

Application des plans d'expériences à l'analyse de pesticides dans l'eau par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

J.B. Fournier¹, M. El Hourch¹, J.P. Taglioni² et J. Fournier²

¹Laboratoire Départemental d'Hydrologie et d'Hygiène, 18 boulevard Lavoisier, 49009 Angers Cedex 01, France

²Laboratoire Universitaire de Chimie Bioorganique, IUT, 4 boulevard Lavoisier, 49016 Angers Cedex, France

Experimental Design methodology allows the modelling and optimisation of the simultaneous capillary GC-MS determination in water of 23 pesticides, belonging to various chemical families, in the selected-ion monitoring mode, a using a 2³ centred composite design.

Les décrets 89-3 du 3/1/89, 90-330 du 10/4/90, 91-257 du 7/3/91 et 95-363 du 5/4/95 du Ministère de la Santé Publique et de l'Assurance Maladie fixent les limites de concentrations admissibles des micropolluants organiques dans les eaux destinées à la consommation humaine. Les techniques chromatographiques sont couramment utilisées dans les laboratoires de contrôles agréés pour détecter la présence des traces de pesticides et des produits apparentés. Mais les exigences croissantes qu'impose la surveillance de notre environnement nécessitent en permanence la maîtrise et le développement de nouvelles procédures d'analyses.

Pour trouver les conditions optimales de séparation chromatographique et de mesure en vue de développer une méthode simultanée d'analyse de traces de pesticides, beaucoup d'expériences sont généralement nécessaires. En effet, la grande diversité des pesticides et des produits apparentés recherchés dans l'eau, notamment en ce qui concerne la polarité de ces molécules, rend délicate la mise au point d'une méthode d'analyse simultanée.

Le plus souvent l'analyste détermine grâce à son expérience les paramètres qu'il faut étudier pour mettre au point une méthode de dosage, puis il fait varier pas à pas et de manière indépendante les différents facteurs et fixe ainsi les conditions opératoires. Cette technique ne permet pas de prendre en compte les interactions entre les facteurs, ce qui constitue une source importante d'imprécision. L'utilisation d'un plan d'expériences permet d'adopter une stratégie plus économique et plus directe. Le nombre des essais à effectuer est déterminé de manière rationnelle ce qui évite les redondances d'informations et facilite la gestion du temps et la maîtrise des coûts. En outre la mise en œuvre d'une procédure d'optimisation permet l'étude des interactions entre les différents facteurs, il peut arriver qu'un facteur qui n'a

apparemment aucun effet sur le phénomène étudié, influence en fait ce phénomène indirectement à travers une interaction. Dans ce cas, la méthode des plans d'expériences est la seule qui permette véritablement une optimisation globale des conditions analytiques.

Il existe peu d'exemples d'applications des plans d'expériences au développement de procédures d'analyses chromatographiques [1–4]. Nous exposons la démarche qui nous a permis de modéliser et d'optimiser la séparation, l'identification et la mesure de résidus de 23 pesticides dans l'eau par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire associée à la détection par spectrométrie de masse.

Méthode

L'effet des facteurs susceptibles de modifier les réponses étudiées peut être quantifié, leurs interactions sont alors calculées et celles qui sont influentes sont repérées. Il est ensuite possible de modéliser ces résultats sous la forme de fonctions analytiques ou graphiques reliant les réponses aux facteurs influents ; la modélisation mathématique est ensuite utilisée pour déterminer les meilleures conditions expérimentales de l'analyse.

Nous rappelons brièvement la méthode, qui fait l'objet d'une littérature abondante [5–11]. Supposons que nous voulions étudier la séparation de deux pics chromatographiques caractérisée par la résolution,

$$R_{AB} = 2 [(t_{R})_B - (t_{R})_A] / (\omega_B - \omega_A).$$

Ce facteur R_{AB} correspond à la « réponse » Y de l'étude. Elle dépend de k facteurs (A, B, C, \dots), comme le volume injecté, la pression de la phase mobile, la température du four... Certains facteurs sont quantitatifs, mesurables et représentés par une grandeur, les valeurs prises par ces facteurs pouvant être continues ou discrètes ; d'autres facteurs, comme la nature de la phase stationnaire, sont qualitatifs. Parmi les facteurs contrôlables, certains sont fixés *a priori* ou par les contraintes du laboratoire, d'autres sont des variables à optimiser par le plan d'expériences. On attribue à chaque facteur variable deux niveaux extrêmes, a (-1) et b ($+1$), quantitatifs ou qualitatifs, correspondant aux limites d'un intervalle raisonnable de variation. L'ensemble des niveaux a et b définis pour chaque facteur délimite le domaine expérimental de l'étude ; 2^k expériences sont donc programmées, elles conduiront à autant de valeurs y de la réponse Y . La matrice des essais correspondant au plan optimal comporte k colonnes et 2^k lignes. Elle se construit de la façon suivante : dans la colonne correspondant au premier facteur on alterne les a (-1) et les b ($+1$), dans celle du second facteur on alterne les a et les b de 2 lignes en 2 lignes, dans la colonne du facteur de rang k on alterne les a et les b de 2^{k-1} lignes en 2^{k-1} lignes. Les effets moyens des facteurs et leurs interactions sont calculés. Avec trois facteurs, ce qui correspond à 8 expériences, les effets des facteurs seront :

$$h_A = 1/8 (-y_1 + y_2 - y_3 + y_4 - y_5 + y_6 - y_7 + y_8)$$

$$h_B = 1/8 (-y_1 - y_2 + y_3 + y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8)$$

