYR	Somme
Zone rurale									
Agy	2,9±1,1	-	70,7±19,0	-	80,3±8,2	-	36,8±5,4	nd	190,7±33,7
Livry	6,6±0,6	-	-	204,5±8,0	58,0±0,7	-	33,6±8,0	26,2±7,5	328,9±24,8
Zone urbaine (plus de 100 000 habitants)									
Parc expo	-	-	32,2±2,6	146,5±64,8	63,2±16,4	-	37,8±9,8	30,8±2,7	310,5±96,3
IUT 1.1	6,9±0,9	-	-	-	59,5±11,1	-	37,4±3,7	nd	103,8±15,7
IUT 1.2	12,1±0,9	-	-	-	180,2±12,6	-	52,0±19,4	30,3±12,4	274,6±45,3
Rectorat	17,8±9,3	-	58,6±1,3	65,3±5,9	305,3±47,4	nd	117,7±24,7	64,0±11,1	628,7±99,7
Venoix	-	-	145,2±52,1	93,1±54,4	111,4±10,8	-	48,4±27,0	49,7±24,0	447,8±168,3
Zone périphérique d'une ville comptant plus de 100 000 habitants									
Bretteville	14,2±6,4	-	-	71,9±6,6	272,7±26,1	-	113,1±8,4	77,9±11,2	549,8±58,7
Epron 1	5,5±3,4	-	202,3±104,1	-	211,4±19,8	nd	79,2±6,4	61,9±7,0	560,3±140,7
Epron 2	-	-	62,0±12,8	225,7±104,8	106,4±10,2	-	49,1±0,1	49,7±6,3	492,9±134,2
Verson	129,4±28,1	-	105,8±10,3	95,1±16,2	144,3±12,1	-	65,3±24,3	43,6±15,2	583,5±106,2

Zone urbaine (moins de 20 000 habitants)									
Saint-Lô	10,7±3,0	-	47,4±1,9	-	187,6±28,6	-	48,7±14,9	31,9±16,0	326,3±64,4
Vire	9,3±1,0	-	67,6±8,9	-	135,6±23,6	nd	42,6±13,6	23,5±3,6	278,6±50,7
A proximité d'une route nationale (RN 13)									
Romilly	7,9±3,2	-	-	-	174,9±7,5	-	77,5±2,2	39,6±3,9	299,9±16,8
Isigny	15,8±2,9	-	37,9±9,0	-	127,0±43,4	-	79,4±2,9	63,2±19,5	323,3±77,7

HAP : abréviations du tableau 47

- valeur nulle

nd : non déterminé (valeur de teneur inférieure à la limite de quantification de la méthodologie)

Les composés les plus lourds (MM entre 228 et 278 g/mol) ne sont pas indiqués car leur quantité est systématiquement inférieure aux limites de détection de la méthode

L'absorption de HAP (somme de 15) suite à la consommation de 150 g de fruits varie de $103,8 \pm 15,7$ ng pour le site de l'IUT 1.1 à $628,7 \pm 99,7$ ng pour le site du rectorat. En République tchèque, avec les pommes, l'apport journalier de HAP (somme de 12) à travers l'alimentation est estimé, à partir d'une consommation annuelle de 23,8 kg, à 448,6 ng/jour (Jánská, 2006). En utilisant cette évaluation annuelle de la consommation de pommes (23,8 kg), l'apport journalier en HAP avec les échantillons récoltés en Normandie se trouve entre $45,6 \pm 2,0$ ng et $252,3 \pm 23,5$ ng, ce qui est inférieur à l'apport estimé en République tchèque (448,6 ng/jour) pour les pommes. Néanmoins, cet apport journalier estimé sur la consommation annuelle peut-être dépassé par une consommation ponctuelle de 150 g de pomme provenant du site du Rectorat par exemple ($628,7 \pm 99,7$ ng de HAP pour 150 g de pomme).

Chez l'Homme, à l'exception du benzo(a)pyrène, aucune réglementation n'est disponible pour les hydrocarbures aromatiques dans l'alimentation en raison du manque de données concernant leur toxicité par voie orale. Le benzo(a)pyrène n'étant retrouvé dans aucune des pommes récoltées en Normandie, aucune donnée ne permet d'estimer la potentielle toxicité engendrée par le contenu en HAP des pommes analysées.

5.2.3. Estimation du contenu en HAP dans les fruits et produits à base de fruits du commerce

Au cours de ce travail, de multiples essais ont été réalisés sur des fruits achetés dans un supermarché local. Ces fruits du commerce ont permis notamment de réaliser les courbes d'étalonnage à travers des ajouts de solution en HAP (méthodologies HS-SPME, méthodologie UAE/SPE, méthodologie UAE/MEPS). Ces données, permettant de produire un résultat juste, sont exploitables pour faire un bilan de présence en HAP dans plusieurs fruits du commerce (pomme puis poire, prune et raisin).

5.2.3.1. Détermination des HAP dans les fruits du commerce

Pour chaque composé, l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage correspond à la contamination intrinsèque du fruit. Pour les pommes, les poires, les prunes et les raisins provenant du supermarché les quantités en HAP initialement présentes sont déterminées en rapportant l'ordonnée à l'origine à la pente de la droite d'étalonnage (tableau 69).

Tableau 69 : Estimation du contenu en HAP dans des fruits provenant du commerce ($\mu\text{g}/\text{kg}$ masse fraîche)

Composés	Pomme			Poire	Prune	Raisin
	A ¹	B ²	C ³	A ¹	A ¹	A ¹
HAP légers						
Naphtalène	0,34	0	nd	0,59	0,45	0,56
Acénaphthylène	1,08	0,31	<LOD	0	0	0,22
Acénaphthène	0,05	0,17	0,36	0	0	0
Fluorène	0	0,21	0,21	0	0	0
Phénanthrène	nd	0,26	0,65	nd	nd	nd
Anthracène	nd	0	<LOD	nd	nd	nd
HAP lourds						
Fluoranthène	7,78		0,49	0,76	5,08	5,92
Pyrène	5,05		0,32	0,80	3,02	3,59
Benzo(a)anthracène	<LOQ		<LOQ	0	0	0
Chrysène	0,80		<LOQ	0	0	0
Benzo(b)fluoranthène	3,17		<LOQ	2,59	3,25	2,88
Benzo(a)pyrène	0		0	<LOD	0	0
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	<LOQ		0	0	0	0
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	0		0	0	0	0
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	<LOQ		0	0	0	0

1 : contenu en $\mu\text{g}/\text{kg}$, correspondant au rapport de l'ordonnée à l'origine sur la pente, déterminé lors de l'étalonnage avec la méthode HS-SPME 2 pour les HAP légers et avec la méthode UAE/SPE 2 pour les HAP lourds (LOQ benzo(a)anthracène dans la pomme : 0,428 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ indéno(1,2,3-*cd*)pyrène dans la pomme : 0,449 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ benzo(*ghi*)perylène dans la pomme : 0,378 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOD benzo(a)pyrène dans la poire 0,133 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

2 : contenu, correspondant au rapport de l'ordonnée à l'origine sur la pente, déterminé lors de l'étalonnage avec la méthode HS-SPME 3 (uniquement utilisée pour les HAP légers)

3 : contenu, correspondant au rapport de l'ordonnée à l'origine sur la pente, déterminé lors de l'étalonnage avec la méthode UAE/MEPS (LOD acénaphthylène : 0,036 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOD anthracène : 0,045 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ benzo(a)anthracène : 0,195 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ chrysène : 0,206 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ benzo(b)fluoranthène : 0,242)

<LOQ : teneur inférieure à la limite de quantification

<LOD : teneur inférieure à la limite de détection

nd : non déterminé

Les analyses des 3 achats de pommes (A, B, C) indiquent que le contenu en HAP dans ce fruit peut être très variable (tableau 69). Les HAP légers sont peu présents dans les différents fruits provenant du commerce. Les quantités relevées sont généralement inférieures à 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, excepté pour l'acénaphthylène qui a pu être retrouvé à une concentration de 1,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans la pomme (tableau 69). Les HAP légers, à l'exception du naphtalène, semblent globalement être plus présents dans la pomme. Ces composés semblent mieux s'adsorber sur la peau de la pomme que sur celle de la poire, de la prune ou du raisin. Ces valeurs sont cohérentes avec les quantités retrouvées dans les pommes récoltées en Normandie puisque des valeurs inférieures à 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sont généralement observées pour les HAP jusqu'à 202 g/mol dans la plupart des pommes (tableau 67). Jánková *et al.* (2006) ont trouvé des niveaux comparables compris entre 0,82 et 1,37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids frais pour les HAP légers dans des pommes cultivées en Moravie. Le chrysène n'est retrouvé que dans la pomme avec une concentration maximale de 0,80 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Le benzo(a)anthracène est détecté seulement dans la pomme mais en quantité trop

faible pour être quantifié. Le fluoranthène, le pyrène et le benzo(*b*)fluoranthène sont quant à eux détectés dans l'ensemble des fruits à des concentrations relativement élevées pouvant atteindre jusqu'à 7,8 µg/kg pour le fluoranthène dans la pomme. Ces composés semblent donc bien s'adsorber indépendamment du type de fruit considéré. Le benzo(*b*)fluoranthène est un composé assez peu étudié dans les fruits dans la littérature. Cependant, des niveaux supérieurs à 2 µg/kg ont pu être relevés pour cet hydrocarbure aromatique dans la peau et la pulpe de carotte (Ashraf, 2013). Concernant le fluoranthène, des concentrations supérieures à 4,5 µg/kg peuvent être atteintes dans certains échantillons de pommes et de raisins cultivés dans une zone industrielle brésilienne (Camargo, 2003). Les teneurs en pyrène retrouvées dans la littérature pour les fruits, n'excèdent généralement pas 1 µg/kg excepté pour le kiwi, avec 1,30±0,02 µg/kg dans la pulpe et 1,44±0,01 µg/kg dans la peau (Soceanu, 2016). Néanmoins, des teneurs en pyrène autour de 2 µg/kg peuvent être rencontrées dans la laitue cultivée en zone rurale (Camargo, 2003).

Le benzo(*a*)pyrène, l'indéno(1,2,3-*cd*)pyrène, le dibenzo(*ah*)anthracène et le benzo(*ghi*)perylène qui sont les HAP les plus lourds, ne sont pas retrouvés dans les divers fruits ou sont en quantité trop faibles pour être détectés ou quantifiés (tableau 69). L'absence de ces composés lourds avait également été remarquée pour les pommes provenant des différents sites normands (tableau 67).

5.2.3.2. Détermination des HAP dans des produits à base de pomme du commerce

La pomme est un produit qui est destiné à être directement consommé mais elle peut également être transformée. La pomme se décline en de nombreux produits dérivés tels que les jus, les alcools, les compotes, les chips ou les pâtes de fruits. Certains de ces produits transformés de façon industrielle sont soumis à la procédure d'extraction en UAE/MEPS. La méthodologie n'ayant pas fait l'objet d'une validation pour ces matrices, seule une estimation du contenu en HAP pourra être donnée à partir des pentes déterminées avec la pomme. La compote, les chips et les pâtes de fruits sont choisis pour leur diversité de texture mais également car leur transformation nécessite une étape de cuisson.

Pâtes de fruits à base de pomme et chips de pomme

Avec les pâtes de fruits à base de pomme et les chips de pomme, les aires brutes obtenues pour les étalons internes se trouvent significativement réduites par rapport à celles observées avec la pomme. Les aires brutes sont divisées par 3 pour le benzo(*a*)anthracène-d12 et par 6 pour l'acénaphthène-d10. La procédure UAE/MEPS ne semble pas être optimale pour l'extraction des HAP dans ces aliments dont le contenu en eau est fortement réduit par rapport au fruit non transformé. Pour les chips de pomme, par exemple, la masse d'échantillon utilisée (20 g) occupe un espace important et la totalité de l'échantillon ne se trouve pas totalement recouverte par le solvant (25 mL d'éthanol). L'UAE ne permet pas l'extraction de l'ensemble de l'échantillon. De plus, le faible contenu en eau de ces deux produits est susceptible d'engendrer l'adsorption des composés hydrophobes, tels que les HAP mais également les étalons internes introduits dans les échantillons. La forte adsorption des composés à la matrice n'induit donc qu'un faible transfert vers le solvant.

Une étape d'extraction plus longue avec une quantité de solvant adaptée aurait pu être envisagée pour optimiser le transfert des analytes dans le solvant d'extraction. Néanmoins, en ce qui concerne ces deux produits cuits à base de pomme, aucun HAP n'est détecté, les essais ne sont pas poursuivis pour ces matrices.

Compote de pomme

Pour les échantillons de compote de pomme, les aires brutes des étalons internes sont cohérentes avec celles observées pour la pomme non transformée. La compote est une matrice plutôt aqueuse proche du broyat de pomme. Les pentes des droites d'étalonnage établies en UAE/MEPS avec la pomme sont donc utilisées pour estimer les quantités en HAP retrouvées dans la compote, où seuls le phénanthrène et le fluoranthène sont détectés.

