



HAL
open science

Étude de la composition de différentes fumées de cigarette associées aux tabagismes actif et passif

Sébastien Schramm

► **To cite this version:**

Sébastien Schramm. Étude de la composition de différentes fumées de cigarette associées aux tabagismes actif et passif. Autre. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0408 . tel-01750211

HAL Id: tel-01750211

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750211>

Submitted on 29 Mar 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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Lorraine
UFR Sciences fondamentales et appliquées
Laboratoire de Chimie et Physique des Milieux Complexes

THESE

Présentée par

Sébastien Schramm

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE
Spécialité Chimie Analytique

**ETUDE DE LA COMPOSITION DE DIFFERENTES FUMÉES DE
CIGARETTE ASSOCIÉES AUX TABAGISMES ACTIFS ET
PASSIFS**

Prof. Maurice MILLET	Université de Strasbourg	Rapporteur
Prof. Philippe. SCHMITT- KOPPLIN	Université de Munich	Rapporteur
Prof. Daniel CANET	Université de Lorraine	Examineur
Dr. Hélène BUDZINSKI	Université de Bordeaux	Examinatrice
Dr. Caroline TOKARSKI	Université de Lille 1	Examinatrice
Dr. Vincent CARRE	Université de Lorraine	Co-directeur
Prof. Frédéric AUBRIET	Université de Lorraine	Co-directeur
Jean-Luc SCHEFFLER	Responsable de production Eurofins Hygiène des lieux de travail	Membre invité

Préambule

Les travaux de recherche de cette thèse ont été effectués grâce au soutien financier du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche au sein du laboratoire de chimie et physique, approche multi-échelle des milieux complexes (LCP-A2MC) avec la contribution du service commun de RMN de l'Université de Lorraine et du laboratoire Eurofins environnement.

Je tiens dans un premier temps à remercier vivement Frédéric Aubriet et Vincent Carré, initiateurs de cette thèse, pour leur soutien, leur disponibilité, les compétences et connaissances qu'ils m'ont transmises et surtout pour la confiance qu'ils m'ont accordé durant ces trois années de thèse.

Je remercie particulièrement Jean-Luc Scheffler, pour sa disponibilité et pour m'avoir fait bénéficier de son expérience.

Je prie le professeur Maurice MILLET, ainsi que le Professeur Philippe SCHMITT-KOPPLIN, d'accepter mes remerciements pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je témoigne également ma reconnaissance aux Docteur Hélène BUDZINSKI et Caroline TOKARSKI, ainsi qu'au professeur Daniel CANET pour avoir accepté d'être membre du jury.

Ma reconnaissance va également à Gabriel KRIER, pour son aide administrative, à Lionel VERNEX-LOSET pour son soutien technique, au docteur Olivier DELHOMME pour ses conseils ainsi qu'au professeur Patrick CHAIMBAULT pour les discussions et son soutien statistique.

Merci également à Mehdi YEMLOUL, et au Professeur Daniel CANET pour les apports scientifiques en RMN.

Je remercie également les membres du laboratoire Eurofins et plus particulièrement Sophie et Leyla pour m'avoir énormément facilité le travail au cours de cette thèse.

Je témoigne également toute ma reconnaissance aux doctorants, anciens doctorants et permanents du LCP-A2MC ainsi que de l'institut de chimie, physique et matériaux de Metz, que j'ai côtoyé durant ces trois années : Jean-Jacques, Nico, Laetitia, Cyril, Loïc, Didier, Xaviera, Estelle, David et Junien ...

Enfin, je ne saurai oublier ma famille. Mon père, ma mère ainsi que ma sœur, mais également mes amis et particulièrement Jé et Laura.

Merci beaucoup à Margot qui m'a apporté son aide et son réconfort.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	I-1
CHAPITRE I. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE	I-5
I.1. Introduction	I-5
I.2. La pollution atmosphérique.....	I-5
I.3. Les aérosols	I-8
I.3.1. Définitions	I-8
I.3.2. Variation du nombre de particules	I-10
I.3.2.A. La déposition.....	I-11
I.3.2.B. La nucléation.....	I-11
I.3.2.C. La coagulation	I-12
I.3.3. Variation de taille et de composition chimique.....	I-12
I.3.3.A. La condensation.....	I-12
I.3.3.B. L'adsorption/désorption.....	I-13
I.3.4. Le cas particulier des particules associées à la combustion : les suies.....	I-13
I.3.5. Devenir des aérosols en atmosphères ouverte ou confinée.....	I-14
I.3.6. Matière particulaire et risques toxicologiques associés.....	I-16
I.3.7. Méthodes de prélèvement et d'analyse des aérosols.....	I-18
I.3.7.A. Méthodes d'échantillonnage.....	I-18
I.3.7.B. Méthodes de mesure.....	I-20
I.3.7.B.a. Détermination de la masse de particules.....	I-20
I.3.7.B.b. Détermination de la forme, du nombre et de la taille des particules.....	I-20
I.3.7.B.c. Détermination de composition chimique des particules.....	I-22
I.3.8. Conclusion	I-23
I.4. Les fumées de cigarette : définitions et généralités.....	I-23
I.4.1. Les différentes classes de fumées de cigarettes.....	I-23
I.4.1.A. Le courant principal de fumée (MSS)	I-24
I.4.1.B. Les fumées expirées (EXS)	I-24
I.4.1.C. Le courant secondaire de fumée (SSS)	I-24
I.4.1.D. Les fumées de tabac environnementales (ETS).....	I-25
I.4.1.E. Le courant tertiaire de fumée (THS).....	I-25
I.4.2. Toxicité des fumées de cigarette.....	I-26
I.4.3. Les constituants d'une cigarette.....	I-28
I.4.3.A. Le tabac	I-28
I.4.3.A. Le filtre et le papier.....	I-29
I.4.4. Processus à l'œuvre durant le fumage d'une cigarette.....	I-30
I.4.4.A. La zone de pyrolyse.....	I-30
I.4.4.A.a. La pyrolyse de composés hétérocycliques azotés.....	I-30
I.4.4.A.b. La pyrolyse de la biomasse.....	I-31
I.4.4.B. La zone de combustion.....	I-31
I.4.4.C. Parcours des fumées au sein de la cigarette.....	I-32
I.5. Analyses des différentes classes de fumées.....	I-33
I.5.1. Introduction.....	I-33
I.5.2. Les composés aromatiques.....	I-33
I.5.2.A. Les HAPs	I-33
I.5.2.B. Les nitro-HAPs.....	I-34
I.5.2.C. Les composés à cycles aromatiques azotés.....	I-35
I.5.2.D. Les composés oxygénés	I-37
I.5.3. Les nitrosamines	I-37
I.5.4. Les autres composés organiques volatils	I-39
I.5.5. Les composés inorganiques	I-39
I.5.6. Les particules	I-40
I.5.7. Analyses par bouffées.....	I-42
I.5.7.A. Techniques hors-ligne « Off-line ».....	I-42

I.5.7.B. Techniques en ligne « On-line »	I-43
I.5.8. Conclusion.	I-45
I.6. Spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire dans l'analyse de milieux complexes.	I-46
I.6.1. La Résonance Magnétique Nucléaire.....	I-46
I.6.2. La spectrométrie de masse	I-47
I.6.2.A. Les méthodes d'ionisation	I-47
I.6.2.B. La spectrométrie de masse très haute résolution.....	I-49
I.6.2.C. Méthodes d'exploitation des spectres	I-50
I.7. Conclusion.....	I-52

CHAPITRE II. MISE EN PLACE ET VALIDATION DE LA METHODE DE PRELEVEMENT II-53

II.1. Introduction.....	II-53
II.2. Le prélèvement.....	II-53
II.2.1. Les échantillons	II-53
II.2.2. Le dispositif de fumage et de collecte.....	II-55
II.2.3. La procédure de fumage et de prélèvement	II-57
II.2.4. Préparation des échantillons	II-59
II.2.4.A. Introduction.....	II-59
II.2.4.B. Conservation des prélèvements.....	II-59
II.2.4.C. Les composés associés à la phase gazeuse	II-59
II.2.4.D. Les composés associés à la phase particulaire	II-59
II.3. Analyses quantitatives et validation de méthodes.....	II-61
II.3.1. Introduction	II-61
II.3.2. Choix des traceurs	II-61
II.3.3. La chromatographie	II-62
II.3.3.A. Analyse de la Nicotine et des HAPs	II-63
II.3.3.B. Analyse des BTEX.....	II-64
II.3.4. Détection par ionisation de flamme	II-64
II.3.5. Détection par spectrométrie de masse de type piège à ions	II-66
II.3.5.A. Production des ions	II-66
II.3.5.B. Spectromètre de masse par piège à ions	II-67
II.3.5.B.a. Description du piège ionique	II-67
II.3.5.B.b. Mécanisme de piégeage des ions	II-68
II.3.5.B.c. Détection des ions.....	II-69
II.3.5.B.d. Analyse en mode MS/MS.....	II-70
II.3.5.B.e. Chromatogrammes obtenus en GC-MS/MS	II-70
II.3.6. Validation des méthodes de quantification des traceurs	II-73
II.3.6.A. Validation de la linéarité	II-73
II.3.6.A.a. Introduction	II-73
II.3.6.A.b. Méthodes des écarts maximums acceptables (EMA)	II-73
II.3.6.A.c. Validation de la linéarité par les statistiques globales	II-74
II.3.6.B. Détermination des incertitudes sur la mesure	II-75
II.3.6.C. Détermination des rendements de préparation	II-76
II.3.6.D. Mise en place de la carte de contrôle	II-78
II.3.6.E. Conclusion.....	II-78
II.4. Méthode de prélèvement et de fumage validation et paramètres influents.....	II-79
II.4.1. Introduction	II-79
II.4.2. Formalisme et définitions des plans d'expériences.....	II-79
II.4.3. Application au prélèvement des fumées de cigarette	II-81
II.4.3.A.a. Débit et durée des bouffées	II-81
II.4.3.A.b. Conditionnement et ventilation	II-81
II.4.3.A.c. Les points centraux	II-82
II.4.4. Interprétation des résultats	II-83
II.4.4.A. Etude des points centraux	II-83
II.4.4.B. Détermination des effets de facteurs	II-84
II.4.4.B.a. Effet de la dilution	II-84
II.4.4.B.b. Effet du conditionnement/hygro-métrie de la cigarette.....	II-86