$$h_C = 1/8 (-y_1 - y_2 - y_3 - y_4 + y_5 + y_6 + y_7 + y_8).$$

Le calcul des interactions consiste à effectuer le produit ligne à ligne des facteurs concernés :

$$h_{AB} = 1/8 (+y_1 - y_2 - y_3 + y_4 + y_5 - y_6 - y_7 + y_8)$$

$$h_{AC} = 1/8 (+y_1 - y_2 + y_3 - y_4 - y_5 + y_6 - y_7 + y_8)$$

$$h_{BC} = 1/8 (+y_1 + y_2 - y_3 - y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8)$$

$$h_{ABC} = 1/8 (-y_1 + y_2 + y_3 - y_4 + y_5 - y_6 - y_7 + y_8).$$

La moyenne des résultats est $H = 1/8 (+y_1 + y_2 + y_3 + y_4 + y_5 + y_6 + y_7 + y_8)$.

L'analyse de la variance [12,13] des résultats permet de déterminer les facteurs influents. L'effet d'un facteur est significatif s'il entraîne des variations statistiquement différentes de l'incertitude propre de la réponse étudiée.

Dans le cas de trois facteurs influents et d'interactions significatives, la réponse prend la forme d'une équation linéaire :

$$Y = H + A h_A + B h_B + C h_C + AB h_{AB} + AC h_{AC} + BC h_{BC} + ABC h_{ABC}.$$

Pour valider ce modèle, on affecte de nouveaux niveaux compris entre a et b à chaque facteur, par exemple le niveau 0 qui est égal à $[a + b]/2$. Si la différence entre la valeur expérimentale de la réponse et la valeur calculée par le modèle n'excède pas 5 % le modèle est validé et utilisable pour choisir les meilleurs niveaux à attribuer aux facteurs dans le domaine d'étude.

Si ce n'est pas le cas on doit procéder à des expériences complémentaires constituant avec les premières un plan composite centré. Pour l'étude de trois facteurs, ce plan comporte 16 expériences. La matrice des essais comprend les 8 essais précédents, 2 essais dans lesquels les facteurs sont fixés à leurs niveaux 0 dits points centrés et $2k$ essais, dits points en étoile, dans lesquels les facteurs sont fixés successivement aux niveaux $-\alpha$ et $+\alpha$. Le nombre de points centrés est fonction du nombre de facteurs variables et des exigences de l'expérimentateur quant à l'optimalité du plan (isovariance par rotation, précision uniforme, quasi-orthogonalité). La valeur de α dépend de k , dans un plan à trois facteurs $\alpha = 1,68$. Le domaine expérimental de l'étude s'étend maintenant aux points en étoile. Le calcul des effets et des interactions permet d'élaborer un modèle quadratique qui doit également être validé. Les coefficients a_i du modèle quadratique se calculent à partir des valeurs réelles.

$$Y = a_0 + a_1 A + a_2 B + a_3 C + a_4 AB + a_5 AC + a_6 BC + a_7 A^2 + a_8 B^2 + a_9 C^2.$$

$$[A] = (X'X)^{-1} X'Y$$

X matrice des essais

X^{-1} matrice inverse des essais

A matrice des coefficients a_i

X' matrice des essais transposée

Y matrice des réponses.

Partie expérimentale

Produits et matériels

Hexane et acétate d'éthyle, Merck, pour analyse de résidus de pesticides,

Méthanol, Prolabo, Pestinorm®,

Pesticides étalons, Riedel de Haen, Sigma-Aldrich, (liste des produits analysés, Tab. VIII),

Hélium N60, Air Liquide,

Eau bidistillée,

Solutions S0 de chacun des 23 pesticides à 1 g/L dans le méthanol, solutions S1 à 10 mg/L réalisées par dilution de 100 μ L de chaque solution S0 dans 10 mL de solvant,

CG Varian Star 3400 CX équipé du détecteur SM Varian Saturn 2000 à trappe d'ions et d'un passeur d'échantillons Varian 8200 CX,

Logiciel Statgraphics *Plus*, Manugistics Inc. (Rockville Maryland USA).

Conditions chromatographiques invariables

Colonne capillaire J & W Scientific DB5-ms, 30 m \times 0,250 mm (0,25 mm),

Volume d'injection : 1 μ L, mode splitless,

Température de l'injecteur 250 °C ; température de la ligne de transfert 260 °C ; température de la trappe 150 °C ; température du four programmée de 40 à 260 °C,

Impact électronique 70 eV ; gaz vecteur hélium N60.

L'identification des pics chromatographiques est faite sur les spectres de masse complets en mode ion total. La quantification est effectuée à partir des deux ou trois pics de masse spécifiques qui correspondent aux ions les plus abondants. Il faut toutefois vérifier que la matrice des échantillons n'entraîne pas d'interférences avec les ions de rapports m/z choisis.

Plan d'expériences

Notre objectif était de développer une méthode d'analyse simultanée de l'ensemble des molécules récapitulées dans le tableau VIII. La chromatographie capillaire avec détecteur de masse permet d'identifier et de mesurer les concentrations de constituants d'un mélange dont les pics chromatographiques sont mal résolus, à condition que l'on puisse identifier dans leurs spectres de masse les ions spécifiques [15]. Nous pouvons ainsi analyser simultanément l'endosulfan-sulfate et le 4,4-DDT qui ont des temps de rétention très proches à 18,30 et 18,31 min. Les pics de masse de rapports m/z 272, 274 et 387 permettent la quantification de l'endosulfan-sulfate, et les pics 165, 235 et 237 celle du 4,4-DDT. Par contre les pics chromatographiques du 4,4-DDD et du 2,4-DDT, qui présentent des spectres de masse très semblables puisque leurs quantifications s'effectuent à partir des mêmes pics de rapport m/z 165, 235 et 237, doivent impérativement être séparés.