Les concentrations estimées sont de $0,97 \pm 0,23$ $\mu\text{g/kg}$ (w.w.) pour le phénanthrène et de $0,43 \pm 0,27$ $\mu\text{g/kg}$ (w.w.) pour le fluoranthène. Ces quantités sont assez faibles et sont données à titre indicatif. Une quantification précise aurait nécessité la réalisation des gammes d'étalonnage avec la compote comme matrice d'extraction afin de vérifier leur adéquation avec celles obtenues avec la pomme.

D'après l'étude menée sur la compote, les chips et les pâtes de fruits il apparaît que les procédés de cuisson utilisés pour la préparation de ces produits n'engendrent pas de production importante de HAP. Des concentrations similaires sont retrouvées dans des pommes provenant de pommiers normands, avec par exemple $0,96 \pm 0,08$ $\mu\text{g/kg}$ pour le phénanthrène et $0,43 \pm 0,16$ $\mu\text{g/kg}$ pour le fluoranthène sur le site de Verson (tableau 67).

5.2.4. Détermination des HAP dans des fruits exposés aux émissions de gaz de moteur diesel

Afin d'apprécier la conséquence d'une exposition à des émissions de moteur diesel, des fruits subissent une exposition directe (30 minutes) aux gaz d'échappement d'un véhicule dont le moteur est chaud (30 min de trajet de chauffe). Le type de véhicule, utilisant le diesel comme carburant, est représentatif du parc automobile français. Les résultats obtenus dans la pomme, la poire, la prune et le raisin sont présentés dans le tableau 70.

Tableau 70 : Contenu en HAP ($\mu\text{g}/\text{kg}$ masse fraîche) dans les différents fruits après 30 minutes d'exposition aux émissions diesel (n=3)

Composés	Pomme	Poire	Prune	Raisin
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
HAP légers (méthode HS-SPME 2)				
Naphtalène	0,07±0,02	0,13±0,05	0,06±0,01	<LOQ
Acénaphthylène	1,54±0,44	nd	nd	nd
Acénaphthène	nd	nd	nd	nd
Fluorène	1,15±0,22	0,20±0,08	nd	nd
HAP lourds (méthode UAE/SPE 2)				
Fluoranthène	7,84±3,43	5,39±0,24	7,01±2,70	5,23±0,21
Pyrène	4,17±1,81	4,07±0,10	4,52±1,93	3,69±0,15
Benzo(a)anthracène	nd	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Chrysène	nd	0,40±0,07	0,30±0,24	<LOQ
Benzo(b)fluoranthène	1,89±0,56	3,41±0,25	1,81±1,60	3,78±1,03
Benzo(a)pyrène	nd	nd	nd	nd
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	nd	nd	nd	nd
Dibenzo(ah)anthracène	nd	nd	nd	nd
Benzo(ghi)perylène	nd	nd	nd	nd

nd: non détecté

<LOQ : teneur inférieure à la limite de quantification

Le benzo(*a*)pyrène, dont le caractère cancérigène est reconnu chez l'Homme, est absent de l'ensemble des fruits exposés aux gaz d'échappement. De même, les HAP les plus lourds ($MM \geq 276$ g/mol) ne sont détectés dans aucun des fruits étudiés. Des traces de benzo(*a*)anthracène et de chrysène ($<0,5$ µg/kg) sont mesurées dans la poire, la prune et le raisin, alors que ces composés ne sont pas retrouvés pour les pommes.

Le fluoranthène (environ 5 à 8 µg/kg), le pyrène (autour de 4 µg/kg) et le benzo(*b*)fluoranthène (environ 2 à 4 µg/kg) présentent de fortes teneurs dans les quatre fruits exposés (tableau 70). Cependant, leur présence ne peut être directement attribuée à l'exposition aux émissions diesel puisque ces composés peuvent également être retrouvés dans les fruits non pollués. Le fluoranthène est par exemple présent en teneur supérieure à 5 µg/kg dans la pomme, la prune et le raisin du commerce. De même, une concentration en pyrène autour de 5 µg/kg peut être trouvée pour la pomme et des quantités en benzo(*b*)fluoranthène d'environ 3 µg/kg peuvent être mesurées dans les différents fruits du commerce (tableau 69).

Très peu de HAP légers sont présents dans les fruits exposés aux émissions de moteur diesel, la concentration maximale est d'environ 1,5 µg/kg pour l'acénaphthylène dans la pomme (tableau 70). Néanmoins, une teneur autour de 1 µg/kg pour l'acénaphthylène peut également être retrouvée initialement dans la pomme du commerce (tableau 69).

Globalement, seul le contenu en fluorène dans la pomme ($1,15 \pm 0,22$ µg/kg) et la poire ($0,20 \pm 0,08$ µg/kg) est significativement augmenté après l'exposition aux gaz d'échappement. Ce composé semble donc mieux s'adsorber sur la peau de la pomme et de la poire que sur celle de la prune ou du raisin.

L'exposition, durant un temps limité (30 min), aux gaz d'échappement d'un moteur diesel n'a entraîné qu'un très faible dépôt d'hydrocarbures aromatiques sur les fruits qui, pour la majorité des HAP, ne peut pas être différencié de manière significative du contenu dans les fruits non contaminés (tableau 69). Un profil de contamination des fruits suite à l'exposition à des gaz d'échappement de moteur diesel ne peut donc pas être dégagé de ces résultats, empêchant ainsi une éventuelle comparaison avec des données de la littérature.

5.2.5. Détermination des HAP dans des pommes exposées à des fumées issues de la combustion de biomasse

Malgré la circulaire du 18 novembre 2011 interdisant le brûlage à l'air libre des déchets verts, cette pratique reste très répandue en milieu rural. Près d'un million de tonnes de ces déchets sont brûlés, chaque année en France, créant des fumées qui ne peuvent pas être dépolluées (Circulaire du 18 novembre 2011 relative à l'interdiction du brûlage à l'air libre des déchets verts ; ADEME, Que faire de ses déchets de jardin ?). Les fruits peuvent donc être potentiellement exposés à ces fumées et l'impact de ce type de brûlage sur le contenu en HAP est étudié pour les pommes. Les pommes sont ainsi exposées pendant différentes durées (entre 1 et 2 h) à des fumées issues du brûlage de branches de tilleul fraîches. Les niveaux de HAP retrouvés dans la pomme entière ou dans la peau et la chair des fruits sont présentés dans les tableaux 74 et 75.

Tableau 71 : Contenu en HAP dans la pomme entière, la peau et la chair exposées ou non aux fumées de combustion des végétaux

	Pomme entière		Peau		Chair	
	Non exposée	1 h exposition	Non exposée	1 h exposition	Non exposée	1 h exposition
(µg/kg)						
HAP légers						
Naphtalène*	0,04±0,01	4,24±0,30	0,46±0,08	> 10 (≈18)	0,03±0,01	1,01±0,25
Acénaphthylène	nd	nd	nd	5,11±0,66	nd	nd
Acénaphthène	0,84±0,26	1,38±0,31	nd	2,91±0,87	0,77±0,12	1,06±0,36
Fluorène	nd	1,02±0,08	nd	6,16±0,16	nd	nd
Phénanthrène	0,78±0,19	> 10 (≈12)	5,12±0,51	> 10 (≈75)	nd	0,65±0,08
Anthracène	nd	0,51±0,04	nd	3,93±0,22	nd	nd
HAP lourds						
Fluoranthène	nd	2,00±0,04	2,39±0,73	> 10 (≈13)	nd	nd
Pyrène	nd	1,29±0,19	1,26±0,43	9,82±1,42	nd	nd
Benzo(a)anthracène	nd	nd	nd	0,79±0,10	nd	nd
Chrysène	nd	nd	nd	3,56±0,66	nd	nd
Benzo(b)fluoranthène	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(a)pyrène	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* le naphtalène est extrait avec la méthode HS-SPME 3, les autres HAP sont extraits avec la méthode UAE/MEPS

Les pommes entières et les pommes utilisées pour les analyses de peau et de chair séparées sont différentes mais font parties d'un même lot acheté dans le commerce

Exposition aux fumées de combustion de branches de tilleul pendant 1 h, l'extraction UAE est réalisée le lendemain de l'exposition

Le tableau 71 permet la comparaison du contenu en HAP entre des échantillons exposés aux fumées issues de la combustion de biomasse et d'autres n'ayant pas été exposés.

Comparaison des contenus en HAP présents dans la peau et la chair de pommes non exposées

Le contenu initial en HAP des pommes du commerce utilisées pour cette expérimentation est assez réduit ; seuls le naphtalène, l'acénaphthène et le phénanthrène sont suffisamment présents pour être détectés dans la pomme entière non exposée. Leurs teneurs individuelles y sont toutes inférieures au µg/kg. La recherche des HAP dans la peau et la chair d'une pomme issue d'un même lot et, elle-même non exposée, permet une meilleure compréhension de la localisation de ces composés au niveau du fruit. Les HAP semble être majoritairement présents à la surface du fruit, ce qui est cohérent avec les observations de la littérature. Le niveau de HAP (somme de 15 HAP) dans la peau (échantillons extraits en triplicat) de banane (5,51±0,24 µg/kg w.w.) est par exemple environ 8 fois plus important que celui détecté dans la pulpe (0,72±0,01 µg/kg w.w.) (Soceanu, 2016). L'épiderme constitue une barrière lipophile de protection pour le fruit, favorisant l'adsorption des HAP mais limitant voire empêchant

leur pénétration dans la chair. La présence de naphthalène et d'acénaphthène au niveau de la chair des pommes non exposées pourrait laisser envisager un apport endogène de ces deux composés. Une possible origine endogène a été évoquée par Azuma *et al.* (1996) pour le naphthalène qui n'est rencontré (entre 10 et 36 % de la composition totale) que dans les pétales de certains taxons de *Magnolia* (*M. denudata*, *M. liliiflora*, *M. tomentosa*, *M. p. var. praecocissima* and *vat. borealis*) (Azuma, 1996).

A l'inverse, la quantité en phénanthrène ($0,78 \pm 0,19$ µg/kg) dans la pomme entière peut être imputée à une présence relativement exclusive dans la peau ($5,12 \pm 0,51$ µg/kg). De même, pour le fluoranthène ($2,39 \pm 0,73$ µg/kg) et le pyrène ($1,26 \pm 0,43$ µg/kg) dont des teneurs significatives sont retrouvées dans la peau. Pour ces 3 HAP, une origine liée à une contamination extérieure peut être suspectée. En ce qui concerne les HAP les plus lourds (MM > 228 g/mol), leurs teneurs sont trop faibles pour être détectés dans la peau et dans la chair du fruit.

Présence de HAP dans la pomme entière après exposition aux fumées de combustion de végétaux

L'exposition aux fumées de brûlage induit une forte augmentation de la présence des HAP les plus légers (MM < 228 g/mol). Ces résultats sont cohérents puisque le bois brûle à de faibles températures engendrant majoritairement la formation de HAP de faibles masses moléculaires (Tobiszewski, 2012). Les dépôts les plus importants sont observés dans cet ordre pour le phénanthrène (supérieur à 10 µg/kg), le naphthalène (de l'ordre de 4 µg/kg), le fluoranthène (de l'ordre de 2 µg/kg), le pyrène et le fluorène (de l'ordre de 1 µg/kg). Le profil des HAP produits lors de la combustion de biomasse semble dépendre du type de combustible végétal. Le naphthalène est majoritairement retrouvé lors de la combustion de bois d'eucalyptus et l'acénaphthène est le HAP le plus présent dans les émissions issues de la combustion de charbon (Oanh, 1999).

Présence de HAP dans la peau et la chair de pommes après exposition aux fumées de combustion de végétaux

Il apparaît également que les HAP formés lors de la combustion de biomasse s'adsorbent préférentiellement au niveau de la peau des pommes. Les quantités de HAP dans la peau des pommes contaminées varient de 0,8 µg/kg pour le benzo(a)anthracène à des valeurs supérieures à la limite de linéarité (10 µg/kg) pour le naphthalène, le phénanthrène et le fluoranthène. A l'exception du naphthalène, de l'acénaphthène et du phénanthrène (environ 1 µg/kg), les HAP ne sont pas retrouvés dans la chair des fruits non exposés, confirmant le transfert limité des composés vers le mésocarpe.

Variation de la présence en HAP dans la peau et la chair des pommes après des durées d'expositions différentes aux fumées de combustion de végétaux

Afin d'observer éventuellement un passage des HAP de la peau vers la chair des pommes, la durée d'exposition des fruits est augmentée à 1h30 puis à 2h. L'exposition d'une heure est également renouvelée, les pommes ayant été soumises aux fumées de combustion de tilleul sont conservées à température ambiante pendant 15 jours puis extraites et analysées après ce

temps de latence. Il est à noter que les conditions expérimentales d'exposition sont difficilement répétables. Le tableau 72 présente les quantités de HAP détectées dans la peau et la chair des pommes après 1h30 et 2h d'exposition et pour un essai d'1h d'exposition avec 15 jours de conservation du fruit.