II.4.4.B.c. Effet du débit et de la durée des bouffées	II-87
II.4.4.C. Conclusions	II-87
II.5. Conclusion	II-88

CHAPITRE III. LA LDI-FTICRMS – PRINCIPES ET APPLICATIONS A L'ANALYSE DE FUMÉES DE CIGARETTE III-89

III.1. Introduction	III-89
III.2. La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions couplée à la désorption/ionisation laser (LDI-FTICRMS).....	III-90
III.2.1. Introduction	III-90
III.2.2. Désorption/Ionisation laser (LDI)	III-90
III.2.3. La spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier.....	III-92
III.2.4. Déroulement d'une analyse LDI-FTICR-MS.....	III-94
III.3. Exploitation et traitement des spectres de masse.....	III-100
III.3.1. Attribution des compositions élémentaires.....	III-100
III.3.2. Outils d'interprétation des spectres de masse.....	III-103
III.3.2.A. Equivalent double liaison et indice d'aromaticité.....	III-103
III.3.2.B. Représentation par famille chimique	III-105
III.3.2.C. Diagramme de van Krevelen.....	III-106
III.3.2.D. Cartes de Kendrick	III-107
III.3.3. Choix de la gamme de masse étudiée.....	III-108
III.3.4. Influence de l'énergie du faisceau laser.....	III-111
III.4. Conclusion.....	III-115

CHAPITRE IV. ANALYSE DES FUMÉES DE CIGARETTE ASSOCIÉES AU TABAGISME ACTIF ET PASSIF IV-117

IV.1. Introduction	IV-117
IV.2. Etude des MSS de cigarettes différentes.....	IV-117
IV.2.1. Introduction.....	IV-117
IV.2.2. Etude des traceurs (benzène et toluène).....	IV-118
IV.2.3. Analyses des spectres de masse	IV-120
IV.2.3.A. Approche globale.....	IV-120
IV.2.3.B. Analyse détaillée.....	IV-123
IV.3. Etude des fumées inspirées et expirées.....	IV-125
IV.3.1. Introduction.....	IV-125
IV.3.2. Etude de la masse de particules expirées et comparaison avec les MSS.....	IV-126
IV.3.3. Analyse du spectre de masse des EXS et comparaison avec les MSS.....	IV-127
IV.3.4. Comparaison des EXS produites par deux fumeurs différents.....	IV-133
IV.4. Analyse des SSS et comparaison avec les MSS	IV-136
IV.4.1. Introduction.....	IV-136
IV.4.2. Approche globale	IV-136
IV.4.3. Analyse par familles.....	IV-140
IV.5. Conclusions	IV-143

CHAPITRE V. ANALYSES COMPLÉMENTAIRES DES FUMÉES DE CIGARETTES PAR FTICRMS ET RMN V-145

V.1. Introduction.....	V-145
V.2. Analyse des fumées de cigarette par LDI-FTICRMS à 266 nm	V-147
V.2.1. Introduction	V-147
V.2.2. Protocole expérimental	V-147
V.2.3. Analyse des MSS par LDI-MS à 266 nm et comparaison à l'analyse par LDI-MS à 355nm.....	V-148
V.3. Analyse des fumées de cigarette par ESI-FTICRMS	V-151
V.3.1. Introduction	V-151
V.3.2. L'ionisation par électronebulisation	V-152
V.3.2.A. Principe de la technique.....	V-152

V.3.2.B. Protocole expérimental	V-153
V.3.2.C. Analyse en mode de détection positif	V-154
V.3.2.D. Analyse en mode de détection négatif	V-156
V.3.3. Conclusion.....	V-158
V.4. Analyse par résonance magnétique nucléaire des MSS et SSS.	V-159
V.4.1. Introduction	V-159
V.4.2. Principes généraux de la RMN	V-160
V.4.2.A. Obtention du signal RMN.....	V-160
V.4.2.A. Le déplacement chimique	V-162
V.4.3. Etude des MSS	V-163
V.4.3.A. Analyse en RMN du proton	V-163
V.4.3.B. RMN hétéro-nucléaire, proton-carbone 13 (HSQC)	V-165
V.4.3.C. RMN COSY et TOCSY	V-167
V.4.3.C.a. La zone des aliphatiques et des insaturés non conjugués	V-168
V.4.3.C.b. La zone des aromatiques.	V-169
V.4.3.D. Conclusion	V-170
V.4.4. Comparaisons des MSS et SSS	V-171
V.5. Conclusion.....	V-175

CONCLUSION GENERALE	V-177
----------------------------------	--------------

ANNEXES	187
----------------------	------------

Liste des abréviations

AASQA	Association agréé de surveillance de la qualité de l'air
AES	atomic emission spectrometry
AI	Aromaticity index
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
APPI	Atmospheric pressure photo ionization
ATOFMS	Aerosol time of flight mass spectrometry
ATR	Attenuated Total Reflectance
BaP	Benzo(a)pyrène
BFB	Bromofluorobenzène
BTEX	Benzène Toluène Ethylbenzène Xylène
CID	Collision induced dissociation
COSY	Correlation spectroscopy
COV	Composés organiques volatils
CV	Coefficient de variations
DBE	Double bond equivalent
DMF	Diméthylefurane
DOM	Dissolved organic matter
EDS	Energy dispersive spectroscopy
EMA	Ecart maximum acceptable
ESI	Electrospray ionization
ETS	Environmental tobacco smoke
EXS	Exhaled smoke
FFT	Fast Fourier Transform
FID	Flame ionization detector
FT	Fourier transform
FTICRMS	Fourier Transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
FWHM	Full width at half maximum
GC	Gas chromatography
HACA	Hydrogen Abstraction – Carbon Addition
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HPLC	High pressure liquid chromatography

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
ICP	Induced coupled plasma
INRS	Institut national de recherche et de sécurité
IR	Infra rouge
ISO	International organization for standardization
KM	Kendrick mass
KMD	Kendrick mass defect
LA	Laser ablation
LC	Liquid chromatography
LD	Laser desorption
LDI	Laser desorption ionization
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Mass spectrometry
MSS	Mainstream smoke
NNAL	4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	4-(méthylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NNN	N ^o -nitrosonornicotine
NOM	Natural organic matter
OMS	Organisation mondiale de la santé
PM	Particulate matter
REMPI	Resonance enhanced multiphoton ionization
RF	Radio Fréquence
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SCE	Somme des carrés des écarts à la moyenne
SEM	Scanning electron microscopy
SOA	Secondary organic aerosol
SPE	Solid phase extraction
SPI	Single photon ionization
SSS	Sidestream smoke
SVOC	Semi-volatile organic compound
TEOM	Tapered Element Oscillating Microbalance
THS	Third hand smoke

TIC	Total ion current
TILDAS	Tunable infrared laser differential absorption spectroscopy
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOFMS	Time of flight mass spectrometry
TSNA	Tobacco specific nitrosamine
UV	Ultraviolet
VLE	Valeur limite d'exposition

Introduction générale

Introduction générale

La pollution associée aux activités humaines est devenue depuis plusieurs dizaines d'années une préoccupation majeure pour la santé et la survie des êtres vivants. Elle est en partie responsable de la dégradation de la qualité des sols, des eaux ainsi que de l'air. Dans chacun de ces compartiments, elle présente un risque non négligeable sur la santé publique notamment par le développement de différentes pathologies.

Concernant la qualité de l'air, il est maintenant accepté que son contrôle est une nécessité pour identifier et limiter les sources polluantes. La dégradation de la qualité de notre atmosphère peut être liée à la présence de molécules toxiques et/ou de particules inhalables qui ont, une action nocive directe sur l'organisme des êtres vivants (Homme, animaux, végétaux), mais elle peut également avoir un impact indirect en influençant le climat global de la planète. La dégradation de notre atmosphère a ainsi pu être observée à l'échelle planétaire, par la réduction saisonnière de l'épaisseur de la couche d'ozone et l'effet de serre additionnel et, à l'échelle locale par l'observation de phénomènes de smog chimique ou photochimique dans différentes métropoles. Cette dégradation a également lieu à une échelle plus réduite que l'on peut qualifier de domestique dans le cadre général des atmosphères confinées. Cet aspect fait aujourd'hui l'objet d'un grand nombre de réglementations et conduit à la mise en place de normes visant à contrôler la teneur dans l'atmosphère de certains polluants. Dans le cadre de l'hygiène des lieux de travail, la concentration de certaines molécules doit régulièrement être mesurée de façon à pouvoir intervenir en cas de dépassement du seuil fixé pour limiter l'exposition des salariés à certains composés reconnus comme toxiques.