Nous avons cherché à optimiser la séparation des pics chromatographiques du 4,4-DDD et du 2,4-DDT d'une part (réponse 2), et de l' α -HCH (pics de masse de rapports m/z 181, 183, 219) et du HCB (pics de masse de rapports m/z 249, 284, 286) d'autre part (réponse 1).

En vue de mesurer des traces nous avons aussi cherché à optimiser le rapport signal/bruit (réponses 3, 4, 5...) des pics chromatographiques reconstitués à partir de l'addition des ions spécifiques choisis pour la quantification de chaque produit.

Les facteurs de l'étude sont la pression du gaz vecteur (A) exprimée en psi (14,4 psi = 100 kPa = 1 bar), l'incrément

de température du four (B) exprimée en °C/min, et la polarité π du mélange de solvant (C). Ce paramètre est calculé de la façon suivante : les polarités π^* [16] du méthanol, de l'hexane et de l'acétate d'éthyle étant respectivement égales à 0,60, -0,08 et 0,55, on calcule la polarité π d'un mélange constitué de x % de méthanol, y % d'hexane et z % d'acétate d'éthyle en volume par la formule $\pi = 0,60 x - 0,08 y + 0,55 z$. Si le choix des deux premiers facteurs s'impose, le troisième devrait, *a priori*, ne pas avoir d'effet.

Le tableau I présente la matrice des essais du plan d'expériences composite centré que nous avons utilisé. Les niveaux -1 et +1 de chaque facteur sont 7,2 et 14,5 psi pour A, 5,0 et 15,0 °C/min pour B, et 0,140 (65,8 % d'hexane et 24,2 % d'acétate d'éthyle) et 0,403 (24,2 % d'hexane et 65,8 % d'acétate d'éthyle) pour le facteur C.

La matrice des effets est donnée dans le tableau II.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I. La première étape consiste à déterminer les facteurs influents et à calculer le modèle quadratique permettant de décrire les valeurs expérimentales. Une analyse de variance permet de dissocier les différents effets étudiés à partir de la variance de la réponse mesurée. La signification statistique de chaque effet est ensuite testée en comparant la variance des effets décrits par le modèle obtenu au moyen de la méthode des moindres carrés, avec une estimation de la variance résiduelle due aux erreurs expérimentales et aux facteurs non contrôlés. Le tableau III donne les coefficients du modèle mathématique quadratique calculé pour cinq réponses. La valeur contenue dans le tableau IV permet de contrôler si l'effet considéré est significativement différent de zéro. Pour ces cinq réponses, deux facteurs ou interactions présentent des valeurs inférieures à 0,05. Nous vérifions que l'effet du facteur C (polarité du solvant), ainsi que les interactions qui le mettent en jeu ne sont jamais significatives. Ce résultat confirme qu'il est possible d'utiliser différents solvants pour la mise au point de l'extraction des pesticides dans des échantillons réels, sans craindre d'affecter les limites de détection de la méthode ou la bonne séparation des différentes molécules. D'autre part, il apparaît que la température et la pression influencent conjointement la séparation chromatographique des produits et les temps de rétention de chacun, mais seule la pression influence l'intensité des pics enregistrés et le rapport signal/bruit.

Les résultats des analyses de variance effectuées à partir des modèles quadratiques calculés pour cinq réponses sont présentés dans le tableau V. Ce tableau fournit le pourcentage de variance expliquée par le modèle mathématique par comparaison avec la variance contenue dans les résultats expérimentaux. Il est ainsi possible de juger de la validité globale d'un modèle d'une manière plus simple et plus explicite qu'en comparant de manière ponctuelle quelques points expérimentaux avec les valeurs fournies par le modèle. Les modèles calculés pour les séparations de l' α -HCH et de l'HCB d'une part, et du 4,4-DDD et du 2,4-DDT d'autre part, ainsi que pour le rapport signal sur bruit de l' α -endosulfan, rendent compte d'environ 80 % de la variance des résultats expérimentaux. Les modèles calculés pour

Tableau I. Matrice des essais du plan d'expériences composite centré.

Ordre des essais	Facteur A Pression He	Facteur B Variation de température	Facteur C Polarité du solvant	Réponse 1 Résolution α -HCH/HCB	Réponse 2 Résolution 4,4-DDD/2,4-DDT	Réponse 3 Mécoprop* Rapport S/B	Réponse 4 Alachlore Rapport S/B	Réponse 5 α -endosulfan Rapport S/B
3	-1	-1	-1	0,86	0,62	1265	92	41
14	+1	-1	-1	0,60	0,44	9596	959	780
5	-1	+1	-1	0,94	0,84	2367	132	110
9	+1	+1	-1	1,28	0,46	561	2330	1672
6	-1	-1	+1	0,74	0,66	1065	137	102
13	+1	-1	+1	0,56	0,44	11363	909	829
16	-1	+1	+1	0,94	0,84	3615	138	89
10	+1	+1	+1	1,30	0,46	12119	1031	1086
12	-1,68	0	0	0,86	1,20	990	88	68
2	+1,68	0	0	0,86	0,46	21016	1922	1368
7	0	-1,68	0	0,74	0,12	1239	137	69
1	0	+1,68	0	1,00	0,52	2626	283	186
8	0	0	-1,68	0,94	1,06	2581	225	189
11	0	0	+1,68	1,00	0,60	2401	337	258
15	0	0	0	1,14	0,80	2612	288	194
4	0	0	0	1,20	0,86	2582	297	206

* : Ester méthylique du mécoprop.