Tableau 72 : Contenu en HAP dans la peau et la chair de pommes dans différentes conditions d'exposition aux fumées de combustion de biomasse

	1 h d'exposition 15 j de conservation		1 h 30 min d'exposition		2 h d'exposition	
	Peau	Chair	Peau	Chair	Peau	Chair
	(µg/kg)					
<u>UAE/MEPS</u>						
Acénaphtylène	3,04±0,41	nd	2,35±0,25	0,22±0,03	nd	nd
Acénaphène	3,34±0,20	0,36±0,07	3,22±0,26	0,23±0,05	nd	nd
Fluorène	9,16±1,32	0,41±0,07	>10 (≈28)	0,64±0,18	>10 (≈74)	0,60±0,08
Phénanthrène	>10 (≈94)	1,20±0,05	>10 (≈219)	2,77±0,23	>10 (≈302)	1,52±0,28
Anthracène	8,27±0,55	0,13±0,03	>10 (≈21)	0,15±0,04	>10 (≈33)	nd
Fluoranthène	>10 (≈26)	0,13±0,06	>10 (≈53)	0,28±0,10	>10 (≈56)	nd
Pyrène	>10 (≈14)	0,09±0,04	>10 (≈33)	0,17±0,05	>10 (≈35)	nd
Benzo(<i>a</i>)anthracène	0,71±0,06	nd	2,54±0,17	nd	2,83±0,64	nd
Chrysène	2,64±0,19	nd	7,40±0,01	nd	9,72±0,69	nd
Benzo(<i>b</i>)fluoranthène	1,94±0,25	nd	2,59±0,10	nd	3,62±0,51	nd
Benzo(<i>a</i>)pyrène	0,66±0,10	nd	2,05±0,44	nd	2,44±0,15	nd
Indéno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrène	0,64±0,14	nd	0,49±0,11	nd	1,02±0,10	nd
Dibenzo(<i>ah</i>)anthracène	0,40±0,11	nd	nd	nd	0,67±0,19	nd
Benzo(<i>ghi</i>)perylène	0,59±0,01	nd	1,43±0,39	nd	1,30±0,38	nd

Exposition aux fumées de combustion de branches de tilleul pendant 2 h, 1 h 30 min ou 1 h. L'extraction UAE pour les pommes exposées 1 h 30 min et 2 h est réalisée le lendemain de l'exposition. Les pommes exposées 1 h sont analysées après 15 jours de conservation à température ambiante

Le tableau 72 indique que la quasi-totalité des HAP ciblés par l'étude est retrouvée dans la peau des pommes exposées aux fumées issues de la combustion de biomasse. Les HAP légers de masses moléculaires comprises entre 166 et 202 g/mol sont les plus présents dans la peau des pommes ayant été exposées, avec des concentrations globalement supérieures à 10 µg/kg (excepté pour le fluorène 9,16±1,32 µg/kg et l'anthracène 8,27±0,55 µg/kg après 1h d'exposition) pour les 3 durées d'exposition. Le phénanthrène est le HAP le plus présent, quelle que soit la durée de combustion ou la localisation (peau ou chair). Ces résultats sont cohérents avec ceux du précédent essai d'exposition aux fumées de combustion (tableau 71). Le brûlage de bois de tilleul humide semble donc émettre des fumées contenant principalement du phénanthrène.

Les teneurs en HAP les plus lourds ($MM \geq 228$ g/mol) dans la peau après 1 h 30 ou 2 h d'exposition sont globalement peu variables. Les valeurs rencontrées pour ces composés dans

la peau après 2 h d'exposition varient entre 0,7 et 9,7 µg/kg et de 0,5 à 7,4 µg/kg pour 1 h 30 min d'exposition (tableau 72). Les teneurs en acénaphthylène et en acénaphthène sont quant à elles supérieures à 2 µg/kg après 1h30 d'exposition mais non retrouvés après 2 h. Ces valeurs indiquent donc que la composition des fumées issues de la combustion de biomasse est variable. Des paramètres tels que l'humidité des végétaux sont notamment susceptibles d'influer sur la production de HAP. Les conditions de brulage des végétaux sont difficilement répétables empêchant la comparaison directe des valeurs.

Seuls les HAP ayant une masse moléculaire inférieure ou égale à 202 g/mol sont rencontrés dans la chair des pommes. Quelle que soit la durée d'exposition la teneur en HAP dans la chair reste inférieure à 1 µg/kg, excepté pour le phénanthrène (jusqu'à 2,77±0,23 µg/kg après 1 h 30 d'exposition). L'analyse de la peau et de la chair séparée indique un transfert limité des composés hydrophobes de l'épicarpe vers le mésocarpe malgré un dépôt très important de HAP sur les fruits.

Les résultats permettent d'indiquer que l'élimination de la peau de la pomme engendre une forte réduction de la quantité de HAP susceptible d'être ingérée si un tel fruit venait à être consommé. L'épluchage des pommes est donc une pratique efficace pour limiter l'absorption de HAP.

5.2.6. Conclusion sur la présence de HAP dans les pommes

Grâce aux performances des méthodologies développées, cette étude a permis la recherche de très faibles niveaux de contamination en HAP dans des pommes locales. La campagne de prélèvement de pommes réalisée en Normandie sur 13 sites, dont 9 situés en zone urbaine ou aux alentours d'une agglomération, 2 à proximité d'une route nationale et 2 en zone rurale a montré (i) des concentrations inférieures à 1 µg/kg pour la majorité des HAP présents et (ii) l'absence des composés les plus lourds ($MM \geq 228$ g/mol).

Le contenu en HAP dans ces pommes est donc relativement faible et ne semble pas significativement différent selon qu'elles sont récoltées dans des zones rurales et urbaines ou péri-urbaines. Il est à noter que les pluies assez fréquentes intervenues au cours de la période de collecte de pommes (maximum 4 jours sans pluie) ont pu affecter les teneurs en HAP. Des teneurs plus élevées sont relevées dans des pommes provenant du commerce, avec notamment des concentrations en fluoranthène, pyrène et benzo(*b*)fluoranthène pouvant excéder 3 µg/kg. L'exposition des pommes du commerce à des gaz d'échappement d'un moteur diesel pendant 30 min engendre un dépôt de HAP peu significatif par rapport au contenu déterminé pour les pommes du commerce. Seul le fluorène est retrouvé en quantité 5 fois plus importante dans la pomme exposée aux gaz d'échappement. Le phénanthrène apparaît être, quant à lui, le composé majoritairement émis lors de la combustion de bois de tilleul humide. Une exposition d'1 h aux fumées de combustion de biomasse végétale induit un dépôt de HAP important sur les pommes avec une prépondérance de composés légers ($MM \leq 202$ g/mol). Pour la pomme, l'épicarpe qui constitue une barrière de protection hydrophobe apparaît être le principal lieu de sorption pour les HAP et leur transfert vers le mésocarpe reste limité.

Conclusions et perspectives

Les hydrocarbures aromatiques sont des composés lipophiles et volatils. Néanmoins, une différence de volatilité assez importante existe entre d'un côté les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylènes) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) légers et d'un autre côté les HAP plus lourds (quatre cycles ou plus). Cette différence de caractéristique a nécessité la mise en œuvre de deux approches méthodologiques distinctes d'extraction pour la détermination des hydrocarbures aromatiques à l'état de traces dans les matrices fruitières. Ces approches ont été optimisées avec la pomme comme matrice principale pour l'extraction.

Parmi les hydrocarbures aromatiques, les BTEX sont les composés les plus volatils, ce qui a permis d'envisager leur extraction dans l'espace de tête (HS) des échantillons au moyen d'une fibre de micro-extraction en phase solide (SPME). Pour la mise en œuvre de cette technique, relativement rapide, deux revêtements de fibre ont été utilisés et les performances obtenues avec un support PDMS d'épaisseur 100 μm et un support CAR/PDMS d'épaisseur 75 μm présentent globalement des différences peu significatives. Le revêtement mixte CAR/PDMS est, cependant, susceptible d'être un peu plus hétérogène entraînant une variabilité des résultats légèrement plus importante qu'avec une phase non mixte. La sensibilité de l'extraction des BTEX dans la pomme se trouve également améliorée par l'utilisation d'un support HS-SPME ayant une épaisseur plus importante.

Les techniques HS-SPME présentées dans cette étude se sont révélées particulièrement adaptées à l'extraction de faibles quantités de BTEX, de l'ordre de quelques $\mu\text{g}/\text{kg}$ (w.w.) dans une matrice complexe telle que la pomme. Les performances de la HS-SPME pour les BTEX a permis d'envisager l'extraction des HAP légers au moyen de cette méthodologie. Une méthode combinant une HS-SPME et une extraction assistée par les ultrasons suivie d'une extraction en phase solide (UAE/SPE) a donc été validée afin de permettre la détermination de l'ensemble des HAP ciblés. Cette stratégie a montré des performances en adéquation avec la recherche de HAP à l'état de traces, avec des limites de détection (LOD) comprises entre 0,002 et 0,172 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Néanmoins, l'association de la HS-SPME et de l'UAE/SPE comprend un grand nombre d'étapes. Une nouvelle méthodologie utilisant une extraction assistée par les ultrasons suivie d'une micro-extraction par solide compacté (UAE/MEPS) est sélectionnée afin de réduire la durée ainsi que la quantité de solvant nécessaire à l'extraction. La procédure MEPS, qui se substitue à l'étape de purification ainsi qu'à l'étape de concentration de l'extrait avant l'analyse, permet une amélioration des performances d'extraction des HAP par rapport à la stratégie précédente combinant la HS-SPME et l'UAE/SPE. L'UAE/MEPS permet la récupération de la quasi-totalité des HAP étudiés en une seule procédure avec de faibles limites de quantification ($\text{LOQ} < 0,44 \mu\text{g}/\text{kg}$ pour l'ensemble HAP) et des coefficients de variation inférieurs à 12 % pour tous les tests de fidélité à 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. D'après la littérature actuelle, ce travail représente la première application de la MEPS à la détection et la quantification des HAP dans une matrice alimentaire solide.

L'efficacité d'extraction des HAP en HS-SPME semble être influencée par la nature de la matrice extraite. La méthode UAE/MEPS est donc particulièrement susceptible d'être appliquée à une grande diversité de matrice. Des applications étendues à d'autres matrices fruitières ou même à d'autres matrices alimentaires telles que les légumes pourraient être envisagées. De même, une éventuelle corrélation avec le contenu en hydrocarbures aromatiques dans l'air et le sol pourrait être étudiée. Cette étude mettrait potentiellement en évidence l'impact de l'environnement de culture sur le niveau de contamination des végétaux aériens ou souterrains par les hydrocarbures aromatiques.

Le potentiel de la MEPS révélé par l'étude des HAP permet également d'envisager une application de cette méthodologie à l'extraction de composés plus légers, tels que les BTEX. L'automatisation de la procédure MEPS engendrerait, de plus, un gain de temps non négligeable lors de l'étape d'extraction.

Les diverses méthodes optimisées pour la détermination des hydrocarbures aromatiques ont ensuite été appliquées à la quantification des BTEX et des HAP dans des pommes provenant des 13 sites différents situés en Normandie. Le contenu total en BTEX et la teneur en HAP pour un composé particulier n'excède généralement pas 1 µg/kg quel que soit le lieu de prélèvement en zone urbaine, péri-urbaine ou rurale. L'étude révèle donc que seules de faibles concentrations sont retrouvées dans ces pommes normandes. Il existe très peu de donnée sur la présence des hydrocarbures aromatiques dans les fruits en particulier en ce qui concerne les BTEX. Ce travail a donc permis de développer les connaissances sur les teneurs en hydrocarbures aromatiques dans des pommes récoltées en Normandie.

Par rapport aux pommes prélevées en milieu naturel (Normandie), les BTEX et les HAP sont présents en quantités très variables et globalement supérieures dans des fruits provenant du commerce. Le contenu total en BTEX peut notamment atteindre jusqu'à environ 14 µg/kg et jusqu'à environ 8 µg/kg pour un HAP particulier (fluoranthène) dans les pommes achetées dans un supermarché local.

L'analyse séparée de la peau et de la chair des pommes a permis de mettre en évidence une localisation préférentielle des hydrocarbures aromatiques dans l'épicarpe et que le transfert vers le mésocarpe du fruit semble limité voire inexistant.

En milieu naturel, les fumées générées par les transports et la combustion de biomasse végétale peuvent potentiellement engendrer un dépôt d'hydrocarbures aromatiques sur les cultures environnantes. Une attention particulière est donc portée sur les hydrocarbures aromatiques déposés sur des fruits exposés aux gaz d'échappement d'un moteur diesel et aux fumées de combustion de bois de tilleul.

Les variations des contenus en HAP et en BTEX dans la pomme, la poire, la prune et le raisin après exposition à des émissions de motorisation diesel, sont tout d'abord étudiés. Parmi les BTEX, seule la présence en *m/p*-xylènes augmente de façon significative pour la majorité des fruits par rapport au contenu estimé pour les fruits du commerce. En ce qui concerne les HAP, la concentration en fluorène se trouve significativement augmentée après l'exposition aux gaz

d'échappement mais uniquement dans la pomme et dans la poire. Ce composé est donc mieux adsorbé sur la peau de la pomme et de la poire que sur celle de la prune ou du raisin. Afin d'améliorer la compréhension du processus d'adsorption des hydrocarbures aromatiques au niveau des différents fruits, une étude approfondie de la surface pourrait être menée à travers (i) la mesure du rapport poids/surface exposé et (ii) l'analyse chimique des composants de la cire. Des analyses en spectroscopie infra-rouge peuvent être envisagées afin de permettre en première approche une comparaison, en proportion, des bandes caractéristiques de certains composés, susceptibles d'intervenir dans le mécanisme de sorption, tels que les sucres ou les polyphénols.