Cependant, aucun contrôle n'est effectué dans le milieu domestique. Les sources de pollution y sont pourtant importantes, qu'il s'agisse d'émanation gazeuse comme le formaldéhyde ou de l'émission de particules et/ou de composés toxiques lors, par exemple, de la combustion dans les chaudières ou les foyers ouverts, durant la cuisson de certains aliments ou l'utilisation de peintures. Dans le milieu urbain, la pollution extérieure (trafic routier, chauffage résidentiel,...) peut également contaminer les atmosphères intérieures. L'aération étant plus limitée qu'en milieu extérieur, l'absence de brassage d'air ne permet pas une dissipation rapide des composés toxiques. Il en résulte donc une durée d'exposition bien plus longue.

Dans ce contexte, la fumée de cigarette fait partie des polluants domestiques les plus courants. Un nombre conséquent d'études, a démontré sa toxicité non seulement pour les

Introduction générale

fumeurs, mais également pour leur entourage. Les composés présents dans la phase gazeuse sont maintenant assez bien référencés. En revanche, l'analyse détaillée de la phase particulaire reste encore incomplète. En effet, ces particules sont des systèmes complexes et la plupart des techniques mises en œuvre ne ciblent précisément que quelques molécules ou familles de molécules. La phase particulaire présente cependant un risque significatif au travers de leur long temps de séjour dans l'organisme. Contrairement à la phase gazeuse, dont une grande partie est expirée, la phase particulaire peut se déposer dans les différents étages du système respiratoire. Les molécules qu'elles contiennent, peuvent alors passer dans l'organisme de façon continue et sur une durée beaucoup plus importante. On peut à ce niveau comparer cette exposition à une intoxication chronique.

Par ailleurs, la matière particulaire présente dans la fumée conduit également à un risque sanitaire pour les individus qui se trouvent dans l'entourage d'un fumeur par tabagisme passif. Ce phénomène est lié à l'inhalation de la fumée expirée par le fumeur actif et de celle émise à l'extrémité de la cigarette entre deux bouffées. L'ensemble des particules de fumées de cigarette qui se trouvent dans nos habitations peuvent également se déposer à la surface des matériaux et meubles présents dans ces espaces confinés. Des processus chimiques peuvent alors conduire à la transformation des espèces contenues dans la matière particulaire. En effet, après déposition, elles entrent en contact prolongé avec les constituants de l'air et peuvent réagir avec l'oxygène ou l'ozone par exemple. Ces transformations peuvent être activées sous l'action de la lumière ou correspondre également à de purs processus photochimiques. Sous l'effet d'un brassage d'air, la matière particulaire résultante peut être remise en suspension dans l'atmosphère et inhalée. Finalement, la phase particulaire de la fumée de cigarette ou plutôt des fumées de cigarette présente une importante complexité qui est relative aux différents processus qui conduisent à leur formation mais aussi à la dynamique des transformations chimiques et/ou physico-chimiques qu'elles subissent. Nombre des composés chimiques qui lui sont associés, présentent une toxicité qui peut être importante.

Ainsi, l'étude détaillée de la matière particulaire de la fumée de cigarette présente un intérêt conséquent. Elle est tout d'abord nécessaire pour décrire de manière exhaustive sa composition mais également pour comparer la composition des différents types de fumées de cigarettes, qu'elles soient associées au tabagisme actif ou passif. Les particules sont cependant des milieux hétérogènes complexes et la mise en place de leur analyse détaillée est un lourd problème analytique.

L'objectif de ce travail de thèse est de mettre en place une méthode analytique performante pour étudier de manière détaillée la matière particulaire associée à différents types de fumées de cigarette.

Dans un premier chapitre, une description générale des différents concepts et définitions liés aux aérosols sera donnée avant de discuter plus particulièrement des différents types de fumées de cigarettes. Une description des différentes molécules déjà mises en évidence dans les fumées ainsi que des techniques employées pour les identifier justifiera du choix de la technique de spectrométrie de masse utilisée dans cette étude. Dans un second chapitre, la mise en place ainsi que la validation au travers de la quantification de traceurs de la méthode de prélèvement sera menée. Elle permettra également, dans une certaine mesure, de mettre en évidence l'influence de différents paramètres de fumage associés à la cigarette ou au fumeur. Une fois la méthode de fumage et de prélèvement validés, l'analyse qualitative détaillée de la matière particulaire contenue dans les fumées inhalées par spectrométrie de masse à très haute résolution couplée à la désorption ionisation laser sera exposée dans le chapitre III. En particulier, l'étude des paramètres associés à l'étape de désorption/ionisation laser d'une part et à l'obtention d'un spectre de masse par spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS) à source externe d'autre part permettra la mise en place d'une méthodologie d'analyse qui assurera la comparaison au chapitre IV de différents types de fumées de cigarettes. La complexité des spectres de masse obtenus nous conduira à employer dans ces deux chapitres ainsi que dans le suivant des moyens d'analyse des données post-acquisition qui en faciliteront l'analyse et permettront de mener à bien la comparaison des différentes fumées de cigarette. A ce stade, la différenciation entre tabagisme passif et tabagisme actif sera menée. Le chapitre V apportera finalement des données supplémentaires à l'aide de techniques de spectrométrie de masse complémentaires mais également grâce à la RMN ^1H et ^{13}C et à la l'utilisation d'expériences de corrélation homo ou hétéro nucléaire. Ces résultats seront en mesure de confirmer et compléter ceux obtenus dans les deux chapitres précédents.

Chapitre I.

Contexte général de l'étude

I.1. Introduction.....	I-5
I.2. La pollution atmosphérique.....	I-5
I.3. Les aérosols.....	I-8
I.3.1. Définitions.....	I-8
I.3.2. Variation du nombre de particules.....	I-10
I.3.2.A. La déposition.....	I-11
I.3.2.B. La nucléation.....	I-11
I.3.2.C. La coagulation.....	I-12
I.3.3. Variation de taille et de composition chimique.....	I-12
I.3.3.A. La condensation.....	I-12
I.3.3.B. L'adsorption/désorption.....	I-13
I.3.4. Le cas particulier des particules associées à la combustion : les suies.....	I-13
I.3.5. Devenir des aérosols en atmosphères ouverte ou confinée.....	I-14
I.3.6. Matière particulaire et risques toxicologiques associés.....	I-16
I.3.7. Méthodes de prélèvement et d'analyse des aérosols.....	I-18
I.3.7.A. Méthodes d'échantillonnage.....	I-18
I.3.7.B. Méthodes de mesure.....	I-20
I.3.7.B.a. Détermination de la masse de particules.....	I-20
I.3.7.B.b. Détermination de la forme, du nombre et de la taille des particules.....	I-20
I.3.7.B.c. Détermination de composition chimique des particules.....	I-22
I.3.8. Conclusion.....	I-23
I.4. Les fumées de cigarette : définitions et généralités.....	I-23
I.4.1. Les différentes classes de fumées de cigarettes.....	I-23
I.4.1.A. Le courant principal de fumée (MSS).....	I-24
I.4.1.B. Les fumées expirées (EXS).....	I-24
I.4.1.C. Le courant secondaire de fumée (SSS).....	I-24
I.4.1.D. Les fumées de tabac environnementales (ETS).....	I-25
I.4.1.E. Le courant tertiaire de fumée (THS).....	I-25
I.4.2. Toxicité des fumées de cigarette.....	I-26
I.4.3. Les constituants d'une cigarette.....	I-28
I.4.3.A. Le tabac.....	I-28
I.4.3.A. Le filtre et le papier.....	I-29
I.4.4. Processus à l'œuvre durant le fumage d'une cigarette.....	I-30
I.4.4.A. La zone de pyrolyse.....	I-30
I.4.4.A.a. La pyrolyse de composés hétérocycliques azotés.....	I-30
I.4.4.A.b. La pyrolyse de la biomasse.....	I-31
I.4.4.B. La zone de combustion.....	I-31
I.4.4.C. Parcours des fumées au sein de la cigarette.....	I-32
I.5. Analyses des différentes classes de fumées.....	I-33
I.5.1. Introduction.....	I-33
I.5.2. Les composés aromatiques.....	I-33
I.5.2.A. Les HAPs.....	I-33
I.5.2.B. Les nitro-HAPs.....	I-34
I.5.2.C. Les composés à cycles aromatiques azotés.....	I-35
I.5.2.D. Les composés oxygénés.....	I-37
I.5.3. Les nitrosamines.....	I-37
I.5.4. Les autres composés organiques volatils.....	I-39
I.5.5. Les composés inorganiques.....	I-39
I.5.6. Les particules.....	I-40
I.5.7. Analyses par bouffées.....	I-42
I.5.7.A. Techniques hors-ligne « Off-line ».....	I-42
I.5.7.B. Techniques en ligne « On-line ».....	I-43
I.5.8. Conclusion.....	I-45
I.6. Spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire dans l'analyse de milieux complexes.....	I-46
I.6.1. La Résonance Magnétique Nucléaire.....	I-46
I.6.2. La spectrométrie de masse.....	I-47
I.6.2.A. Les méthodes d'ionisation.....	I-47
I.6.2.B. La spectrométrie de masse très haute résolution.....	I-49
I.6.2.C. Méthodes d'exploitation des spectres.....	I-50
I.7. Conclusion.....	I-52

I.1. Introduction

Ce premier chapitre a pour but de définir un certain nombre de concepts et de termes importants dans le cadre de cette étude ainsi que de présenter un état de l'art sur les différentes techniques employées pour analyser de manière générale, le milieu complexe que représente le contaminant environnemental relatif aux particules et aux aérosols.