Tableau II. Matrice des effets du plan d'expériences composite centré.

Essai n°	Facteur A (psi)	Facteur B (°C/min)	Facteur C (π)	Interaction AB (psi * °C/min)	Interaction AC (psi * π)	Interaction BC (°C/min * π)	Facteur A ² (psi) ²	Facteur B ² (°C/min) ²	Facteur C ² (π) ²
3	7,2	5,0	0,140	36,0	1,01	0,700	51,8	25,0	0,020
14	14,5	5,0	0,140	72,5	2,03	0,700	210,3	25,0	0,020
5	7,2	15,0	0,140	108,0	1,01	2,100	51,8	225,0	0,020
9	14,5	15,0	0,140	217,5	2,03	2,100	210,3	225,0	0,020
6	7,2	5,0	0,403	36,0	2,90	2,015	51,8	25,0	0,162
13	14,5	5,0	0,403	72,5	5,84	2,015	210,3	25,0	0,162
16	7,2	15,0	0,403	108,0	2,90	6,045	51,8	225,0	0,162
10	14,5	15,0	0,403	217,5	5,84	6,045	210,3	225,0	0,162
12	4,8	10,0	0,272	48,0	1,31	2,720	23,0	100,0	0,074
2	17,0	10,0	0,272	170,0	4,62	2,720	289,0	100,0	0,074
7	10,9	1,6	0,272	17,4	2,96	0,435	118,8	2,6	0,074
1	10,9	18,4	0,272	200,6	2,96	5,005	118,8	338,6	0,074
8	10,9	10,0	0,050	109,0	0,55	0,500	118,8	100,0	0,003
11	10,9	10,0	0,493	109,0	5,37	4,930	118,8	100,0	0,243
15	10,9	10,0	0,272	109,0	2,96	2,720	118,8	100,0	0,074
4	10,9	10,0	0,272	109,0	2,96	2,720	118,8	100,0	0,074

l'ester méthylique du mécoprop et l'alachlore approchent 90 %. Le test de Durbin-Watson permet de déterminer s'il existe une corrélation entre les résultats obtenus et l'ordre dans lequel ont été effectués les essais. Si le résultat est supérieur à 1,4 il n'y a aucune corrélation. La nécessité de modifier la pression d'hélium en tête de colonne et la durée de chaque expérience, empêchent de réaliser la série d'expérience en une seule manipulation. Des opérations de maintenance et de réglage de l'appareil sont nécessaires entre les

différentes séries de mesures, et les facteurs non contrôlés peuvent également varier. Les effets de bloc peuvent alors se manifester par des variations significatives de la réponse non plus en fonction des facteurs étudiés mais en fonction des séries d'essais effectués. Lors de la réalisation du plan d'expériences, l'ordre aléatoire retenu pour effectuer les essais a ici permis d'éviter des effets de bloc.

Les variations de l'effet global en fonction des facteurs et des interactions influents pour les réponses 1 et 2 sont

Tableau III. Calculs des coefficients des modèles quadratiques.

	Réponse 1 Résolution α -HCH/HCB	Réponse 2 Résolution 4,4-DDD/2,4-DDT	Réponse 3 mécoprop* Rapport S/B	Réponse 4 alachlore Rapport S/B	Réponse 5 α -endosulfan Rapport S/B
Constante	0,097	0,093	19644	701	1146
A : pression	0,047	0,003	-3758	-331	-298
B : température	0,009	0,081	479	-30	-45
C : polarité	0,717	0,297	-46980	4512	906
AA	-0,0040	-0,0008	225,2	23,0	17,9
AB	0,0039	0,0001	-82,3	9,3	7,5
AC	0,0131	-0,0572	3219,4	-393,3	-151,3
BB	-0,0020	-0,0040	-9,9	0,9	1,1
BC	0,0171	0,0338	2136,7	225,9	-136,3
CC	-1,9174	-0,6036	-2876,9	2692,5	3481,9

* : Ester méthylique du mécoprop.

Tableau IV. Détermination des facteurs influents.

	Réponse 1 Résolution α -HCH/HCB	Réponse 2 Résolution 4,4-DDD/2,4-DDT	Réponse 3 mécoprop* Rapport S/B	Réponse 4 alachlore Rapport S/B	Réponse 5 α -endosulfan Rapport S/B
A : pression	0,6952	0,0096	0,0014	0,0005	0,0030
B : température	0,0148	0,0907	0,8353	0,1486	0,1456
C : polarité	0,9527	0,1823	0,2314	0,4077	0,6655
AA	0,1104	0,7646	0,0198	0,0240	0,0197
AB	0,0466	0,9520	0,1906	0,1705	0,1394
AC	0,8431	0,4758	0,1799	0,1348	0,4032
BB	0,1205	0,0234	0,8013	0,8386	0,7366
BC	0,7227	0,5575	0,2141	0,2203	0,3066
CC	0,2827	0,7646	0,9595	0,6606	0,4501

* : Ester méthylique du mécoprop.