Globalement, le protocole d'expérimentation, utilisant une exposition pendant 30 min avec un véhicule diesel ayant suivi auparavant un trajet relativement long de 30 min, n'entraîne qu'un faible dépôt d'hydrocarbures aromatiques sur les fruits. D'après la littérature le temps de chauffe du véhicule influe sur les quantités d'hydrocarbures aromatiques émis. Cette étude pourrait donc être renouvelée en faisant varier le paramètre de chauffe mais également le type de motorisation du véhicule.

La pomme est également soumise aux fumées de combustions de biomasse. L'exposition des pommes aux émissions liées à la combustion de bois de tilleul entraîne une augmentation significative, d'un facteur supérieur à 2, du contenu en chaque BTEX dans la peau des fruits. A l'inverse, aucun de ces composés n'est détecté dans le mésocarpe des pommes exposées aux fumées. Le profil en BTEX observé au niveau de la peau après l'exposition indique que le composé principalement retrouvé est le benzène, suivi du toluène et des *m/p*-xylènes.

En ce qui concerne les HAP, l'exposition à ces fumées de brûlage induit un dépôt majoritaire de phénanthrène (supérieur à 10 µg/kg) puis de naphthalène (environ 4 µg/kg), de fluoranthène (autour de 2 µg/kg), de pyrène et de fluorène (de l'ordre de 1 µg/kg). Le profil en hydrocarbures aromatiques émis est dépendant du combustible utilisé mais également des taux d'humidité et d'oxygène. Une étude plus large menée avec différentes essences de bois ainsi que des taux d'humidité et des apports en oxygène variables permettrait de mieux connaître l'influence de chacun de ces 3 paramètres sur le profil en hydrocarbures aromatiques émis au cours de la combustion.

L'exposition aux émissions issues de la combustion de bois de tilleul engendre une représentation plus importante des HAP légers ($MM < 228$ g/mol) que des HAP lourds. La prédominance des HAP légers est cohérente avec les données issues de la littérature, indiquant que les matières végétales brûlent à de faibles températures, ce qui engendre principalement la production des composés de faibles masses moléculaires.

Lors de l'exposition aux fumées de combustion de bois de tilleul, les HAP et les BTEX sont principalement retrouvés au niveau de la peau des pommes. L'épiderme, qui est une barrière de protection lipophile pour le fruit, permet donc l'adsorption des hydrocarbures aromatiques hydrophobes mais limite également leur transfert vers le mésocarpe. Dans la littérature, aucune donnée n'a pu être trouvée sur le devenir des hydrocarbures aromatiques dans les fruits. Le métabolisme, les voies de dégradations, les métabolites formés ainsi que leur

éventuelle accumulation au niveau de la peau ou de la chair des fruits restent donc des pistes à explorer.

Valorisation

Publications

1 Revue acceptée

Paris A, Ledauphin J, Poinot P, Gaillard JL. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables: Origin, analysis, and occurrence. *Environmental Pollution*, Volume 234, March 2018, Pages 96-106 (**impact facteur 5.099**)

1 Article accepté le 29 décembre 2017

Paris A, Ledauphin J, Lopez C, Hennequin D, Gaillard JL. Trace Amount Determination of Monocyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fruits: Extraction and Analytical Approaches. *Journal of Food Composition and Analysis* (**impact facteur 2.752**)

2 articles en cours de rédaction

Participation à des congrès

Communication orale : International Conference Series on Environmental & Food Monitoring ISEAC39 – Hambourg (Allemagne) – 19-22 Juillet 2016

Communication par affichage : International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds ISPAC25 – Bordeaux, 13-17 Septembre 2015

Communication par affichage : Forum annuel de la Société Française de Toxicologie Génétique, Génotoxicité : Exposition, Evaluation des risques et Effets sur la santé SFTG – Caen 2-3 Juillet, 2015

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdel-Rehim, M., 2011. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 701, 119-128.

Abdel-Rehim, M., 2004. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 801, 317-321.

Abdel-Rehim, M., 2010. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2569-2580.

Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25, 107-123.

Abdul, S.A., Gibson, T.L., Rai D.N., 1987. Statistical correlations for predicting the partition coefficient for nonpolar organic contaminants between aquifer organic carbon and water. *Hazardous Waste and Hazardous Materials*, 4(3), 211-222.

Abou-Arab, A.A.K., Abou-Donia, M.A.M., El-Dars, F.M.S.E., Ali, O.I.M., Hossam, A.G., 2014. Levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in some Egyptian vegetables and fruits and their influences by some treatments. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 277-293.

Adekunle, A.S., Oyekunle, J.A.O., Ojo, O.S., Maxakato, N.W., Olutona, G.O., Obisesan, O.R., 2017. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon levels of groundwater in Ife north local government area of Osun state, Nigeria. *Toxicology Reports*, 4, 39-48.

ADEME, 2009. Evaluation prospective 2020-2050 de la contribution du secteur biomasse énergie aux émissions nationales de polluants atmosphériques. *Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*.

ADEME, Que faire de ses déchets de jardin ?, <http://ecocitoyens.ademe.fr/mes-loisirs/jardinage/que-faire-de-ses-dechets-de-jardin>

Afssa, 2003. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'avis sur l'évaluation des risques présentés par le benzo(a)pyrène (B(a)P) et par d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), présents dans diverses denrées ou dans certaines huiles végétales, ainsi que sur les niveaux de concentration en HAP dans les denrées au-delà desquels des problèmes de santé risquent de se poser. *Saisine n° 2000-SA-0005*.

Agreste, 2006. Carottes, poireaux, navets, en vedette dans une production diversifiée et très localisée. *La filière «légumes frais» en 2006, Données Agreste Basse-Normandie*.

Agreste (Source Agreste), France AgriMer. La pomme en 2014-2015, Bilan de campagne. *Réseau des nouvelles des marchés*.

Agreste, 2014. Une publication de la Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt, Filière cidricole. *Données Agreste Basse-Normandie, N°67 – janvier 2014*.

AIRAQ Atmo Aquitaine, 2013. Campagne de mesures : Cartographie de l'agglomération d'Agen (47), Campagne du 26 février au 26 mars 2013 et du 3 septembre au 1er octobre 2013, *Rapport n°ET/TP/14/02*.

Air PACA, 2015. Emiprox Inventaire des émissions PACA. <http://emiprox.airpaca.org/graph.php?geotyp=reg&geoid=93>.

Akpambang, V.O.E., Purcaro, G., Lajide, L., Amoo, I.A., Conte, L.S., Moret, S., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons in some Nigerian roasted plant foods. *Frontiers in Food & Nutrition Research*, 1(1), 1-5.

Alomirah, H., Al-Zenki, S., Al-Hooti, S., Zaghoul, S., Sawaya, W., Ahmed, N., Kannan, K., 2011. Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control*, 22, 2028-2035.

Alves, C.A., Lopes, D.J., Calvo, A.I., Evtugina, M., Rocha, S., Nunes, T., 2015. Emissions from light-duty diesel and gasoline in-use vehicles measured on chassis dynamometer test cycles. *Aerosol and Air Quality Research*, 15, 99-106.

Aprifel : Agence pour la Recherche et l'Information en Fruits et Légumes. <http://www.aprifel.com/fiche-nutri-produit-composition-pomme,26.html>

Armstrong, B., Tremblay, C., Baris, D., Theriault, G., 1994. Lung cancer mortality and polynuclear aromatic hydrocarbons: a case-cohort study of aluminum production workers in Arvida, Quebec, Canada. *American Journal of Epidemiology*, 139, 250-262.

Arthur, C.L., Pawliszyn, J., 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145-2148.

Ashraf, M. W., Salam, A., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in vegetables and fruits produced in Saudi Arabia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88, 543-547.

Ashraf, M.W., Taqvi, S.I.H., Solangi, A.R., Qureshi, U.A., 2013. Distribution and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in Pakistan. *Hindawi Publishing Corporation, Journal of Chemistry*, 2013, ID 873959.

ATMO Normandie, données 2008. <http://www.atmonormandie.fr/>

Azuma, H., Toyota, M., Asakawa, Y., Kawano, S., 1996. Naphthalene – A constituent of *Magnolia* flowers. *Phytochemistry*, 42(4), 999-1004.

B

Babanezhad, E., Mirabi, A., Ghodrati, R., 2012. An electropolymerized pyrrole-based coating for stir bar sorptive extraction of BTEX from water followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Chinese Journal of Chemistry*, 30, 557-562.

Bagheri, H., Babanezhad, E., Khalilian, F., 2009. An interior needle electropolymerized pyrrole-based coating for headspace solid-phase dynamic extraction. *Analytica Chimica Acta*, 634, 209-214.

Ballesteros, E., García, Sánchez, A., Ramos, M.N., 2006. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1111, 89-96.

Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C., 1999. Stir bar sorptive extraction SBSE, a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 11(10), 737-747.

- Barboni**, T., Chiamonti, N., 2010. BTEX emissions during prescribed burning in function of combustion stage and distance from flame front. *Combustion Science and Technology*, 182, 1193-1200.
- Baumard**, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J. F., Burgeot, T., Michel, X., Bellocq, J., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research* 47, 415-439.
- Belding**, R.D., Blankenship, S.M., Young, E., Leidy, R.B., 1998. Composition and variability of epicular waxes in apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(3), 348-356.
- Benet**, I., Guàrdia, M.D., Ibañez, C., Solà, J., Arnau, J., Roura, E., 2015. Analysis of SPME or SBSE extracted volatile compounds from cooked cured pork ham differing in intramuscular fat profiles. *Food Science and Technology*, 60, 393-399.
- Bianchin**, J.N., Nardini, G., Merib, J., Dias, A.N., Martendal, E., Carasek, E., 2012. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure. *Journal of Chromatography A*, 1233, 22-29.
- Bishnoi**, N.R., Mehta, U., Pandit, G.G., 2006. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables using high performance liquid chromatography. *Indian Journal of Chemical Technology*, 13, 30-35.
- Blot**, W.J., Morris, B.L., Pottern, L.M., Stone, B.J., Fraumeni, J.F., 1983. Lung cancer among long-term steel workers. *American Journal of Epidemiology*, 117(6), 706-716.
- Boardman**, W.W., 1915. Benzene treatment of leukemia. *California State Journal of Medicine*, 13(9), 348-355.
- Bodzek**, D., Luks-Betlej, K., Warzecha, L., 1993. Determination of particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air samples from the Upper Silesia region of Poland. *Atmospheric Environment*, 27A(5), 759-764.
- Bojko**, B., Cudjoe, E., Gómez-Ríos, G.A., Gorynski, K., Jiang, R., Reyes-Garcés, N., Risticovic, S., Silva, E. A. S., Togunde, O., Vuckovic, D., Pawliszyn, J., 2012. SPME – Quo vadis?, *Analytica Chimica Acta*
- Bouayed**, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A.K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G., Soulimani, R., 2009. Effects of lactational exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology*, 259, 97-106.
- Brahem**, M., Renard, C.M.G.C., Gouble, B., Bureau, S., Le Bourvellec, C., 2017. Characterization of tissue specific differences in cell wall polysaccharides of ripe and overripe pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, 156, 152-164.
- Bringe**, K., Schumacher, C.F.A., Schmitz-Eiberger, M., Steiner, U., Oerke, E.C., 2006. Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. *Phytochemistry*, 67, 161-170.
- Britt**, P.F., Buchanan, A.C., Kidder, M.K., Owens, C.V., 2003. Influence of steroid structure on the pyrolytic formation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 66, 71-95.
- Brune**, H., Deutsch-Wenzel, R.P., Habs, M., Ivankovic, S., Schmährl, D., 1981. Investigation of the tumorigenic response to benzo(a)pyrene in aqueous caffeine solution applied orally to Sprague-Dawley rats. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 102, 153-157.

Brunk, B.K., Jirka, G.H., Lion, L.W., 1997. Effects of salinity changes and the formation of dissolved organic matter coatings on the sorption of phenanthrene: implications for pollutant trapping in estuaries. *Environmental Science and Technology*, 31, 119-125.

Buckley, T.J., Lioy, P.J., 1992. An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene. *British Journal of Industrial Medicine*, 49, 113-124.

Burken, J.G., Schnoor, J.L., 1998. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology*, 32, 3379-3385.

Burkhardt, M.R., Zaugg, S.D., Burbank, T.L., Olson, M.C., Iverson, J.L., 2005. Pressurized liquid extraction using water/isopropanol coupled with solid-phase extraction cleanup for semivolatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and alkylated PAH homolog groups in sediment. *Analytica Chimica Acta*, 549, 104-116.

C

Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M. H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology*, 79, 257-267.

Camargo, M.C.R., Toledo, M.C.F., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, 14, 49-53.

Campos-Candel, A., Llobat-Estellés, M., Mauri-Aucejo, A., 2009. Comparative evaluation of liquid chromatography versus gas chromatography using a β -cyclodextrin stationary phase for the determination of BTEX in occupational environments. *Talanta*, 78, 1286-1292.