Dans un premier temps, la pollution atmosphérique et ses principales implications seront traitées de manière très générale avant que le propos ne soit recentré sur la matière particulaire. Après avoir donné un certain nombre de définitions, on s'attachera à décrire les processus qui conduisent à la formation et à la transformation des aérosols notamment en milieu confiné. Par ailleurs, les différentes méthodes de prélèvement et d'étude de la phase particulaire seront évoquées ainsi que les principaux risques toxicologiques relatifs à ce type de polluants. Les parties suivantes seront consacrées d'une part à la description des différentes classes de fumées de cigarette et aux principaux éléments qui en sont à l'origine (constituants de la cigarette, processus chimiques et physico-chimiques prenant place dans le cadre du fumage d'une cigarette). D'autre part, un état de l'art concernant les différentes méthodes d'analyse et les différents résultats déjà publiés par d'autres groupes seront présentés. La complexité des fumées de cigarette sera ainsi établie et justifiera le choix fait dans cette étude d'analyser par spectrométrie de masse très haute résolution la fraction particulaire de ces fumées. Afin de démontrer toute la pertinence de cette approche, un certain nombre de résultats traitant de manière générale de l'analyse de milieux complexes par spectrométrie de masse de très haute résolution seront présentés dans l'ultime partie de ce chapitre.

I.2. La pollution atmosphérique.

Depuis les années 1950, des dérèglements climatiques et atmosphériques comme l'apparition de trous dans la couche d'ozone stratosphérique, l'accroissement de l'effet de serre additionnel, les épisodes de smog chimique ou photochimique (pics d'ozone au niveau de la troposphère), ou encore des pluies acides sont observés. Ces phénomènes sont fortement liés à des variations de la composition chimique de l'atmosphère qui conduisent à des modifications importantes des processus de transfert d'énergie (principalement conversion énergie lumineuse – chaleur). La dynamique et dans une moindre mesure, la structure de l'atmosphère

Contexte général de l'étude

s'en trouvent ainsi modifiées. Ces évolutions de composition chimique, touchent principalement les cycles naturels du carbone, du soufre, de l'azote et de l'eau qui depuis le début de l'ère industrielle sont fortement altérées par les activités humaines. Parmi les activités anthropiques qui conduisent à l'émission dans l'atmosphère d'un grand nombre de contaminants, on trouve entre autres l'industrie, l'exploitation minière, les transports et le chauffage résidentiel. Dans ces derniers cas, la combustion d'énergie fossile (pétrole, gaz, charbon) ou de bois génère souvent en grandes quantités des particules carbonées dont la taille varie de quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de microns avec potentiellement un large panel de molécules adsorbées à leur surface.

La taille de ces particules est telle qu'elles restent en suspension pendant des temps pouvant être importants. Présentes en atmosphère ouverte (*outdoor*) ou confinée (*indoor*), elles concourent à maintenir en suspension dans nos environnements, un grand nombre de composés chimiques. Par ailleurs en milieu ouvert, la faible vitesse de sédimentation peut conduire au transport de ces particules et des molécules qui y sont adsorbées sur de très longues distances.

Devant ces importantes modifications de composition de l'air, la mesure de sa qualité selon certains critères a été mise en place notamment par l'organisation mondiale de la santé (OMS).¹ Ces indicateurs définissent la nature des composés présents dans l'air et le niveau d'exposition. Des valeurs guides des niveaux d'exposition en deçà desquels il n'a pas été observé d'effet nuisible pour la santé humaine ou les végétaux ont été définies pour certaines molécules appelées polluants ou contaminants.

Qu'il s'agisse de contamination en atmosphère ouverte ou confinée, les particules également appelées matière particulaire (PM) présentent un risque majeur pour la santé. La toxicité des PM est liée à la taille submicronique de certaines particules, à la nature des espèces qui les constituent ou qui sont adsorbées à leur surface. La taille des PM leur permet de se déposer à différents niveaux dans le système respiratoire après inhalation et donc de conduire à une exposition sur des durées relativement longues aux composés qui les constituent ou qui se trouvent à leur surface. Ce type d'exposition peut entraîner l'apparition chez l'homme, d'un nombre important de pathologies de nature différente, fonction, de la zone de déposition des particules et de leur composition. La pollution atmosphérique peut

1 *Air quality guidelines*; World Health Organization, 2005.

ainsi être initiatrice d'allergies, de bronchites, de crises d'asthmes, d'insuffisances respiratoires, de cancers ou de maladies cardio-vasculaires.²

Dans le contexte de la protection de la santé publique, l'identification des risques associés à la présence de certains polluants atmosphériques, notamment des PM s'est fortement développée ces dernières années.³ Au niveau de la pollution *outdoor*, des agences agréées de surveillance de la qualité de l'air (AASQA) se sont mises en place et des directives européennes (2008/50/CE) imposent désormais des valeurs limites d'exposition (VLE) ainsi que des objectifs de réduction de teneur pour certains contaminants dont la toxicité est avérée. Dans le cadre des atmosphères confinées et plus particulièrement dans les atmosphères de lieux de travail, des normes ont été mises en place (NF X 43-264 pour les aldéhydes et NF X 46-267 pour les composés organiques volatils (COV), notamment en relation avec l'institut national de recherche et de sécurité (INRS) et l'étude des risques de maladies professionnelles. Les atmosphères de travail présentent en effet un risque conséquent lié à la présence importante de contaminants dans ces espaces fermés et aux ventilations souvent faibles. Si les atmosphères en milieu ouvert ou de travail disposent maintenant de normes et de réglementation, il en est tout autrement pour les atmosphères confinées de type résidentiel, autrement dit nos habitations. Certaines structures de prévention du risque comme l'ANSEE proposent des recommandations quant aux VLE pour certains contaminants domestiques, mais il existe encore peu d'études des contaminants pouvant être présents chez tout un chacun. Parmi ceux-ci, on trouve les polluants relatifs aux phénomènes de combustion et/ou de pyrolyse liés au chauffage domestique, à la cuisson des aliments et à la fumée de cigarette. A l'origine de contaminants gazeux ou particulaires, ces phénomènes influencent directement la qualité de notre air intérieur.

Pour les étudier, un grand nombre de méthodologies associées à la détermination de la concentration de molécules cibles, potentiellement toxiques, dans ce type de matrice a été mis en place. Dans ce contexte par exemple, Chen *et al.* ont développé une procédure d'analyse des composés organiques semi-volatils (SVOC) comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)⁴ Delhomme *et al.* quant à eux, se sont plus particulièrement intéressés aux HAP oxygénés.⁵ Un état de l'art plus détaillé des méthodes disponibles sera présenté dans une prochaine section de ce premier chapitre.

2 Pattle, R. E.; Cullumbine, H. *BMJ* **1956**, *2*, 913-916.

3 Farmer, D. K.; Jimenez, J. L. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7879-7884.

4 Chen, H.; Li, M.; Zhang, Y.-P.; Yang, X.; Lian, J.-J.; Chen, J.-M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 450-454.

5 Delhomme, O.; Millet, M.; Herckes, P. *Talanta* **2008**, *74*, 703-710.

I.3. Les aérosols

I.3.1. Définitions

On définit un aérosol comme un ensemble de particules liquides ou solides, en suspension qui présentent une vitesse de sédimentation faible voire négligeable. Le comportement des particules est fortement dépendant des propriétés et de la dynamique de l'atmosphère dans laquelle elles sont présentes. Les aérosols présentent des formes extrêmement variées. Un critère employé pour en assurer la classification est le diamètre aérodynamique, il permet de s'affranchir des variabilités de typologie, de constitution et de masse volumique au sein d'un aérosol donné. Ainsi, le diamètre aérodynamique d'un aérosol réel est égal au diamètre d'une particule sphérique hypothétique de masse volumique 1000 kg/m^3 (masse volumique de l'eau) qui présenterait dans le milieu considéré la même vitesse de sédimentation. Dans le cadre de cette revue bibliographique, les données concernant les diamètres de particules seront systématiquement associées à leur diamètre aérodynamique.

Au delà d'une mesure de leur taille, les particules dans notre environnement sont aussi caractérisées par deux critères, en premier lieu leur concentration en nombre par m^3 et leur concentration en kg/m^3 . Ces deux critères sont intimement liés au travers de la répartition granulométrique de l'aérosol étudié. Classiquement, la concentration massique de particule s'établit entre 1 et 10^{-15} kg/m^3 .⁶ La combinaison de ce critère et de celui de la taille aérodynamique de l'aérosol étudié permet cependant de distinguer quatre domaines particulièrement typiques. La **Figure I-1** reporte pour des combinaisons diamètre aérodynamique/concentration massique ces quatre domaines. Il s'agit de celui des poudres et incendies, de celui des rejets de cheminées, de celui des aérosols atmosphériques et de celui des milieux propres.

Au regard du diagramme de la **Figure I-1**, le diamètre aérodynamique d'un aérosol couvre classiquement 5 ordres de grandeurs : du nanomètre à la centaine de micromètres. Trois domaines de taille sont plus spécifiquement identifiés en chimie de l'atmosphère :

- Le domaine des particules les plus petites également appelé domaine moléculaire. De taille nanométrique, ces particules sont qualifiées d'ultrafines. Leur comportement est décrit par la théorie cinétique des gaz notamment au travers du mouvement brownien et des processus de diffusion. Elles ne possèdent pas de vitesse de sédimentation.