Les effets étudiés sont significativement différents de zéro au seuil de 95 % si la valeur contenue dans le tableau est inférieure à 0,05. Les valeurs concernées sont signalées en caractères gras.

Tableau V. Analyse de variance restituée par les modèles quadratiques calculés.

	Facteurs influents	% variance expliquée par le modèle	Test de Durbin-Watson
Résolution α -HCH / HCB	Température	78,66 %	1,97
Résolution 4,4-DDD / 2,4-DDT	Température/Pression	84,26 %	2,39
	Pression		
S/B ester méthylique du mécoprop	(Température) ²	89,91 %	1,93
	Pression		
S/Balachlore	(Pression) ²	92,50 %	1,73
	Pression		
S/B α -endosulfan	(Pression) ²	79,65 %	2,45
	Pression		

* : Les facteurs non-contrôlés et l'ordre des essais n'ont pas une influence statistique significative si la valeur du test de Durbin-Watson est supérieure à 1,4.

représentés dans les figures 1 à 4. Dans le cas des réponses 3, 4 et 5, l'effet global croît de façon continue avec le facteur influent A (pression), et l'interaction A^2 . Les figures 5 à 9 représentent les surfaces de réponses 1 à 5 correspondant aux modèles quadratiques. Les représentations des réponses 3 à 5 montrent que plus le seul facteur influent, c'est-à-dire la pression, est élevé, meilleur est le rapport signal/bruit. Dans le but de mettre au point une méthode d'analyse avec les meilleures limites de détection, il est donc préférable de fixer la pression à son plus haut niveau. La pression d'hélium en tête de colonne est donc fixée à 17 psi. Cette pression n'est pas optimale pour la séparation du 4,4-DDD et du 2,4-DDT comme le montre la figure 6. Mais ces conditions permettent d'optimiser la résolution du α -HCH et de l'HCB. D'autre part dans le soucis de disposer de

méthodes d'analyses les plus sensibles possible, les figures 7, 8 et 9 démontrent la nécessité de fixer la pression en tête de colonne à 17 psi.

Compte tenu du choix précédent pour la pression d'hélium, le calcul d'optimisation démontre que le meilleur facteur de résolution des pics chromatographiques de l'HCB et du α -HCH sera obtenu pour une pente de température de 16 °C/min. Ensuite, pour la séparation du 4,4-DDD et du 2,4-DDT, la pente de température optimale sera de 11,8 °C/min. Au vu de ces résultats, il aurait été souhaitable d'étendre le domaine expérimental que nous avons exploré puisque ce domaine ne contient pas l'optimum en pression. Néanmoins les résultats analytiques et graphiques que nous produisons soutiennent nos conclusions sans incursion hasardeuse à l'extérieur du domaine expérimental.

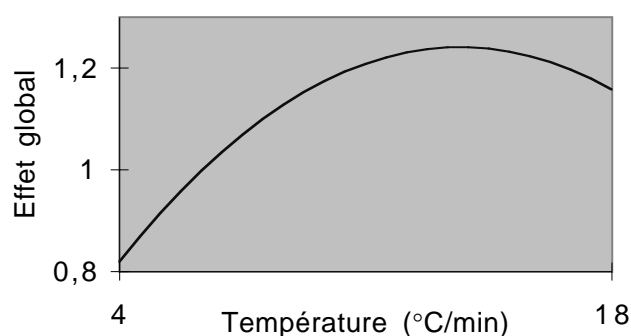


Figure 1. Séparation α -HCH/HCB.

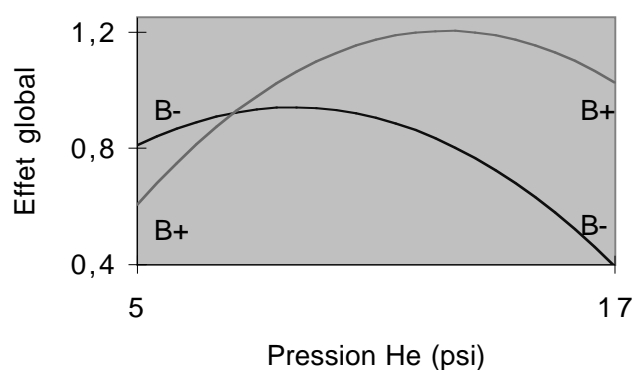


Figure 2. Séparation α -HCH/HCB, effet global de l'interaction AB.

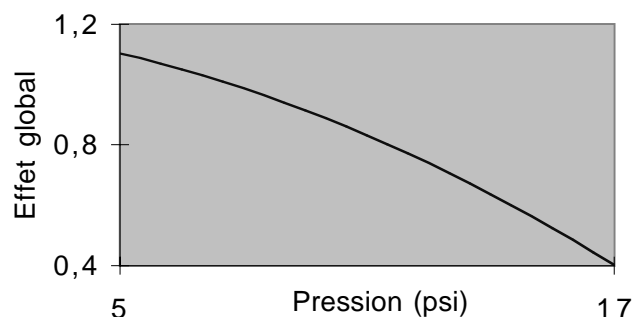


Figure 3. Séparation 4,4-DDD/2,4-DDT, effet de la pression.

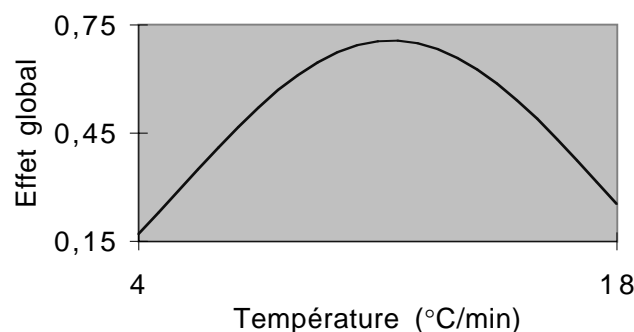


Figure 4. Séparation du 4,4-DDD et du 2,4-DDT, effet de l'interaction BB.