Cavalcante, R.M., de Andrade, M.V.F., Marins, R.V., Oliveira, L.D.M., 2010. Development of a headspace-gas chromatography (HS-GC-PID-FID) method for the determination of VOCs in environmental aqueous matrices: Optimization, verification and elimination of matrix effect and VOC distribution on the Fortaleza Coast, Brazil. *Microchemical Journal*, 96, 337-343.

Cavalcante, R.M., Sousa, F.W., Nascimento, R.F., Silveira, E.R., Freire, G.S.S., 2009. The impact of urbanization on tropical mangroves (Fortaleza, Brazil): Evidence from PAH distribution in sediments. *Journal of Environmental Management*, 91, 328-335.

Chambre d'Agriculture Normandie, 2017. La filière cidricole en Normandie. Panorama de l'agriculture et de l'agroalimentaire. *Agricultures & Territoires, Chambre d'agriculture Normandie*, 14, 49-52.

Chau, N., Bertrand, J.P., Mur, J.M., Figueredo, A., Patris, A., Moulin, J.J., Pham, Q.T., 1993. Mortality in retired coke oven plant workers. *British Journal of Industrial Medicine*, 50, 127-135.

Chen, B., Li, Y., Guo, Y., Zhu, L., Schnoor, J.L., 2008. Role of the extractable lipids and polymeric lipids in sorption of organic contaminants onto plant cuticles. *Environmental Science and Technology*, 42, 1517-1523.

Chen, B.H., Chen, Y.C., 2001. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the smoke from heated model lipids and food lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5238-5243.

Chen, B.H., Lin, Y.S., 1997. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons during processing of duck meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1394-1403.

- Chen, J.**, Henderson, G., Grimm, C.C., Lloyd, S.W., Laine, R.A., 1998. Termites fumigate their nests with naphthalene. *Nature*, 392, 558-559.
- Chevron Cottin, N.**, Merlin, G., 2007. Study of pyrene biodegradation capacity in two types of solid media. *Science of the Total Environment*, 380, 116-123.
- Chiou, C.T.**, Sheng, G., Manes, M., 2001. A partition-limited model for the plant uptake of organic contaminants from soil and water. *Environmental Science and Technology*, 35, 1437-1444.
- Christofolletti Mazzeo, D.E.**, Levy, C.E., de Franceschi de Angelis, D., Marin-Morales, M.A., 2010. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the Total Environment*, 408, 4334-4340.
- CIDREF.** <http://www.cidref.fr/des-arbres-et-des-pommes-/les-varietes-de-pommes>
- Ciganek, M.**, Neca, J., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons in porcine and bovine organs and tissues. *Veterinarni Medicina*, 51(5), 239-247.
- Coelho, E.**, Ferreira, C., Almeida, C.M.M., 2008. Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons by SPME-GC-FID in environmental and tap waters. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(6), 1084-1097.
- Costera, A.**, Feidt, C., Dziurla, M.A., Monteau, F., Le Bizec, B., Rychen, G., 2009. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil and hay matrices in lactating goats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5352-5357.
- Crépineau, C.**, Rychen, G., Feidt, C., Le Roux, Y., Lichtfouse, E., Laurent, F., 2003. Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4841-4845.
- Crépineau-Ducoulombier, C.**, Rychen, G., 2003. Assessment of soil and grass Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) contamination levels in agricultural fields located near a motorway and an airport. *Agronomie*, 23, 345-348.
- Cruz-Hernández, A.**, Tomasini-Campocoso, A., Pérez-Flores, L.J., Fernández-Perrino, F.J., Gutiérrez-Rojas, M., 2013. Inoculation of seed-borne fungus in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* promotes hydrocarbon removal and pyrene accumulation in roots. *Plant Soil*, 362, 261-270.
- Cunningham, S.D.**, Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, 56, 55-114.
- Curtis, L.**, Rea, W., Smith-Willis, P., Fenyves, E., Pan, Y., 2006. Adverse health effects of outdoor air pollutants. *Environment International*, 32, 815-830.
- Cypres, R.**, Bettens, B., 1975. La formation de la plupart des composés aromatiques produits lors de la pyrolyse du phénol, ne fait pas intervenir le carbone porteur de la fonction hydroxyle. *Tetrahedron Pergamon Press*, 31, 359-365.

D

- Dégremont, C.**, Cachot, J., 2009. La Génotoxicité Quel risque pour les espèces aquatiques ?. *Fascicules Seine-Aval 2.2*

De La Torre-Roche, R.J., Lee, W.Y., Campos-Díaz, S.I., 2009. Soil-borne polycyclic aromatic hydrocarbons in El Paso, Texas: analysis of a potential problem in the United States/Mexico border region. *Journal of Hazardous Materials* 163, 946-958.

Desaules, A., Ammann, S., Blum, F., Brändli, R.C., Bucheli, T.D., Keller, A., 2008. Monitoring PAH and PCB in soils of Switzerland—status and critical review. *Journal of Environmental Monitoring*, 10, 1265–1277.

De Torres, C., Diaz-Maroto, M.C., Hermosin-Gutierrez, I., Perez-Coello, M.S., 2010. Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta*, 660, 177-182.

Diaf, N., Bouchaour, M., Merad, L., Benyoucef, B., 2003. Paramètres influençant la dispersion des polluants gazeux. *Rev. Energ. Ren.: ICPWE*, 139-142.

Domeño, C., Blasco, M., Sánchez, C., Nerín, C., 2006. A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used as biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods. *Analytica Chimica Acta*, 569, 103–112.

Doong, R.A., Chang, S.M., Sun, Y.C., 2000. Solid-phase microextraction for determining the distribution of sixteen US Environmental Protection Agency polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*, 879, 177–188.

Du, W., Lei, C., Zhang, S., Bai, G., Zhou, H. (2014). Determination of clenbuterol from pork samples using surface molecularly imprinted polymers as the selective sorbents for microextraction in packed syringe. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91, 160-168.

Dukaj, A., Shkurta, B., Nuro, A., 2015. Determination of MTBE, TBA, BTEX and PAH in sediment and water samples of Karavasta lagoon. *Journal of International Environmental Application & Science*, 10(2), 162-167.

E

EFSA, 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal*, 724, 1-114.

El-Baqqali, A., Kussak, A., Abdel-Rehim, M., 2006. Fast and sensitive environmental analysis utilizing microextraction in packed syringe online with gas chromatography-mass spectrometry Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Chromatography A*, 1114, 234-238.

Elichegaray, C., Bouallala, S., Maitre, A., Ba, M., 2010. État et évolution de la pollution atmosphérique. *Revue française d'allergologie*, 50, 381–393.

Esteve, W., Budzinski, H., Villenave, E., 2004. Relative rate constants for the heterogeneous reactions of OH, NO₂ and NO radicals with polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on carbonaceous particles. Part 1: PAHs adsorbed on 1–2 mm calibrated graphite particles. *Atmospheric Environment*, 38, 6063-6072.

Ezquerro, Ó., Ortiz, G., Pons, B., Tena, M.T., 2004. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1035, 17-22.

F

Farré, M., Kantiani, L., Petrovic, M., Pérez, S., Barceló, D., 2012. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. *Journal of Chromatography A*, 1259, 86-99.

- Fernández, M., Padrón, C., Marconi, L., Ghini, S., Colombo, R., Sabatini, A. G., Girotti, S., 2001.** Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 922, 257–265.
- Ferro, A.M., Sims, R.C., Bugbee, B., 1994.** Hycrest crested wheatgrass accelerates the degradation of pentachlorophenol in soil. *Journal of Environmental Quality*, 23, 272-279.
- Fleming-Jones, M.E., Smith, R.E. (2003).** Volatile organic compounds in foods: a five year study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8120-8127.
- Filipkowska, A., Lubecki, L., Kowalewska, G., 2005.** Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment. *Analytica Chimica Acta*, 547, 243-254.
- Fimes, J., Schwartz, C., Perrin-Ganier, C., Morel, J.L., Charissou, A.M., Jourdain, M.J., 2004.** Risk of contamination for edible vegetables growing on soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 24, 827–836.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations.** <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- Formation en Biologie Végétale.** <https://www.biologievegetale.be/index.php?rub=principaux-phylums-vegetaux&pg=les-angiospermes&spg=a5-les-fruits>.
- France AgriMer, 2013.** Comité Cidre Le marché du cidre 12 décembre 2013.
- Francis, G.W., Christy, A.A., Øygarden, J., 2012.** Pyrolytic formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from sesquiterpenes. *Food Chemistry*, 135, 1316–1322.
- Fraser, M.P., Cass, G.R., Rasmussen, R.A., 1998.** Air quality model evaluation data for organics. 5. C6-C22 nonpolar and semipolar aromatic compounds. *Environmental Science & Technology*, 32, 1760-1770.
- Fu, S., Fan, J., Hashi, Y., Chen, Z., 2012.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using online microextraction by packed solvent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 94, 152-157.

G

- Galinaro, C.A., Cardoso, D.R., Franco, D.W., 2007.** Profiles of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Brazilian Sugar Cane Spirits: Discrimination between Cachacías Produced from Nonburned and Burned Sugar Cane Crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3141-3147.
- Gao, Y., Cheng, Z., Ling, W., Huang, J., 2010.** Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. *Bioresource Technology*, 101, 6895-6901.
- Gao, Y., Zhu, L., 2004.** Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*, 55, 1169–1178.
- Ganzler, K., Salgó, A., Valkó, K., 1986.** Microwave extraction a novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*, 371, 299-306.
- Gardner, L.K., Lawrence, G.D., 1993.** Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition-metal catalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(5), 693–695.

Giacomino, A., Malandrino, M., Colombo, M.L., Miaglia, S., Maimone, P., Blancato, S., Conca, E., Abollino, O., 2016. Metal content in dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves: influence of vehicular traffic and safety upon consumption as food. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry*, Article ID 9842987, 9 pages.

Gilbert-López, B., Robles-Molina, J., García-Reyes, J.F., & Molina-Díaz, A. (2010). Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS). *Talanta*, 83, 391-399.

Godschalk, R.W.L., Moonen, E.J.C., Schilderman, P.A.E.L., Broekmans, W.M.R., Kleinjans, J.C.S., Van Schooten, F.J., 2000. Exposure-route-dependant DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis 1(1)*, 87-92.

Gómez-Ruiz, J.A., Cordeiro, F., López, P., Wenzl, T., 2009a. Optimisation and validation of programmed temperature vaporization (PTV) injection in solvent vent mode for the analysis of the 15 + 1 EU-priority PAHs by GC-MS. *Talanta*, 80, 643-650.

Gómez-Ruiz, J.A., Wenzl, T., 2009b. Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15 + 1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 1697-1707.

González-Piñuela, C., Alonso-Salces, R.M., Andrés, A., Ortiz, I., Viguri, J.R. 2006. Validated analytical strategy for the determination of polycyclic aromatic compounds in marine sediments by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1129, 189-200.

Górna-Binkul, A., Buszewski, B., 1997. Volatile Organic Air Contaminants in Plants Comparative Investigations of Toluene Sorption in Fruit and Chemically Modified Adsorbents. *Environmental Science and Pollution Research*, 4, 125-129.

Górna-Binkul, A., Kaczmarski, K., Buszewski, B., 2001. Modeling of the Sorption and Diffusion Processes of Volatile Organic Air Pollutants in Grape Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2889-2893.

Górna-Binkul, A., Keymeulen, R., Van Langenhove, H., Buszewski, B., 1996. Determination of monocyclic aromatic hydrocarbons in fruit and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 734, 297-302.

Grova, N., Rychen, G., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., 2006. Effect of oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on goat's milk contamination. *Agronomy for Sustainable Development*, 26, 195-199.

Guidotti, M., Stella, D., Owczarek, M., De Marco, A., De Simone, C., 2003. Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *Journal of Chromatography A*, 985, 185-190.

Guillén, M.D., Goicoechea, A., Palencia, G., Cosmes, N., 2008. Evidence of the formation of light polycyclic aromatic hydrocarbons during the oxidation of edible oils in closed containers at room temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2028-2033.

H

Haider, W., Barillier, D., Hayat, A., Gaillard, J.L., Ledauphin, J., 2014. Rapid quantification and comparison of major volatile compounds of ciders from France (Normandy and Brittany) using microextraction by packed sorbent (MEPS). *Analytical Methods*, 6, 1364-1376.

Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D., 1995. Xylene. Exploring QSAR hydrophobic, electronic, and steric constants. *Washington, DC: American Chemical Society*, 43.