- Le domaine grossier regroupe les particules les plus grosses (diamètre aérodynamique supérieur à 2 μm). Ces particules sont classiquement produites par des processus mécaniques (érosion, abrasion,...). Leur comportement est décrit par l'aérodynamique.
- Le domaine intermédiaire est associé à des particules fines de 0,1 à 2 μm de diamètre. Issues de la croissance, de la coalescence ou de l'agglomération de particules du domaine moléculaire, ces particules adoptent un comportement aérodynamique intermédiaire à celui des deux domaines précédents.

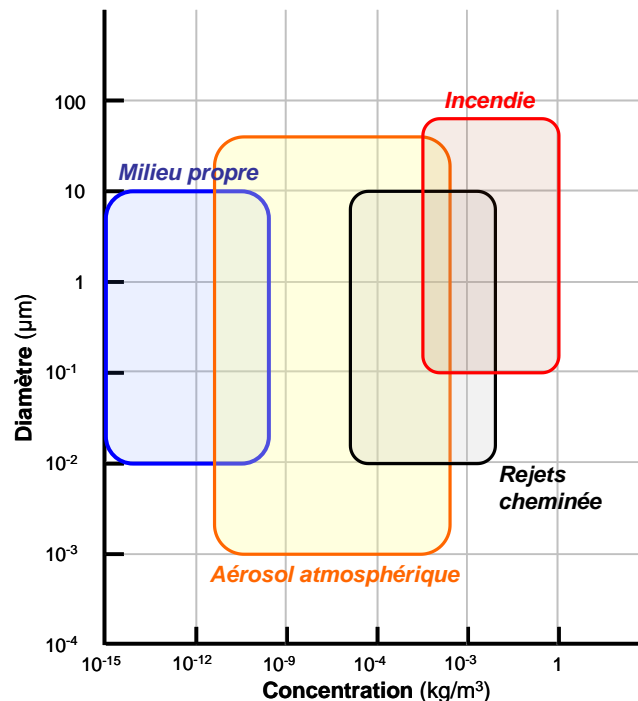


Figure I-1 : Domaines de dimension et de concentration de différents aérosols.⁶

La nature d'un aérosol est par essence complexe. En effet, il regroupe généralement des particules de dimension et de nature très différentes. Il est également en perpétuelle évolution au travers notamment des processus qui sont liés à sa dynamique. Ce terme regroupe à la fois la vitesse à laquelle les particules se déplacent, se sédimentent ou encore la manière dont leur taille évolue. La **Figure I-2** regroupe l'ensemble des terminologies employées, des caractéristiques et des processus propres à l'évolution d'un aérosol en fonction notamment de la taille des particules. Cette figure s'intéresse de manière générale à l'évolution des propriétés d'un aérosol. L'influence de la composition chimique des particules et de leur nombre sera décrite et discutée dans les paragraphes suivants.

⁶ Omer7; Outils numériques pour l'étude des sciences de l'environnement terrestre, <http://omer7.sedoo.fr/>.

Contexte général de l'étude

La formation des particules ultrafines ou particules primaires résulte de phénomènes de nucléation à partir de molécules initialement gazeuses. Ces dernières conduisent alors par des phénomènes de coagulation à la formation de particules fines sur lesquelles viennent s'adsorber de manière réversible des molécules gazeuses. La croissance des particules fines peut également se poursuivre par condensation (également réversible) à leur surface de molécules initialement gazeuses. Par ailleurs, la courbe noire « en V » sur la **Figure I-2** est indicatrice de la dynamique des particules.

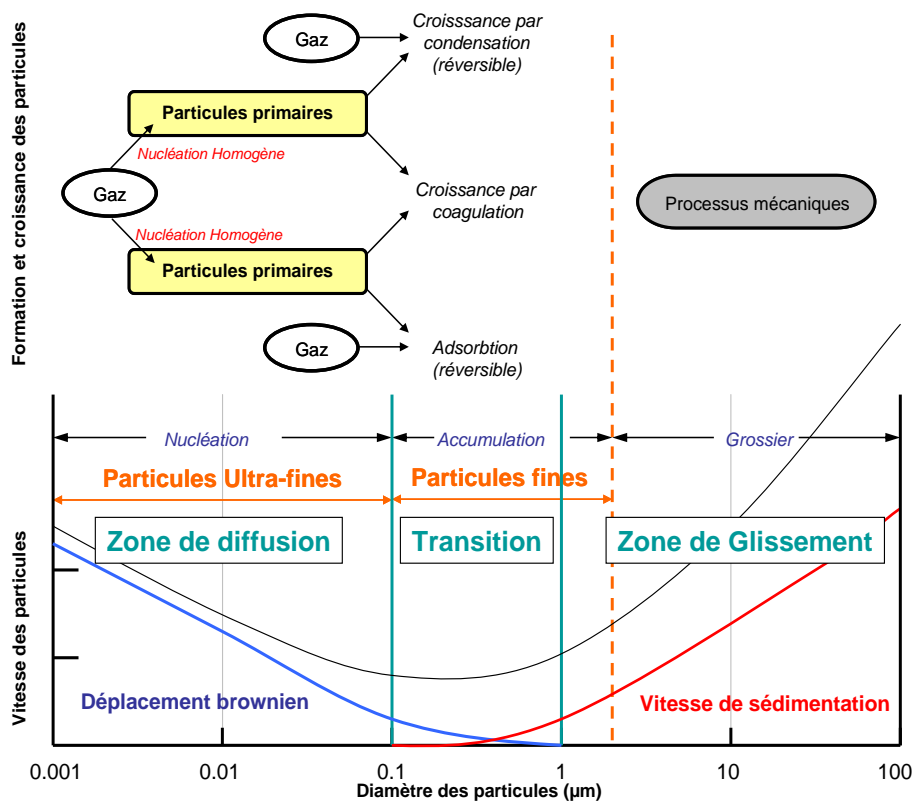


Figure I-2 : Processus et terminologies associés à la dynamique des aérosols.

Après avoir décrit dans ce paragraphe les processus très généraux ayant trait aux principales caractéristiques des particules atmosphériques ainsi qu'à leur formation et à leur évolution, les deux paragraphes suivants vont détailler les principaux phénomènes qui permettent pour un aérosol déterminé d'expliquer son évolution au cours du temps.

I.3.2. Variation du nombre de particules

La variation du nombre de particules par unité de volume peut être associée à différents processus qui conduisent soit à la formation de nouvelles particules qui en augmente le nombre (nucléation, production mécanique), ou qui au contraire le réduise (la déposition ou la coagulation) voire, pour les particules les plus petites, qui en modifie

localement la concentration (diffusion). Les sections suivantes vont détailler les processus les plus importants.

I.3.2.A. La déposition.

Deux types de déposition doivent être considérés de manière générale: les dépôts secs et les dépôts humides. Tout deux conduisent à une réduction du nombre de particules par unité de volume.

Pour les dépôts humides qui ne concernent que les atmosphères ouvertes, trois formes sont généralement décrites: les précipitations, l'incorporation des particules par impaction dans la phase liquide des nuages et le lessivage de particules sous les nuages.

Pour les dépôts secs, les principaux modes sont relatifs à l'impaction (effet d'inertie) ou à la sédimentation (action de la gravité). Ils concernent principalement les particules les plus grosses. Les particules les plus fines, sont soumises quant à elles à des processus de diffusion souvent improprement appelées diffusion moléculaire qui consiste en un transfert des particules selon leur gradient de concentration. Avec l'augmentation de la taille des particules, les déplacements browniens relatifs aux phénomènes de diffusion deviennent peu influents alors que les effets de sédimentation prévalent. L'importance relative de chacun de ces deux processus peut être visuellement mise en évidence en traçant le déplacement subit en fonction du temps. Les particules de faibles ou de grande taille subiront, sous l'effet de la diffusion ou de la sédimentation, respectivement, des déplacements importants alors que les particules de taille intermédiaire (trop grosses pour subir la diffusion mais trop peu pesantes pour sédimenter) ne présenteront que des déplacements minimes. On obtient ainsi comme le montre la **Figure I-2** une courbe en « V ».

Des particules chargées ou magnétiques peuvent également conduire à des processus de déposition sous l'action d'un champ électrique ou magnétique, respectivement.

I.3.2.B. La nucléation.

La nucléation correspond à l'apport de nouveaux aérosols et résulte de la transformation d'espèces présentes dans une phase (un gaz par exemple) en composés associés à une phase plus condensée (solide ou liquide). Dans ce cadre, il y a apparition de « petits noyaux ou *nucleus* ». Elle peut être homogène (une seule phase impliquée), hétérogène (deux phases) et homo- ou hétéro-moléculaire selon qu'une ou plusieurs espèces chimiques participent à la nucléation. On parle souvent dans le cas de l'aérosol atmosphérique d'une nucléation hétéro-moléculaire, l'aérosol formé n'étant pas isotrope. Ce cas particulier sera

Contexte général de l'étude

traité dans le paragraphe suivant. La nucléation homogène se produit lorsque la pression de vapeur saturante d'une espèce chimique sous forme gazeuse est nettement supérieure à celle de sa saturation pour une température donnée. On parle alors de sursaturation. Dans des conditions de saturation, certaines molécules s'associent pour former des monomères qui se condensent pour générer des embryons. Ces derniers, dans ces conditions, sont peu stables. Des processus inverses ont en effet, tendance à détruire ces édifices. Lorsque la sursaturation est atteinte, la forte population de monomère confère une stabilité accrue aux embryons et accroît leur taille jusqu'à atteindre un seuil au-delà duquel la phase liquide ou solide est stable. Les noyaux produits ont alors des tailles de quelques nanomètres.