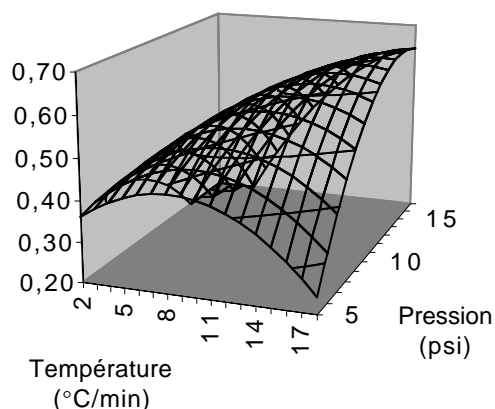


Figure 5. Résolution α -HCH/HCB.

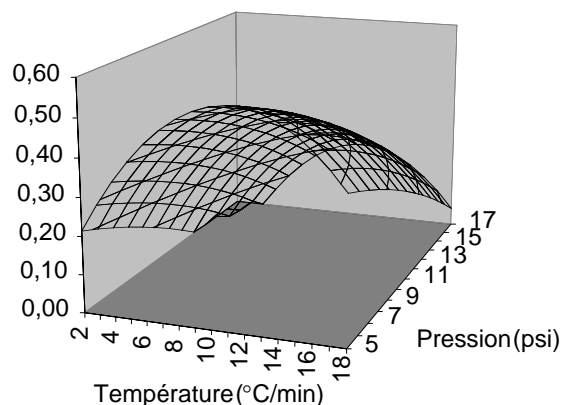


Figure 6. Résolution 4,4-DDD/2,4-DDT.

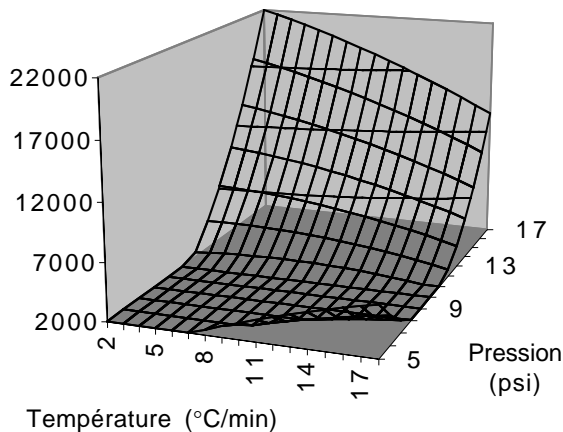


Figure 7. Mécoprop, rapport signal/bruit.

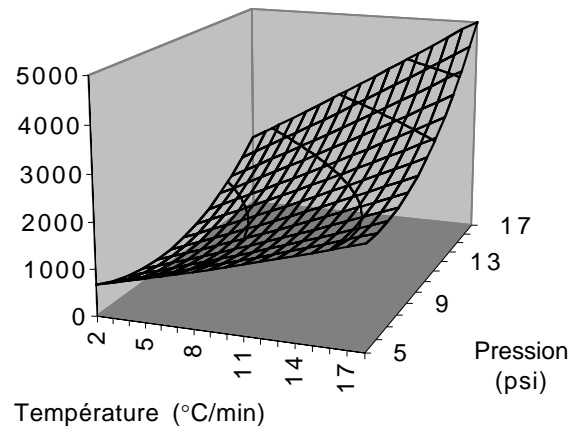


Figure 8. Alachlore, rapport signal/bruit.

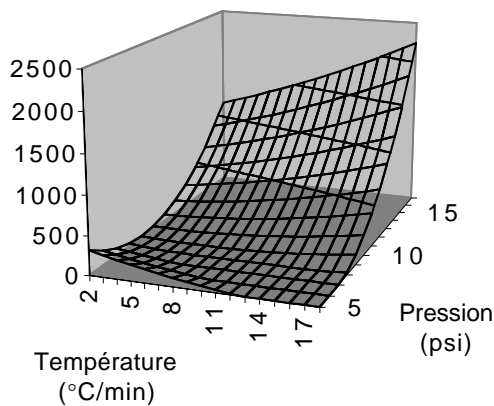


Figure 9. α -endosulfan, rapport signal/bruit.

Tableau VI. Programmation de température du four.

Etape	Température initiale (°C)	Température (°C/min)	Température finale (°C)	Durée	Durée totale
1	40	0,0	40	1,00	1,00
2	40	16,0	200	10,00	11,00
3	200	11,8	260	5,08	16,08
4	260	0,0	260	4,92	21,00

Conclusion

Finalement, le tableau VI donne la programmation de température optimale de la colonne qui permet d'analyser simultanément les vingt-trois pesticides. La première rampe de température de 16 °C/min. permet une bonne séparation de l'isomère α de l'hexachlorohexane et de l'hexachlorobenzène. Les produits dont les temps de rétention sont proches du α -HCH de l'HCB sont également correctement séparés. Cette valeur de 16 °C/min. est relativement élevée, elle permet à la fois de bien séparer les premiers produits élués et de s'affranchir des effets de solvant qui pourraient entraîner des malformations des pics chromatographiques. La seconde rampe de température, fixée à 11,8 °C/min, permet une séparation correcte du 4,4-DDD et du 2,4-DDT ainsi que le montre la figure 10. De plus, cette température de 11,8 °C/min est suffisamment élevée pour contribuer à la rapidité des analyses en diminuant les temps de rétention des produits.