- Hauser, B., Popp, P., 2001.** Membrane-assisted solvent extraction of organochlorine compounds in combination with large-volume injection/gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Separation Science*, 24, 551-560.
- Hauser, B., Popp, P., Kleine-Benne, E., 2002.** Membrane-assisted solvent extraction of triazines and other semi-volatile contaminants directly coupled to large-volume injection/GC-MS. *Global Analytical Solutions*, 12, 1-7.
- Hautala, E.L., Rekilä, R., Tarhanen, J., Ruuskanen, J., 1995.** Deposition of motor vehicle emissions and winter maintenance along roadside assessed by snow analyses. *Environmental Pollution*, 87, 45-49.
- Hawthorne, S.B., Miller, D.J., 2003.** Evidence for very tight sequestration of BTEX compounds in manufactured gas plant soils based on selective supercritical fluid extraction and soil/water partitioning. *Environ Sci Technol*, 37, 3587-3594.
- Hayen, H., Karst, U., 2003.** Strategies for the liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of non-polar compounds. *Journal of Chromatography A*, 1000, 549-565.
- Helaleh, M.I.H., Al-Omair, A., Nisar, A., Gevao, B., 2005.** Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1083, 153–160.
- Hollender, J., Koch, B., Lutermann, C., Dott, W., 2003.** Efficiency of different methods and solvents for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 83, 21-32.
- Houessou, J.K., Benac, C., Delteil, C., Camel, V., 2005.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew using solid-phase extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 871-879.
- Huff, J.E., Haseman, J.K., DeMarini, D.M., Eustis, S., Maronpot, R.R., Peters, A.C., Persing, R.L., Chrisp, C.E., Jacobs, A.C., 1989.** Multiple-Site Carcinogenicity of Benzene in Fischer 344 Rats and B6C3F1 Mice. *Environmental Health Perspectives*, 82, 125-163.

I

- IARC, 2000.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Industrial Chemicals. *World Health Organization, Volume 77*.
- Ifremer environnement.** HAP Hydrocarbures polyaromatiques. <http://envlit.ifremer.fr/infos/glossaire/h/hap>.
- Inam, E., Ibanga, F., Essien, J., 2016.** Bioaccumulation and cancer risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in leafy vegetables grown in soils within automobile repair complex and environ in Uyo, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(681), 1-9.
- INERIS, 2004.** Exposition par inhalation au benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes (BTEX) dans l'air Sources, mesures et concentrations. *Rapport d'étude N°INERIS-DRC-04-56770-AIRE-n°1056-IZd du 21/12/2004*.
- INERIS 2011.** Facteurs d'émission de polluants de feux simulés de déchets et de produits issus de la biomasse. *Rapport d'étude N°DRC-11-118389-04583A du 12/04/2011*.

INERIS, 2005. Hydrocarbures aromatiques polycycliques Guide méthodologique Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. *Rapport d'étude N°66244 - DESP - R01*.

INRS FT 204, 2007. Fiche toxicologique, Naphtalène.

Insee, 2014. Caen : <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2011101?geo=COM-14118>.

Insee, 2014. Cherbourg : <https://www.insee.fr/fr/statistiques/1405599?geo=COM-50129>.

J

Jánská, M., Hajšlová, J., Tomaniová, M., Kocourek, V., Vavrova, M., 2006. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fruits and Vegetables Grown in the Czech Republic. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77, 492–499.

Jie, F., Kai-Xiong, W., 2007. Multiresidual Analysis of Organochlorine Pesticides, Polychlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Shellfishes by Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 35, 1607–1613.

Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133, 71-84.

Johnson, E.S., Langård, S., Lin, Y.S., 2007. A critique of benzene exposure in the general population., *Science of the Total Environment*, 374, 183–198.

Ju, Z., Bramlage, W.J., 2001. Developmental changes of cuticular constituents and their association with ethylene during fruit ripening in 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 21, 257–263.

K

Kafilzadeh, F., 2015. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments of the Soltan Abad River, Iran. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41, 227-231.

Kang, H.G., Jeong, S.H., 2011. 1-OH-Pyrene and 3-OH-Phenanthrene in urine show good relationship with their parent polycyclic aromatic hydrocarbons in muscle in dairy cattle. *Toxicological Research*, 27(1), 15-18.

Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J., 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 35-62.

Katsoyiannis, A., Terzi, E., Cai, Q.Y., 2007. On the use of PAH molecular diagnostic ratios in sewage sludge for the understanding of the PAH sources. Is this use appropriate?. *Chemosphere* 69, 1337-1339.

Kevan, P.G., 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74, 373–393.

Kim, B.M., 1984. Membrane-based solvent extraction for selective removal and recovery of metals. *Journal of Membrane Science*, 21, 5-19.

Kim, K.H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60, 71-80.

King, A.J., Readman, J.W., Zhou, J.L., 2003. The application of solid-phase micro-extraction (SPME) to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environmental Geochemistry and Health*, 25, 69-75.

Kipopoulou, A.M., Manoli, E., Samara, C., 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environmental Pollution*, 106, 369-380.

Kislov, V.V., Sadovnikov, A.I., Mebel, A.M., 2013. Formation mechanism of polycyclic aromatic hydrocarbons beyond the second aromatic ring. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117, 4794-4816.

Kiss, G., Varga-Puchony, Z., Rohrbacher, G., Hlavay, J., 1998. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons on atmospheric aerosol particles of different sizes. *Atmospheric Research*, 46, 253-261.

Knutzen, J., Sortlan, B., 1982. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in some algae and invertebrates from moderately polluted parts of the coast of Norway. *Water Research*, 16, 421-428.

Krauss, M., Wilcke, W., Martius, C., Bandeira, A.G., Garcia, M.V.B., Amelung, W., 2005. Atmospheric versus biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a tropical rain forest environment. *Environmental Pollution*, 135, 143-154.

Kumke, M.U., Löhmannsröben, H.G., Roch, T., 1995. Fluorescence spectroscopy of polynuclear aromatic compounds in environmental monitoring. *Journal of Fluorescence*, 5(2), 139-153.

L

Lambert, O., Veyrand, B., Durand, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Delbac, F., Pouliquen, H., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere*, 86, 98-104.

Lambropoulou, D.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2007. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. *Journal of Chromatography A*, 1152, 70-96.

Lan, Q., Zhang, L., Li, G., Vermeulen, R., Weinberg, R.S., Dosemeci, M., Rappaport, S.M., Shen, M., Alter, B.P., Wu, Y., Kopp, W., Waidyanatha, S., Rabkin, C., Guo, W., Chanock, S., Hayes, R.B., Linet, M., Kim, S., Yin, S., Rothman, N., Smith, M. T., 2004. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*, 306(5702), 1774-1776.

Landahl, J.T., McCain, B.B., Myers, M.S., Rhodes, L.D., Brown, D.W., 1990. Consistent associations between hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) and polycyclic aromatic hydrocarbons in bottom sediment. *Environmental Health Perspectives*, 89, 195-203.

Lane, D., Jenkins, S.W.D., 1984. 9th International Symposium on Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Columbus, OH, *Abstracts* 437.

Lei, F.F., Huang, J.Y., Zhang, X.N., Liu, X.J., Li, X.J., 2011. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vegetables by Headspace SPME-GC. *Chromatographia*, 74, 99-107.

Li, Y., Chen, B., 2009. Phenanthrene sorption by fruit cuticles and potato periderm with different compositional characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 637-644.

Li, Y.T., Li, F.B., Chen, J.J., Yang, G.Y., Wan, H.F., Zhang, T.B., Zeng, X.D., Liu, J.M., 2008. The concentrations, distribution and sources of PAHs in agricultural soils and vegetables from Shunde, Guangdong, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 139, 61-76.

Li, X., Zhong, M., Xu, S., Sun, C., 2006. Determination of phthalates in water samples using polyaniline-based solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1135, 101-108.

Lin, D., Zhu, L., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons: pollution and source analysis of a black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8268-8271.

Liste, H.H., Alexander, M., 2000. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*, 40, 7-10.

Low, G.K.C., Batley, G.E., Lidgard, R.O., Duffieldt, A.M., 1986. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coal fly ash using gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 13, 95-104.

Lutz, S., Feidt, C., Monteau, F., Rychen, G., Le Bizec, B., Jurianz, S., 2006. Effect of exposure to soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parent compounds and their monohydroxylated metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 263-268.

M

Mabey, W.R., Smith, J.H., Podoll, R.T., Johnson, H.L., Mill, T., Chou, T.W., Gates, J., Waight P.I., Jaber, H., Vandenberg, D., 1982. Aquatic fate process data for organic priority pollutants. *United States Environmental Protection Agency, report 440/4-81-014, section 3.8, 297-354.*

Machado, A.M.R., Cardoso, M.G., Dórea, H.S., Emídio, E.S., Silva, M.M.S., dos Anjos, J.P., Saczk, A.A., Nelson, D.L., 2014. Contamination of cachaça by PAHs from storage containers. *Food Chemistry*, 146, 65-70.

Maltoni, C., Ciliberti, A., Cotti, G., Conti, B., Belpoggi, F., 1989. Benzene, an experimental multipotential carcinogen: results of the long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. *Environmental Health Perspectives*, 82, 109-124.

March, J.G., Moukhchan, F., Cerdà, V., 2011. Application of in-vial membrane assisted solvent extraction to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 685, 132-137.

Martí-Cid, R., Bocio, A., Llobet, J.M., Domingo, J.L., 2007. Intake of chemical contaminants through fish and seafood consumption by children of Catalonia, Spain: Health risks. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1968-1974.

Martí-Cid, R., Llobet, J. M., Castell, V., Domingo, J.L., 2008. Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3163-3171.

Martínez-Moral, M.P., Tena, M.T., 2014. Use of microextraction by packed sorbents following selective pressurized liquid extraction for the determination of brominated diphenyl ethers in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1364, 28-35.

Martorell, I., Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J.M., Domingo, J.L., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. *Environment International*, 36, 424-432.

May, W.E., Wasik, S.P., Freeman, D.H., 1978. Determination of the solubility behavior of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Analytical Chemistry*, 50(7), 997-1000.

- Medeiros, V.R.,** Canfyn, M., De Meulenaer, B., de Schaetzen, T., Van Overmeire, I., De Beer, J., Van Loco, J., 2010. Determination of benzene in different food matrices by distillation and isotope dilution HS-GC/MS. *Analytica Chimica Acta*, 672, 124–129.
- Medeiros, V.R.,** De Meulenaer, B., Andjelkovic, M., Canfyn, M., Van Overmeire, I., Van Loco, J., 2011. Factors Influencing Benzene Formation from the Decarboxylation of Benzoate in Liquid Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12975–12981.
- Medeiros, V.R.,** Jacxsens, L., Van Loco, J., Matsiko, E., Lachat, C., de Schaetzen, T., Canfyn, M., Van Overmeire, I., Kolsteren, P., De Meulenaer, B., 2012. Assessment of human exposure to benzene through foods from the Belgian market. *Chemosphere*, 88, 1001-1007.
- Medunić, G.,** Šmit, Z., 2015. Organic micropollutants in the Sava and Bosna river overbank and floodplain sediments during the May through June 2014 catastrophic flood. *The Mining-Geology-Petroleum Engineering Bulletin*, 45-52.
- Menéndez, J.C.F.,** Sánchez, M.L.F., Uría, J.E.S., Martínez, E.F., Sanz-Medel, A., 2000. Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 415, 9-20.
- Menzie, C.A.,** Potocki, B.B., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology*, 26, 1278-1284.
- Mercolini, L.,** Mandrioli, R., Raggi, M. A., 2012. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. *Journal of Pineal Research*, 53, 21-28.
- Mercolini, L.,** Protti, M., Saracino, M. A., Mandrone, M., Antognoni, F., Poli, F., 2015. Analytical profiling of bioactive phenolic compounds in argan (*Argania spinosa*) leaves by combined microextraction by packed sorbent (MEPS) and LC-DAD-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, 27, 41-49.
- Meyer, B.,** Pailler, J.Y., Guignard, C., Hoffmann, L., Krein, A., 2011. Concentrations of dissolved herbicides and pharmaceuticals in a small river in Luxembourg. *Environmental Monitoring and Assessment*, 180, 127–146
- Miguel, A.H.,** Kirchstetter, T.W., Harley, R.A., 1998. On-road emissions of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon from gasoline and diesel vehicles. *Environmental Science and Technology*, 32, 450-455.
- Miyaguchi, H.,** Iwata, Y. T., Kanamori, T., Tsujikawa, K., Kuwayama, K., Inoue, H., 2009. Rapid identification and quantification of methamphetamine and amphetamine in hair by gas chromatography/mass spectrometry coupled with micropulverized extraction, aqueous acetylation and microextraction by packed sorbent. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4063-4070.
- Mo, C.H.,** Cai, Q.Y., Tang, S.R., Zeng, Q.Y., Wu, Q.T., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalic acid esters in vegetables from nine farms of the Pearl River delta, south China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 181-189.
- Moret, S.,** Conte, L.S., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *Journal of Chromatography A*, 882, 245–253.
- Mottier, P.,** Parisod, V., Turesky, R. J., 2000. Quantitative Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Barbecued Meat Sausages by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1160-1166.

Murphy, P.P., Bates, T.S., Curl, H.C., Feely, R.A., Burger, R.S., 1998. The transport and fate of particulate hydrocarbons in an urban Fjord-like estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 27, 461-482.

N

Nam, J.J., Thomas, G.O., Jaward, F.M., Steinnes, E., Gustafsson, O., Jones K.C., 2008. PAHs in background soils from Western Europe: Influence of atmospheric deposition and soil organic matter. *Chemosphere*, 70, 1596-1602.

Ngabe, B., Bidleman, T.F., Scott, G.I., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in storm runoff from urban and coastal South Carolina. *The Science of the Total Environment*, 255, 1-9.

Nieuwenhuizen, N.J., Green, S.A., Chen, X., Bailleul, E.J.D., Matich, A.J., Wang, M.Y., Atkinson, R.G, 2013. Functional genomics reveals that a compact terpene synthase gene family can account for terpene volatile production in apple. *Plant Physiology*, 161, 787-804.