Dans une atmosphère naturelle, les processus de nucléation homogène, hétéro-moléculaire sont ceux qui sont les plus probables.

I.3.2.C. La coagulation

La coagulation assure la croissance des constituants d'un aérosol par adhésion d'une particule avec une ou plusieurs autres. A partir de plusieurs unités, il n'en est ainsi formé qu'une, de plus grosse taille. La coagulation diminue donc le nombre de particules mais, en augmente la taille. Ce phénomène est issu de collisions qui sont d'autant plus efficaces que la probabilité de collision est élevée. Une forte agitation thermique (mouvement brownien), des turbulences au sein de l'atmosphère considérée (origine dynamique) ou l'action d'un champ extérieur (pesanteur ou électrique) ainsi qu'une concentration élevée de particules sont autant de conditions favorables à ce type de processus. Toutefois, plus la taille des particules mises en jeu est grande, moins les collisions seront efficaces.

I.3.3. Variation de taille et de composition chimique

I.3.3.A. La condensation

Si la nucléation est hétéro-moléculaire, la variation de la taille des particules s'accompagne d'une modification de la composition de la particule. Au-delà des paramètres influençant et modifiant la nucléation homogène, d'autres considérations propres à la nucléation hétéro-moléculaire ou condensation entrent en jeu. Il s'agit de grandeurs thermodynamiques telles que les valeurs de tensions superficielles (liquide-solide, liquide-gaz et/ou gaz-solide) mais également de caractéristiques de la particule comme l'angle de mouillage ou le rayon de courbure. Tout comme la nucléation, ce phénomène est réversible si

des espèces constitutives de la particule retournent en phase gazeuse par évaporation. Le cas particulier de la condensation d'eau sur un aérosol est nommé croissance hygroscopique.

I.3.3.B. L'adsorption/désorption

L'adsorption et son processus inverse la désorption sont des phénomènes qui modifient la composition chimique de la phase particulaire. L'adsorption qui est également appelée physisorption met en jeu des liaisons faibles de type Van der Waals. Une modification des conditions de température (hausse) et de pression (baisse) conduit au processus inverse de libération vers la phase gazeuse de ces espèces faiblement liées.

Classiquement, l'ensemble des processus décrits dans ces deux paragraphes conduit à la formation d'un aérosol dont la distribution en taille ou granulométrie n'est pas une distribution normale, mais une distribution logarithmico-normale. Elle est en effet étirée vers les tailles les plus élevées.

I.3.4. *Le cas particulier des particules associées à la combustion : les suies*

Les suies sont des particules qui sont classiquement observées lors de toute combustion incomplète, c'est-à-dire lorsque le mélange combustible-comburant est en déficit d'oxygène. Produites tant en foyer ouvert que fermé, elles sont issues de l'utilisation des ressources fossiles (gaz, pétrole, charbon), bio-sourcées (bois) ou de produits raffinés (essence, gazole). La pluralité des activités anthropiques dont elles sont issues et l'augmentation notable de leur concentration en atmosphères extérieure ou confinée font qu'elles constituent désormais une partie importante de la pollution atmosphérique *indoor* et *outdoor*. Les processus relatifs à leur formation ont, en conséquence, été étudiés de manière intensive.

Il est maintenant admis que la première étape de leur formation correspond à la production d'une molécule particulièrement stable, le benzène. L'étape suivante est la génération, à partir de cette molécule, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette croissance. Le premier fait intervenir les radicaux cyclopentadiényle ou $C_5H_5^\bullet$. Ces derniers, produits par réarrangement d'une molécule de benzène en présence d'oxygène, s'associent pour conduire à des structures polyaromatiques comme le montre la **Figure I-3**. De manière alternative, le mécanisme nommé « HACA » (Hydrogen Abstraction – Carbon Addition) met en jeu l'abstraction d'un atome d'hydrogène du noyau aromatique et l'addition d'une molécule d'acétylène sur un

Contexte général de l'étude

cycle aromatique. Ce dernier mécanisme est jugé prépondérant au cours de la formation des HAPs les plus lourds détaillée sur la **Figure I-3**.

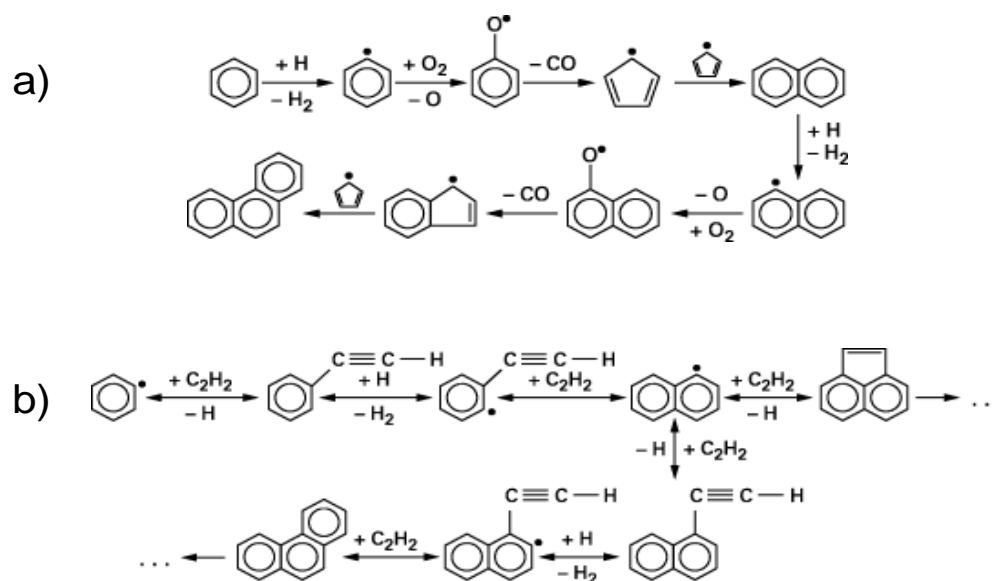


Figure I-3 : Formation de HAPs suivant les mécanismes (a) C₅H₅• et (b) HACA ⁷

Après leur formation, les HAPs conduisent à un phénomène de nucléation. Frenklach *et al.* ont proposé un mécanisme pour décrire la génération de premières particules par polymérisation de différents HAPs.⁸ La formation d'oligomères de HAPs (dimères, trimères, ...) permet la production de noyaux solides dont la taille est comprise entre 10 et 50 nm. La croissance de cet embryon, essentiellement constitué de carbone, a lieu au travers des processus de coagulation, de condensation et d'adsorption.

I.3.5. Devenir des aérosols en atmosphères ouverte ou confinée.

De manière classique, l'analyse de la matière particulaire, quelle que soit son origine, démontre la présence importante de suies, d'espèces radicalaires⁹, donc fortement réactives, et de molécules organiques aromatiques comme les HAPs.^{10,11} Dans l'atmosphère, ces composés sont susceptibles de subir des transformations sous l'action combinée de l'oxygène, des radicaux et de la lumière. On parle alors d'aérosols organiques secondaires ou SOA contenant des composés oxygénés parmi lesquels les acides carboxyliques, les esters et les peroxydes.¹² Au niveau des atmosphères confinées ou *indoor*, un certain nombre de caractéristiques conduisent à la modification ou à la transformation de la pollution particulaire. Des échanges

7 Dias, V.; Vandooren, J. *Tech. d'Ingénieur* **2004**.

8 Frenklach, M.; Wang, H. *Proc. Combust. Instit* **1990**, *21*, 1559-1566.

9 Truong, H.; Lomnicki, S.; Dellinger, B. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 1933-1939.

10 Hankin, S. M.; John, P. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1100-1104.

11 Carré, V.; Vernex-Loset, L.; Krier, G.; Manuelli, P.; Müller, J.-F. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3979-3987.

12 Müller, L.; Reinnig, M.-C.; Hayen, H.; Hoffmann, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 971-979.

entre air extérieur et air intérieur sont par exemple possibles. Même si cette contribution à la pollution *indoor* est mineure, les particules diesel relatives à une pollution *outdoor* concourent au même titre que les processus de combustion propres aux milieux confinés (combustion d'encens, de bougies, de bois, ou encore de tabac¹³) ou à celle d'autres types de poussières (pollen, fibres, bactéries...) à la présence de particules dans les habitations.¹⁴ Par ailleurs, la faible ventilation en milieu intérieur conduit à une déposition importante des particules à la surface des meubles, télévision et autres équipements. Ces phénomènes de déposition sont particulièrement favorables à la production de SOAs. Cela conduit non seulement à une durée d'exposition sur des temps plus longs mais aussi à des mélanges de contaminants plus divers et plus complexes. En conséquence, un certain nombre d'études ont eu pour objectif d'étudier les mécanismes de déposition de particules dans les atmosphères intérieures.¹⁵ Il a été montré plus particulièrement que la texture de la surface sur laquelle les particules se déposent, leur taille ainsi que la température sont des paramètres influençant les processus de déposition et donc la nature et la composition des particules en suspension dans l'air intérieur. A la différence des particules lourdes, les particules fines, d'un diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 µm (PM_{2,5}), peuvent rester en suspension dans l'air pendant plusieurs heures (cf. 1.3.2 et 1.3.3). Elles sont ainsi inhalables pendant des temps plus longs que les particules plus lourdes comme les PM₁₀ qui, plus fortement soumises à l'effet de la gravité, se déposent plus rapidement. En conséquence, il apparaît indispensable de contrôler l'émission de PM en atmosphère confinée. Pour ces raisons, les équipements de chauffage ou de cuisine sont désormais conçus pour limiter l'émission de particules.¹⁶ Pour d'autres sources d'émission de particules comme les fumées d'encens, de bougies ou de cigarettes, peu de mesures de protection à l'exposition sont employées en dépit de la reconnaissance de leur toxicité.¹⁷ On peut néanmoins signaler pour les cigarettes, l'efficacité pour un filtre imprégné de porphyrine à protéger partiellement le fumeur de certaines espèces volatiles telles que les HAPs et les nitrosamines spécifiques au tabac (TSNA).¹⁸ Par contre, aucun moyen n'est actuellement disponible pour limiter l'émission de particules issues des fumées de cigarettes alors qu'elles

13 Ott, W. R.; Siegmann, H. C. *Atmos. Environ.* **2006**, *40*, 821-843.

14 K. Koponen, I.; Asmi, A.; Keronen, P.; Puhto, K.; Kulmala, M. *Atmos. Environ.* **2001**, *35*, 1465-1477.

15 Lai, A. C. K. *Indoor Air* **2002**, *12*, 211-214.

16 Cynthia, A. A.; Edwards, R. D.; Johnson, M.; Zuk, M.; Rojas, L.; Jiménez, R. D.; Riojas-Rodriguez, H.; Masera, O. *Indoor Air* **2008**, *18*, 93-105.