La pression que nous avons fixée entraîne l'obtention de pics chromatographiques bien résolus, symétriques et présentant des rapports signal/bruit élevés. Le tableau VII récapitule les temps de rétention, les pics de masse spécifiques retenus pour l'analyse quantitative et les rapports signal/bruit expérimentaux obtenus à partir d'une solution équivalente à l'extraction d'un litre d'eau à la concentration de 1 $\mu\text{g/L}$. La figure 10 représente le chromatogramme d'une solution de 21 pesticides dosée dans les mêmes conditions, le 2,4-D et le MCPA ne figure pas dans ce chromatogramme. Compte tenu des résultats acquis, il faut admettre qu'un produit sera détecté si son pic chromatographique présente un rapport signal/bruit supérieur ou égal à 3. Les valeurs reproduites dans le tableau VII démontrent que tout les produits testés pourront être dosés dans l'eau potable à des teneurs nettement inférieures aux normes en vigueur. Ces normes fixent les teneurs admissibles à 0,030 $\mu\text{g/L}$ pour l'aldrine, la dieldrine, l'heptachlore et son dérivé époxyde, et à 0,100 $\mu\text{g/L}$ pour toutes les autres substances.

Cet article illustre à partir d'un exemple concret les applications de la méthode des plans d'expériences au développement et à l'optimisation de procédures analytiques, ce qui représente un problème quotidien pour de nombreux laboratoires. Cette recherche illustre la facilité de mise en œuvre et la simplicité d'interprétation des plans d'expériences. Outre une gestion rationnelle des coûts et des temps de mise au point, le développement d'une démarche rationnelle permet aux utilisateurs peu familiarisés avec les méthodes statistiques de mener à bien les travaux d'optimisation.

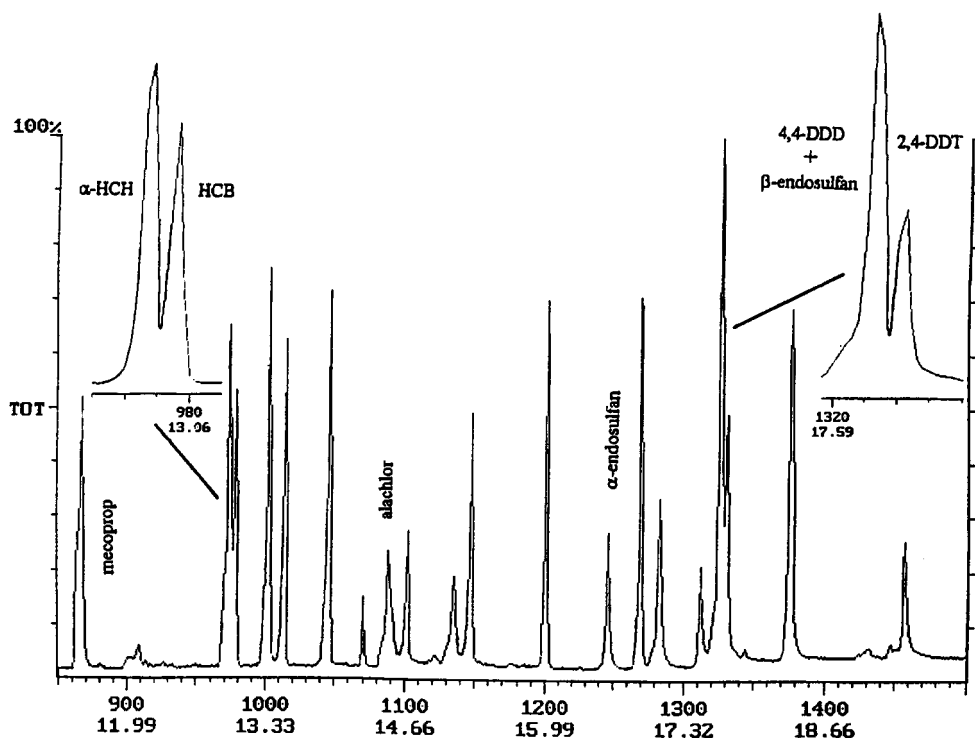


Figure 10. Chromatogramme d'une solution de 21 pesticides organo-chlorés à 1 µg/L.

Tableau VII. Produits analysés et pics spécifiques retenus pour l'analyse quantitative.

N°	Noms usuels des pesticides étudiés	Temps de rétention (min)	Pic n°1 (m/z)	Pic n°2 (m/z)	Pic n°3 (m/z)	Rapport signal sur bruit**
1	mécoprop*	11,53	142	169	228	659
2	MCPA*	11,74	141	214	216	162
3	2,4 - D*	12,32	175	199	234	168
4	α - HCH	12,95	181	183	219	6994
5	HCB	13,03	249	284	286	12669
6	β - HCH	13,34	181	183	219	18730
7	γ - HCH	13,51	181	183	219	15454
8	δ - HCH	13,91	181	183	219	7221
9	alachlore	14,47	160	188		1444
10	heptachlore	14,67	272	274	337	2617
11	metolachlore	15,12	162	238	240	7958
12	aldrine - R	15,27	263	293	291	6928
13	heptachlore epoxyde	15,98	217	253	289	2617
14	α - endosulfan	16,59	195	241	269	1955
15	4,4 - DDE	16,88	246	316	318	12881
16	dieldrine	17,10	79	277	279	329
17	endrine	17,40	245	315	317	122
18	β - endosulfan	17,64	159	195	269	53
19	4,4 - DDD	17,66	165	235	237	2815
20	2,4 - DDT	17,72	165	235	237	507
21	endosulfan sulfate	18,30	272	274	387	7186
22	4,4 - DDT	18,31	165	235	237	185
23	métoxychlore	19,42	227	274	308	5268

* : Esters méthyliques du mécoprop, du MCPA et du 2,4-D.