NIH: National Institutes of Health, U.S. National Library of Medicine, Specialized Information Services, Web Wireless Information System for Emergency Responders, <https://webwiser.nlm.nih.gov/>.

Nisbet, I.C.T., Lagoy, P.K., 1992. Toxic Equivalency Factors (TEFs) for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 16, 290-300.

Niu, J., Sun, P., Schramm, K.W., 2007. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with fly ash particles under simulated sunlight irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 186, 93-98.

Norlock, F.M., Jang, J.K., Zou, Q., Schoonover, T.M., Li, A., 2002. Large-volume injection PTV-GC-MS analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in air and sediment samples. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 52, 19-26.

Nultsch, W., 1998. Botanique générale. Editeur : De Boeck université Stuttgart, Thieme Verlag.

Nyer, E.K., Gatliff, E.G., 1996. Phytoremediation. *Ground Water Monitoring Remediation*, 16, 58-62.

O

Oanh, N.T.K., Reutergårdh, L.B., Dung, N.T., 1999. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and particulate matter from domestic combustion of selected fuels. *Environmental Science & Technology*, 33, 2703-2709.

Okona-Mensah, K.B., Battershill, J., Boobis, A., Fielder, R., 2005. An approach to investigating the importance of high potency polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the induction of lung cancer by air pollution. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1103-1116.

Olsson, M., Kjällstrand, J., 2006. Low emissions from wood burning in an ecolabelled residential boiler. *Atmospheric Environment*, 40, 1148-1158.

Olsson, P., Sadiktsis, I., Holmbäck, J., Westerholm, R., 2014. Class separation of lipids and polycyclic aromatic hydrocarbons in normal phase high performance liquid chromatography – A prospect for analysis of aromatics in edible vegetable oils and biodiesel exhaust particulates. *Journal of Chromatography A*, 1360, 39-46.

OSPAR, 2000. Quality Status Report 2000 for the North-East Atlantic. *OSPAR Commission, London, Chapter 4 Chemistry*, 54-78.

Ounnas, F., Jurjanz, S., Dziurla, M.A., Guiavarc'h, Y., Feidt, C., Rychen, G., 2009. Relative bioavailability of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in goats. *Chemosphere*, 77, 115–122.

P

Paredes, R.M.G., Pinto, C.G., Pavón, J.L.P., Cordero, B.M., 2014. *In situ* derivatization combined to automated microextraction by packed sorbents for the determination of chlorophenols in soil samples by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1359, 52–59.

Pena-Abaurrea, M., Ye, F., Blasco, J., Ramos, L., 2012. Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight-mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A*, 1256, 222–231.

Peñalver, A., Pocurull, E., Borrull, F., Marcé, R.M., 1999. Trends in Solid-Phase Microextraction for Determining Organic Pollutants in Environmental Samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 18(8), 557–568.

Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J. M., Domingo, J. L., 2009. Concentrations of Polybrominated Diphenyl Ethers, Hexachlorobenzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Various Foodstuffs Before and After Cooking. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 709–715.

Pirali, O., Van-Oanh, N.T., Parneix, P., Vervloet, M., Bréchnignac, P., 2006. Far-infrared spectroscopy of small polycyclic aromatic hydrocarbons. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8, 3707–3714.

Planetoscope, 2012. <http://www.planetoscope.com/fruits-legumes/391-production-de-pommes-en-france.html>

Plaza-Bolaños, P., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6303–6326.

Pointot, P., Qin, F., Lemoine, M., Yvon, V., Ledauphin, J., Gaillard, J.L., 2014. Study of current analytical strategies for the dual investigation of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in apples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35, 83–93.

Pointet, K., Milliet, A., 2000. PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camargue by GC/MS. *Chemosphere*, 40, 293–299.

Posada-Baquero, R., Ortega-Calvo, J.J., 2011. Recalcitrance of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil contributes to background pollution. *Environmental Pollution*, 159, 3692–3699.

Poster, D.L., Schantz, M.M., Sander, L.C., Wise, S. A., 2006. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 859–881.

Prenafeta-Boldú, F.X., Vervoort, J., Grotenhuis J.T.C., van Groenestijn, J.W., 2002. Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2660–2665.

Purcaro, G., Moret, S., Conte, L.S., 2009. Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. *Meat Science*, 81, 275–280.

Purcaro, G., Moret, S., Conte, L.S., 2013. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, 105, 292–305.

Q

Quinto, M., Amodio, P, Spadaccino, G., Centonze, D., 2012. Development of a mathematical model online microextraction by packed sorbent under equilibrium conditions and its application for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in water by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1262, 12-26.

R

Ravindra, K., Wauters, E., Van Grieken, R., 2008. Variation in particulate PAHs levels and their relation with the transboundary movement of the air masses. *Science of the Total Environment*, 396, 100-110.

Rey-Salgueiro, L., García-Falcón, M.S., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., 2008a. Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chemistry*, 108, 607-615.

Rey-Salgueiro, L., Martínez-Carballo, E., García-Falcón, M.S., Simal-Gándara, J., 2008b. Effects of a chemical company fire on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant foods. *Food Chemistry*, 108, 347-353.

Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C., 1996. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68, 1033-1039.

Ridgway, K., Lalljie, S.P.D., Smith, R.M., 2007a. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153, 36-53.

Ridgway, K., Lalljie, S.P.D., Smith, R.M., 2007b. Use of in-tube sorptive extraction techniques for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soft drinks. *Journal of Chromatography A*, 1174, 20-26.

Riddick, J.A., Bunger, W.B., 1970. Techniques of Organic Chemistry, volume 2. *Organic Solvents, Third Edition*, Wiley-Interscience, New York.

Rodil, R., Schellin, M., Popp, P., 2007. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and beverages using membrane-assisted solvent extraction in combination with large volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1163, 288-297.

Rozentale, I., Zacs, D., Perkons, I., Bartkevics, V., 2017. A comparison of gas chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry and high-resolution sector mass spectrometry for sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cereal products. *Food Chemistry*, 221, 1291-1297.

Rummel, J.L., McKenna, A.M., Marshall, A.G., Eyler, J.R., Powell, D.H., 2010. The coupling of direct analysis in real time ionization to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for ultrahigh-resolution mass analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 784-790.

S

Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, Md.P., Zakaria, Z., 1997. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 791, 361-366.

Saint-Aubert, B., Cooper, J.F., Aster, P.C., Spliliotis, J., Joyeux, H., 1992. Evaluation of the Induction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Cooking on Two Geometrically Different Types of Barbecue. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 257-263.

- Samsøe-Petersen, L.**, Larsen, E.H., Larsen, P.B., Bruun, P., 2002. Uptake of Trace Elements and PAHs by Fruit and Vegetables from Contaminated Soils. *Environmental Science & Technology*, 36, 3057-3063.
- Sánchez, M.d.N.**, Santos, P.M., Sappó, C.P., Pavón, J.L.P., Cordero, B.M., 2014. Microextraction by packed sorbent and salting-out-assisted liquid-liquid extraction for the determination of aromatic amines formed from azo dyes in textiles. *Talanta*, 119, 375-384.
- Sandra, P.**, Tienpont, B., David, F., 2003. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1000, 299–309.
- Santé Canada**, 1996. Concentrations/doses journalières admissibles et concentrations/doses tumorigènes des substances d'intérêt prioritaire calculées en fonction de critères sanitaires.
- Sanemasa, I.**, Araki, M., Deguchi, T., Nagai, H., 1982. Solubility measurements of benzene and the alkylbenzenes in water by making use of solute vapor. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 55, 1054-1062.
- Sawerysyn, J.P.**, 2012. La combustion du bois et ses impacts sur la qualité de l'air, *Air Pur N°81*.
- Sawulski, P.**, Clipson, N., Doyle, E., 2014. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. *Biodegradation*, 25, 835-847.
- Schauer, J.J.**, Kleeman, M.J., Cass, G.R., Simoneit, B.R.T., 1999. Measurement of emissions from air pollution sources. 2. C1 through C30 organic compounds from medium duty diesel trucks. *Environmental Science and Technology*, 33, 1578-1587.
- Serrano, A.**, Gallego, M., 2006. Continuous microwave-assisted extraction coupled on-line with liquid–liquid extraction: Determination of aliphatic hydrocarbons in soil and sediments. *Journal of Chromatography A*, 1104, 323–330.
- Silva, C.**, Cavaco, C., Perestrelo, R., Pereira, J., Câmara, J.S., 2014. Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Solid-Phase Microextraction (SPME) as Sample Preparation Procedures for the Metabolomic Profiling of Urine. *Metabolites*, 4, 71-97.
- Šimko, P.**, 2002. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B*, 770, 3-18.
- Simon, R.**, Gomez Ruiz, J. A., von Holst, C., Wenzl, T., Anklam, E., 2008. Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible vegetable oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1397–1408.
- SISTER**, 2010. https://sister.normandie.fr/#s=2010;l=fr;i=air_tmp.covnm_ts_sect;v=map1
- Skarphéðinsdóttir, H.**, Ericson, G., Svavarsson, J., Næs, K., 2007. DNA Adducts and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Tissue Levels in Blue Mussels (*Mytilus* spp.) from Nordic coastal sites. *Marine Environmental Research*, 64, 479–491.
- Skupińska, K.**, Misiewicz, I., Kasprzycka-Guttman, T., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta Polonica Pharmaceutica – Drug Research*, 61(3), 233-240.

Smith, K.E.C., Northcott, G.L., Jones, K.C., 2006. Influence of the extraction methodology on the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pasture vegetation. *Journal of Chromatography A*, 1116, 20–30.

Soceanu, A., Dobrinas, S., Popescu, V., 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Romanian baby foods and fruits. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 36(4), 364-375.

Soceanu, A.D., Dobrinas, S., Popescu, V., Stanciu, G., Tiberius, E.D., 2012. OCPs and PAHs distribution in different stages of tomato growing. *Environmental Engineering and Management Journal*, 11, 457-462.

Soceanu, A., Dobrinas, S., Stanciu, G., Popescu, V., 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in urban and rural areas. *Environmental Engineering and Management Journal*, 13, 2311-2315.

Song, L., Cho, D.S., Bhandari, D., Gibson, S.C., McNally, M.E., Hoffman, R.M., Cook, K.D., 2011. Liquid chromatography/dopant-assisted atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for the analysis of non-polar compounds International. *Journal of Mass Spectrometry*, 303, 173–180.

Stavric, B., Klassen, R., 1994. Dietary effects on the uptake of benzo[a]pyrene. *Food and Chemical Toxicology*, 32(8), 727-734.

T

Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A.I., 2010. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2415–2440.

Takada, K., Yoshimura, F., Ohga, Y., Kusaka, J., Daisho, Y., 2003. Experimental study on unregulated emission characteristics of turbocharged DI diesel engine with common rail fuel injection system. *SAE Technical Paper Series, No. 2003-01-3158*.

Tankiewicz, M., Morrison, C., Biziuk, M., 2013. Application and optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-flame-ionization detector (GC-FID) to determine products of the petroleum industry in aqueous samples. *Microchemical Journal*, 108, 117-123.

Thériault, G., Tremblay, C., Cordier, S., Gingars, S., 1984. Bladder cancer in the aluminium industry. *Occupational Health*, 947-950.

Ting, V.J.L., Soukoulis, C., Silcock, P., Cappellin, L., Romano, A., Aprea, E., Bremer, P.J., Märk, T.D., Gasperi, F., Biasioli, F., 2012. *In vitro* and *in vivo* flavor release from intact and fresh-cut apple in relation with genetic, textural, and physicochemical parameters. *Journal of Food Science*, 77(11), 1226-1233.

Tobiszewski, M., Namieśnik, J., 2012. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental Pollution*, 162, 110-119.

Tommasini, M., Lucotti, A., Alfè, M., Ciajolo, A., Zerbi, G., 2016. Fingerprints of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in infrared absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 152, 134-148.

Tuháčková, J., Cajthaml, T., Novák, K., Novotný, C., Mertelík, J., Šašek, V., 2001. Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environmental Pollution*, 113, 255-262.

Tuteja, G., Rout, C., Bishnoi, N.R., 2011. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in leafy and underground vegetables: a case study around Panipat city, Haryana, India. *Journal of Environmental Science and Technology*, 4, 611-620.

U

Ünlü, S., Alpar, B., 2017. Evaluation of sediment contamination by monoaromatic hydrocarbons in the coastal lagoons of Gulf of Saros, NE Aegean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 118, 442-446.

V

Valentine, J.L., Lee, S.S.T., Seaton, M.J., Asgharian, B., Farris, G., Corton, J.C., Gonzalez, F.J., Medinsky, M.A., 1996. Reduction of benzene metabolism and toxicity in mice that lack CYP2E1 expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141, 205–213.

Vanamala, J., Cobb, G., Turner, N.D., Lupton, J.R., Yoo, K.S., Pike, L.M., Patil, B.S., 2005. Bioactive compounds of grapefruit (*Citrus paradisi* Cv. Rio Red) respond differently to postharvest irradiation, storage, and freeze drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3980-3985.