17 Löfroth, G.; Stensman, C.; Brandhorst-Satzkorn, M. *Mutat res-Genet Tox* **1991**, *261*, 21-28.

18 Wang, C.; Dai, Y.; Feng, G.; He, R.; Yang, W.; Li, D.; Zhou, X.; Zhu, L.; Tan, L. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7172-7177.

Contexte général de l'étude

participent significativement à l'augmentation de la quantité totale de poussière dans nos habitations et qu'elles sont les principaux vecteurs de contaminants tels que les HAPs.¹⁹

I.3.6. Matière particulaire et risques toxicologiques associés.

La matière particulaire présente un risque toxicologique important à deux titres. En premier lieu, la taille submicronique conduit à une pénétration profonde des particules dans le système respiratoire comme le montre la **Figure I-4** car une grande partie est retenue dans l'organisme selon des mécanismes de rétention variés. Par ailleurs, la matière particulaire est aussi, comme nous l'avons indiqué précédemment, un support d'adsorption important pour un grand nombre de contaminants organiques volatils ou semi-volatils. Une fois retenues dans l'organisme, les particules peuvent libérer ces composés sur des durées relativement longues et conduire à une exposition chronique. Il est donc particulièrement pertinent d'examiner cette fraction encore trop peu connue, notamment par une approche non ciblée, et plus spécifiquement pour les fumées de cigarettes.

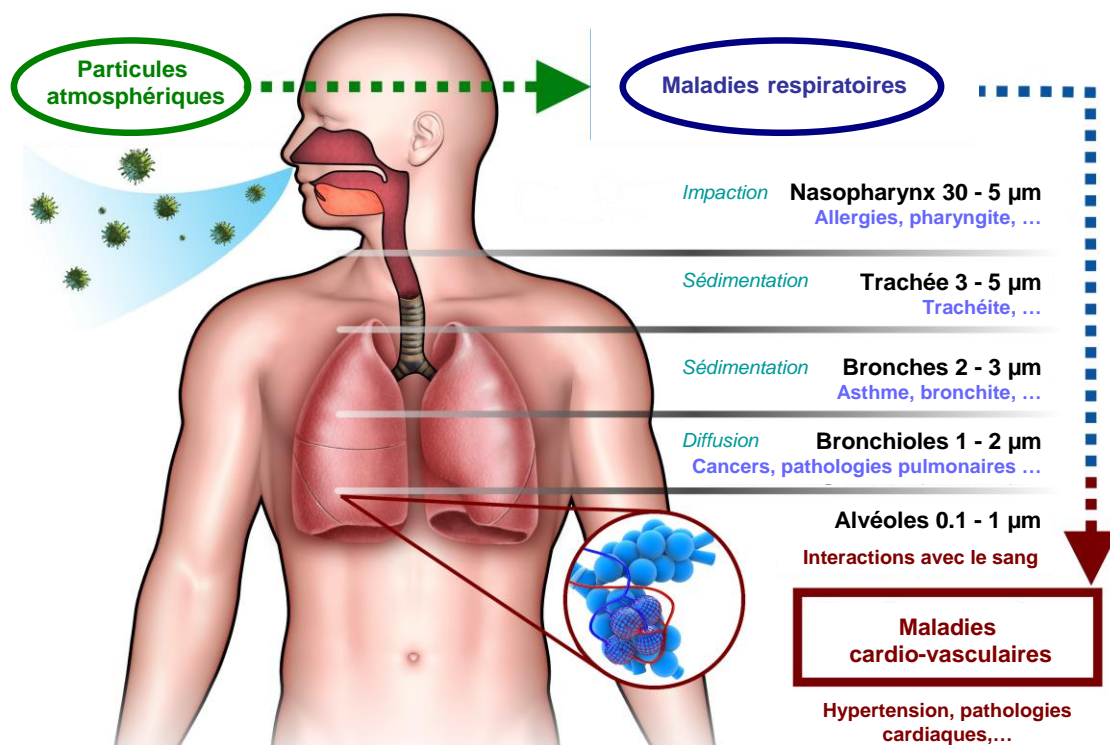


Figure I-4 : Zones et mécanismes de dépôt de particules de différentes tailles dans le système respiratoire et pathologies associées.

D'après la **Figure I-4**, il apparaît que la déposition des particules prend place dans différents niveaux du système respiratoire. Il est important de noter que les gammes

19 Hoh, E.; Hunt, R. N.; Quintana, P. J. E.; Zakarian, J. M.; Chatfield, D. A.; Wittry, B. C.; Rodriguez, E.; Matt, G. E. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 4174-4183.

granulométriques données sur cette figure correspondent à des processus de déposition relatifs à un débit d'air associé à une respiration « normale » (~10 L/min au repos). Le débit d'air au cours de l'inspiration est, en effet, à même d'influencer fortement le mode de dépôt dans l'organisme. Pour une taille de particule définie, des débits élevés vont favoriser la déposition par impaction, particulièrement lors des changements de direction du flux d'air. La sédimentation et la diffusion deviennent successivement majoritaires au fur et à mesure que le débit d'air diminue. Il a été montré que durant un cycle de respiration normale, 70 à 80% des PM₁₀ se déposent dans les voies aériennes supérieures alors qu'elles peuvent se retrouver dans l'ensemble du système respiratoire lorsque le débit n'est que de 2,25 L/min.²⁰ Ainsi, les particules de fumées de cigarette, bien que légèrement plus grosses que celles relatives à la combustion du bois ou à la cuisson des viandes²¹ peuvent se déposer profondément dans le système respiratoire, le débit d'air au cours d'une bouffée de cigarette étant bien plus faible que celui de la respiration normale.

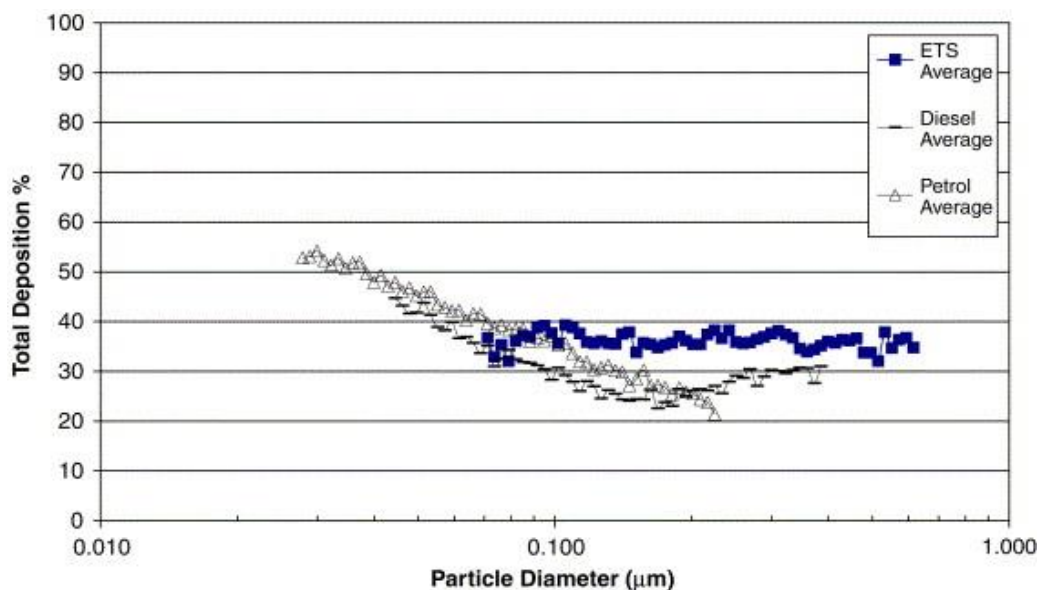


Figure I-5 : Fraction moyenne de déposition dans les voies aériennes de 14 sujets pour 3 aérosols différents²².

Il est également bon de noter que le taux de déposition de la matière particulaire peut être fonction de la taille de celle-ci comme l'indique la **Figure I-5**. Les phénomènes de diffusion et de sédimentation étant les plus favorables à la déposition, les courbes représentant le taux de déposition en fonction de la granulométrie adoptent un profil en V comme le

20 Zhang, Z.; Kleinstreuer, C.; Hyun, S. *J. Aerosol Sci.* **2012**, *46*, 34-52.

21 Kleeman, M. J.; Schauer, J. J.; Cass, G. R. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3516-3523.

22 Morawska, L.; Hofmann, W.; Hitchins-Loveday, J.; Swanson, C.; Mengersen, K. *J. Aerosol Sci.* **2005**, *36*, 939-957.