** : Rapport signal sur bruit calculé sur le pic chromatographique obtenu par l'addition des pics reconstitués à partir de chacun des pics spécifiques des molécules étudiées à partir de l'extraction de 1 L d'eau à la concentration de 1 µg/L.

Tableau VIII. Substances actives et produits dérivés recherchés par GC/MS.

Substance active nom usuel	Formes chimiques et dérivés recherchés par CG-SM	Formule brute
Lindane	isomère α - HCH	$C_6H_6Cl_6$
	isomère β - HCH	$C_6H_6Cl_6$
	isomère γ - HCH	$C_6H_6Cl_6$
	isomère δ - HCH	$C_6H_6Cl_6$
Hexachlorobenzène		C_6Cl_6
2,4'-D	dérivé ester méthylé	$C_9H_8Cl_2O_3$
Endosulfan	isomère α	$C_9H_6Cl_6O_3S$
	isomère β	$C_9H_6Cl_6O_3S$
	dérivé sulfaté	$C_9H_6Cl_6O_4S$
MCPA	dérivé ester méthylé	$C_{10}H_{11}ClO_3$
Heptachlore		$C_{10}H_5Cl_7$
	dérivé époxyde	$C_{10}H_5Cl_7O$
Mécoprop	dérivé ester méthylé	$C_{11}H_{13}ClO_3$
Aldrine		$C_{12}H_8Cl_6$
Dieldrine		$C_{12}H_8Cl_6O$
Endrine		$C_{12}H_8Cl_6O$
Alachlore		$C_{14}H_{20}ClNO_2$
DDT	isomère dérivé 4,4'-DDE	$C_{14}H_8Cl_4$
	isomère dérivé 2,4'-DDD	$C_{14}H_{10}Cl_4$
	isomère dérivé 4,4'-DDD	$C_{14}H_{10}Cl_4$
	isomère 2,4'-DDT	$C_{14}H_9Cl_5$
	isomère 4,4'-DDT	$C_{14}H_9Cl_5$
Métolachlore		$C_{15}H_{22}ClNO_2$
Métoxychlore		$C_{16}H_{15}Cl_3O_2$

C'est pourquoi l'introduction de ces méthodes dans les laboratoires nous paraît constituer un net progrès. Toutefois l'application de telles techniques ne peut permettre de compenser une méconnaissance des phénomènes étudiés. En effet le choix des facteurs étudiés, ainsi que des bornes du domaine expérimental demandent une solide expérience de la part du manipulateur. De même le choix du type de plan et du nombre de niveaux fixés pour chaque facteur nécessite la

mise en relation des résultats espérés avec l'expérience et les connaissances théoriques de l'utilisateur. Il est évident que tout les phénomènes ne peuvent pas être décrits avec un plan à deux niveaux et un modèle polynomial simple. Pour fournir des résultats de qualité, la conception d'un plan d'expériences doit être subordonnée à une parfaite maîtrise des phénomènes qui régissent les conditions d'analyses.

Références

1. Wan, H. B.; Lan, W. C.; Wong, M. K.; Mok, C. Y. *Anal. Chim. Acta* **1994**, 289, 371.
2. Rouberty, F.; Fournier, J. *Chromatographia* **1995**, 41, 553.
3. Rouberty, F.; Optimisation de l'analyse de résidus de pesticides organiques dans l'eau et les matrices végétales par une méthode de plans d'expériences, Thèse de doctorat en science, université d'Angers, 1994.
4. Rouberty, F.; Fournier, J. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **1996**, 19, 37.
5. Sado, G.; Sado, M. C. Les plans d'expériences - De l'expérimentation à l'assurance qualité, AFNOR Technique, Paris, 1991.
6. Vigier, M. G. Pratique des plans d'expériences - méthodologie Tagushi, Les éditions d'organisation, Paris, 1988.
7. Goupy, J. La méthode des plans d'expériences, Dunod, Paris, 1988.
8. Benoist, D.; Tourbier, Y.; Germain-Tourbier, S. Plans d'expériences : construction et analyse, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 1995.
9. Lochner, R. H.; Matar, J. E. Conception de la qualité : les plans d'expériences, AFNOR, Paris, 1992.
10. Benoist, D. Notions sur les plans d'expériences, Éditions Technip, Paris, 1974.
11. Montgomery, D. C. Design and Analysis of Experiments, 4th éd., John Wiley & Sons, New-York, 1996.
12. Sheffe, H. The analysis of Variance, Wiley & Sons, New York, 1964.
13. Dugue, D. Traité de statistique théorique et appliquée, Masson, Paris, 1958.
14. British Crop Protection Council, Royal Society of Chemistry, The Pesticide Manual, 11th edition, 1997.
15. Hu, R.; Berthion, J. M.; Bodereau, I.; Fournier, J. *Chromatographia* **1996**, 43, 181.
16. Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 2877.