Van Schooten, F.J., Jongeneelen, F.J., Hillebrand, M.J., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cell DNA and 1-hydroxypyrene in the urine from aluminum workers: relation with job category and synergistic effect of smoking. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 4, 69-77.

Van Veld, P.A., Vetter, R.D., Lee, R.F., Patton, J.S., 1987. Dietary fat inhibits the intestinal metabolism of the carcinogen benzo[a]pyrene in fish. *Journal of Lipid Research*, 28, 810-817.

Veraverbeke, E.A., Lammertyn, J., Saevels, S., Nicolai, B.M., 2001. Changes in chemical wax composition of three different apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 23, 197–208.

Verevkin, S.P., 2004. Vapor pressure measurements on fluorene and methyl-fluorenes. *Fluid Phase Equilibria*, 225, 145–152.

Veyrand, B., Brosseau, A., Sarcher, L., Varlet, V., Monteau, F., Marchand, P., Andre, F., Le Bizec, B., 2007. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *Journal of Chromatography A*, 1149, 333–344.

Veyrand, B., Sirot, V., Durand, S., Pollono, C., Marchand, P., Dervilly-Pinel, G., Tard, A., Leblanc, J.C., Le Bizec, B., 2013. Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: results of the second French total diet study. *Environment International*, 54, 11-17.

Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas, S., López-Tamames, E., 2005. Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1090, 146–154.

Viegas, O., Novo, P., Pinto, E., Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., 2012. Effect of Charcoal Types and Grilling Conditions on Formation of Heterocyclic Aromatic Amines (HAAs) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Grilled Muscle Foods. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2128–2134.

Vives, I., Grimalt, J.O., Fernández, P., Rosseland, B., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from remote and high mountain lakes in Europe and Greenland. *Science of the Total Environment*, 324, 67-77.

W

- Wang, G.**, Lee, A.S., Lewis, M., Kamath, B., Archer, R.K., 1999. Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1062-1066.
- Wang, J.**, MacNeil, J.D., Kay, J.F., 2011. Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food. *Wiley Series in Mass Spectrometry*.
- Wang, X.C.**, Zhang, Y.X., Chen, R.F., 2001. Distribution and partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different size fractions in sediments from Boston Harbor, United States. *Marine Pollution Bulletin*, 42(11), 1139-1149.
- Wang, Y.**, Tian, Z., Zhu, H., Cheng, Z., Kang, M., Luo, C., Li, J., Zhang, G., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils and vegetation near an e-waste recycling site in South China: Concentration, distribution, source, and risk assessment. *Science of the Total Environment*, 439, 187-193.
- Wania, F.**, Mackay, D., 1996. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Technology*, 30, 390-396.
- Wennrich, L.**, Popp, P., Zeibig, M., 2002. Analytical chemistry polycyclic aromatic hydrocarbon burden in fruit and vegetable species cultivated in allotments in an industrial area. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 82(10), 677-690.
- Wilson, W.B.**, Hayes, H.V., Sander, L.C., Campiglia, A.D., Wise, S.A., 2017. Normal-phase liquid chromatography retention behavior of polycyclic aromatic hydrocarbon and their methyl-substituted derivatives on an aminopropyl stationary phase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 5291-5305.
- Wittkamp, B.L.**, Tilotta, D.C., 1995. Determination of BTEX compounds in water by solid-phase microextraction and raman spectroscopy. *Anal. Chem.*, 67, 600-605.
- World Health Organization (WHO)**, 2006. Safety Evaluation of Certain Contaminants in Food, *WHO food additives series: 55, FAO Food and nutrition paper 82*.
- White, P.A.**, Robitaille, S., Rasmussen, J.B., 1999. Heritable reproductive effect of benzo[a]pyrene on the fathead minnow (*Pimephales Promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(8), 1843-1847.
- WHO. Guidelines for drinking-water quality, third edition – Chemical fact Sheets, p429
- Wordpress**, 2012. Les différents procédés d'extraction des principes actifs des plantes, <http://nathaliepirioudeslandes.wordpress.com/2012/10/18/les-differents-procedes-dextraction/>
- Wilcke, W.**, Lilienfein, J., Lima, S.C., Zech, W., 1999. Contamination of highly weathered urban soils in Uberlândia, Brazil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 162, 539-548.
- Wu, M.**, Xia, Z., Zhang, Q., Yin, J., Zhou, Y., Yang, H., 2016. Distribution and health risk assessment on dietary exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables in Nanjing, China. *Hindawi Publishing Corporation, Journal of Chemistry*, 2016, ID 1581253.

Y

- Yamaguchi, C.**, Lee, W.Y., 2010. A cost effective, sensitive, and environmentally friendly sample preparation method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6816-6823.
- Yang, L.**, Said, R., Abdel-Rehim, M. 2017. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. *Journal of Chromatography B*, 1043, 33-43.

Yang, S.Y.N., Connell, D.W., Hawker, D.W., Kayal, S.I., 1991. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in air, soil and vegetation in the vicinity of an urban roadway. *The Science of the Total Environment*, 102, 229-240.

Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S., 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, 33, 489-515.

Yurchenko, S., Mölder, U., 2005. The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 857-869.

Yusty, M.A.L., Daviña, J.L.C, 2005. Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Control*, 16, 59-64.

Z

Zhang, W., Zhang, S., Wan, C., Yue, D., Ye, Y., Wang, X., 2008. Source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban road runoff, dust, rain and canopy throughfall. *Environmental Pollution*, 153, 594-601.

Zhang, X.X., Cheng, S.P., Zhu, C.J., Sun, S.L., 2006. Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors. *Pedosphere*, 16, 555-565.

Zhang, Z., Huang, J., Yu, G., Hong, H., 2004. Occurrence of PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the Tonghui River of Beijing, China. *Environmental Pollution*, 130, 249-261.

Zhao, X., Fu, L., Hu, J., Li, J., Wang, H., Huang, C., Wang, X., 2009. Analysis of PAHs in Water and Fruit Juice Samples by DLLME Combined with LC-Fluorescence Detection, *Vieweg+Teubner / GWV Fachverlage GmbH*

Zhong, W., Wang M., 2002. Some polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables from northern China. *Journal of Environmental Science and Health*, A37(2), 287-296.

Zhou, S., Wenger, J.C., 2013. Kinetics and products of the gas-phase reactions of acenaphthylene with hydroxyl radicals, nitrate radicals and ozone. *Atmospheric Environment*, 75, 103-112.

Zohair, A., Salim, A.B., Soyibo, A.A., Beck, J.A., 2006. Residues of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides in organically-farmed vegetables. *Chemosphere*, 63, 541-553.

Zuin, V.G., Schellin, M., Montero, L., Yariwake, J.H., Augusto, F., Popp, P., 2006. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice. *Journal of Chromatography A*, 1114, 180-187.

Extractions et analyses des hydrocarbures aromatiques : Approches méthodologiques et Applications à des matrices fruitières

Résumé

Les hydrocarbures aromatiques monocycliques (BTEX) et polycycliques (HAP) sont pour la plupart reconnus pour leur toxicité *via* ingestion. Le suivi de leur contenu dans les matrices alimentaires est donc indispensable. Plusieurs approches sensibles et complémentaires ont été établies, avec la pomme comme modèle d'étude, pour la double détermination de ces hydrocarbures aromatiques volatils et semi-volatils au niveau du µg/kg.

Une micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME) a été utilisée pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques les plus légers (MM entre 78 et 178 g/mol). La récupération des composés les plus lourds (MM entre 202 et 278 g/mol) a quant à elle été permise par une méthodologie basée sur l'extraction assistée par les ultrasons (UAE) suivie d'une extraction en phase solide (SPE). Une alternative plus sensible à cette stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE pour la détermination globale des hydrocarbures aromatiques a également été développée. Le remplacement de l'étape de SPE par une micro-extraction sur solide compacté (MEPS) a permis une récupération plus rapide, sensible et plus large des HAP (MM entre 152 et 278 g/mol).

L'ensemble des stratégies d'extraction, associées à des analyses en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, a ensuite pu être appliqué à la détermination des 20 composés aromatiques ciblés dans des pommes récoltées en Normandie ou des fruits provenant du commerce contaminés ou non par des gaz d'échappement ou des fumées de combustion de biomasse. Ces applications ont révélé la faible contamination des pommes normandes étudiées, l'adsorption prédominante des composés aromatiques au niveau de la peau des fruits et leur faible transfert vers la chair.

Mots clés : hydrocarbures aromatiques monocycliques (BTEX) et polycycliques (HAP), stratégies d'extraction, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), exposition aux polluants, fruits

Abstract

Monocyclic aromatic hydrocarbons (BTEX) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are considered and recognized as toxic compounds *via* ingestion. Their monitoring in food product is thus a significant concern. Sensitive and complementary experimental approaches were investigated with apple as model for the dual determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons at the ppb level.

A solid-phase micro-extraction in the headspace of samples (HS-SPME) was used for the most volatile aromatic hydrocarbons (MW between 78 and 178 g/mol). The recovery of the least volatile aromatic hydrocarbons (MW between 202 and 278 g/mol) was implemented with an ultrasound assisted extraction (UAE) followed by a purification step using a solid phase extraction (SPE). The methodology consisting in HS-SPME and UAE/SPE enabled the global determination of BTEX and PAHs. The SPE step was then substituted by a micro-extraction with a packed sorbent (MEPS) to elaborate a most sensitive and rapid methodology for the quantification of a wider range of PAHs (MW between 152 and 278 g/mol).

Extraction procedures associated with analyses using gas chromatography and mass spectrometry were then applied to the determination of 20 targeted aromatic compounds in apples harvested in Normandy or in commercial fruits exposed or not exposed to exhaust gas or to wood smoke. These applications revealed low levels of contaminants in the studied apples from Normandy. A predominant adsorption of aromatic compounds occurs on the skin of fruits and the transfer to the pulp is almost inexistent.

Keywords : monocyclic aromatic hydrocarbons (BTEX), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), extraction methodologies, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), exposition to pollutants, fruits

Extractions et analyses des hydrocarbures aromatiques : Approches méthodologiques et Applications à des matrices fruitières

Résumé

Les hydrocarbures aromatiques monocycliques (BTEX) et polycycliques (HAP) sont pour la plupart reconnus pour leur toxicité *via* ingestion. Le suivi de leur contenu dans les matrices alimentaires est donc indispensable. Plusieurs approches sensibles et complémentaires ont été établies, avec la pomme comme modèle d'étude, pour la double détermination de ces hydrocarbures aromatiques volatils et semi-volatils au niveau du µg/kg.

Une micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME) a été utilisée pour l'extraction des hydrocarbures aromatiques les plus légers (MM entre 78 et 178 g/mol). La récupération des composés les plus lourds (MM entre 202 et 278 g/mol) a quant à elle été permise par une méthodologie basée sur l'extraction assistée par les ultrasons (UAE) suivie d'une extraction en phase solide (SPE). Une alternative plus sensible à cette stratégie combinant l'HS-SPME et l'UAE/SPE pour la détermination globale des hydrocarbures aromatiques a également été développée. Le remplacement de l'étape de SPE par une micro-extraction sur solide compacté (MEPS) a permis une récupération plus rapide, sensible et plus large des HAP (MM entre 152 et 278 g/mol).

L'ensemble des stratégies d'extraction, associées à des analyses en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, a ensuite pu être appliqué à la détermination des 20 composés aromatiques ciblés dans des pommes récoltées en Normandie ou des fruits provenant du commerce contaminés ou non par des gaz d'échappement ou des fumées de combustion de biomasse. Ces applications ont révélé la faible contamination des pommes normandes étudiées, l'adsorption prédominante des composés aromatiques au niveau de la peau des fruits et leur faible transfert vers la chair.

Mots clés : hydrocarbures aromatiques monocycliques (BTEX) et polycycliques (HAP), stratégies d'extraction, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), exposition aux polluants, fruits

Abstract

Monocyclic aromatic hydrocarbons (BTEX) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are considered and recognized as toxic compounds *via* ingestion. Their monitoring in food product is thus a significant concern. Sensitive and complementary experimental approaches were investigated with apple as model for the dual determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons at the ppb level.

A solid-phase micro-extraction in the headspace of samples (HS-SPME) was used for the most volatile aromatic hydrocarbons (MW between 78 and 178 g/mol). The recovery of the least volatile aromatic hydrocarbons (MW between 202 and 278 g/mol) was implemented with an ultrasound assisted extraction (UAE) followed by a purification step using a solid phase extraction (SPE). The methodology consisting in HS-SPME and UAE/SPE enabled the global determination of BTEX and PAHs. The SPE step was then substituted by a micro-extraction with a packed sorbent (MEPS) to elaborate a most sensitive and rapid methodology for the quantification of a wider range of PAHs (MW between 152 and 278 g/mol).

Extraction procedures associated with analyses using gas chromatography and mass spectrometry were then applied to the determination of 20 targeted aromatic compounds in apples harvested in Normandy or in commercial fruits exposed or not exposed to exhaust gas or to wood smoke. These applications revealed low levels of contaminants in the studied apples from Normandy. A predominant adsorption of aromatic compounds occurs on the skin of fruits and the transfer to the pulp is almost inexistent.

Keywords : monocyclic aromatic hydrocarbons (BTEX), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), extraction methodologies, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), exposition to pollutants, fruits