Contexte général de l'étude

montre celles obtenues par Morawska *et al.* pour des aérosols différents. Ces résultats sont issus d'une série d'expériences réalisées sur 14 sujets différents. Il est clairement visible que d'autres paramètres, liés notamment à la nature de l'aérosol, ont une importance majeure dans les mécanismes de déposition. La forme, la composition chimique ainsi que le potentiel de transformation de l'aérosol dans les conditions physiologiques sont des paramètres susceptibles d'influencer la déposition.

Après avoir établi les principaux processus relatifs à la formation, à la déposition, à la transformation et à la toxicité des particules, nous allons dans le paragraphe suivant donner les principales méthodes permettant de les prélever et de les analyser.

1.3.7. Méthodes de prélèvement et d'analyse des aérosols.

La caractérisation chimique et physique des aérosols requiert la mise en place de techniques adaptées à la fois au prélèvement et à l'analyse. Certains dispositifs associent ces deux aspects, on parlera alors de méthodes *on-line* ou en temps réel. Les autres nommées *off-line* découplent ces deux étapes. Les deux paragraphes suivants traiteront les méthodes disponibles de prélèvement et les méthodes classiques de caractérisation chimique et physique.

1.3.7.A. Méthodes d'échantillonnage.

Plusieurs dispositifs sont disponibles pour assurer le prélèvement des particules dans les atmosphères ouvertes ou confinées. Les plus simples consistent à envoyer l'air à travers un filtre sur lequel sont collectées les particules. Les débits d'air employés, de $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ à $100 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$, la taille et la porosité des filtres et le temps de prélèvement sont fonction de la concentration en particules dans l'atmosphère échantillonnée. La nature du filtre est fonction, quant à lui, de la nature des composés que l'on cherche à analyser. Si les filtres en fibres de verre ou en quartz sont considérés comme universels, les filtres en cellulose sont employés pour l'analyse de la matière minérale et ceux en Téflon pour l'analyse des composés organiques du fait de leur résistance aux solvants organiques.

De manière alternative, le prélèvement des particules peut être réalisé à l'aide d'un collecteur par sédimentation. Assurant la collecte spécifique des particules les plus grosses, ils consistent en un tube dans lequel un vortex est créé. Les particules les plus fines sont maintenues en suspension alors que les plus lourdes sédimentent au fond du cyclone. Un moyen d'obtenir une discrimination en fonction de la taille plus importante est l'emploi d'un impacteur en cascade qui assure le tri des particules en différentes classes granulométriques.

Le principe général, présenté sur la **Figure I-6**, est associé à la variation de la quantité de mouvement en fonction de la masse et donc de la taille des particules. Il est nécessaire que la vitesse de l'air échantillonné soit connue et parfaitement contrôlée. L'écoulement des particules et des gaz pour une atmosphère déterminée est différent. L'inertie des particules les conduit à adopter une trajectoire directe alors que le flux gazeux est dévié par un obstacle. Le tri s'effectue à énergie cinétique des particules –appelée énergie cinétique seuil– constante. En effet, les particules dont l'énergie est inférieure à cette valeur seuil vont adopter le même comportement que les gaz dans lesquels elles se trouvent et seront déviées par un obstacle. A l'inverse, lorsque l'énergie cinétique des particules atteint une valeur seuil, leur inertie est telle qu'elles ne peuvent plus voir leur trajectoire déviée et s'impactent donc sur l'obstacle.

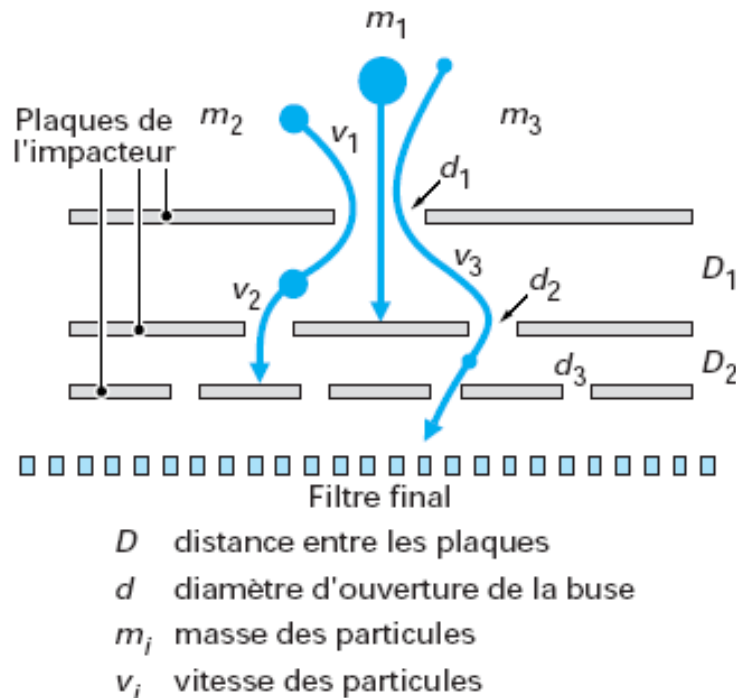


Figure I-6 : Principe d'un impacteur en cascade²³

En pratique, un impacteur en cascade possède plusieurs étages (de 3 à 15) correspondant à des plaques percées de trous dont la taille décroît à mesure que l'on passe des plaques des niveaux supérieures aux plaques des niveaux inférieurs. Le dernier niveau correspond quant à lui un filtre classique permettant de capter les particules les plus fines. D'un niveau à l'autre, les trous sont décalés de manière à ce que deux trous de deux plaques successives ne se trouvent pas en vis-à-vis. Lorsqu'un flux d'air contenant les particules

23 Masolet, P.; Marchand, N. In *Technique de l'ingénieur*; Vol. P4040.

Contexte général de l'étude

atteint le premier niveau avec une vitesse initiale v_1 , les particules les plus grosses (les plus pesantes) possèdent une énergie cinétique supérieure à celle du seuil. Elles s'impactent alors sur le premier niveau alors que les autres suivent le flux de gaz. La restriction de la taille des trous conduit à une augmentation de la vitesse et donc à une augmentation de l'énergie cinétique des particules. Celles qui atteignent alors la valeur seuil s'impacteront sur le second niveau et ainsi de suite. La gamme granulométrique à chaque niveau dépend donc directement de l'évolution de la taille des trous ou buses entre chacun des niveaux de l'impacteur.

1.3.7.B. Méthodes de mesure.

Après la collecte pour les méthodes *off-line* ou, au cours de la collecte pour les techniques *on-line*, différents paramètres peuvent être mesurés : la masse des particules, leur forme, leur nombre, leur taille ou encore leur composition chimique.

1.3.7.B.a. Détermination de la masse de particules.

La mesure de la masse de particules par unité de volume au sein d'une atmosphère contaminée est le principal critère utilisé dans le cadre général de la détermination de la qualité de l'air. La méthode la plus simple est la mesure après collecte sur filtre, à température et humidité constante, de la masse des particules échantillonnées.

Deux méthodes *on-line* peuvent être également utilisées. La première repose sur l'atténuation de la transmission d'un rayonnement radioactif (typiquement le rayonnement β) à mesure que les particules viennent s'impacter sur le filtre. Cette atténuation est liée d'une part au coefficient d'absorption massique et à la densité surfacique en particules du filtre. La seconde, largement répandue dans les réseaux de surveillance de la qualité de l'air est appelée TEOM (Tapered Element Oscillating Microbalance). Par pompage, les particules de l'aérosol sont amenées à se déposer sur un plateau relié à un cristal, le plus souvent en quartz. Sous l'effet de la pression imposée sur le cristal, celui-ci vibre. La fréquence de la vibration est directement liée à la masse du plateau, ainsi une augmentation de la masse des particules sur le plateau conduit à une diminution de la fréquence.

1.3.7.B.b. Détermination de la forme, du nombre et de la taille des particules.

La forme des particules, pour des tailles comprises entre 1 et 1000 nm peut être déterminée par microscopie électronique à balayage. Pour les particules minérales, cette analyse peut être complétée par une analyse par fluorescence X (voir paragraphe suivant) afin d'en obtenir une description élémentaire. Le dépôt de particules doit être de type monocouche

et être suffisamment conducteur pour permettre aux charges induites par le bombardement électronique de s'écouler.

Le nombre de particules est quant à lui obtenu par diffusion de la lumière. Il est au préalable nécessaire de déterminer le coefficient de diffusion des particules à l'aide d'un néphélomètre. Ce coefficient peut être affecté par une forte humidité relative du milieu, une trop grande variation de composition chimique ou de masse des particules.

Au-delà du fractionnement des particules à l'aide des impacteurs en cascade décrits précédemment, il est possible de déterminer individuellement la taille de chaque particule. Pour les particules de taille comprises entre 1 et 10 μm , les compteurs optiques sont les plus couramment employés. Pour un type de particules donné (les suies par exemple), la diffusion de la lumière n'est fonction que de la taille de la particule. Cette mesure souvent appelée diffusion de Mie assure donc l'obtention de la taille particule par particule. Pour les particules les plus fines (1 à 50 nm), la diffusion de la lumière visible n'est pas applicable. On emploie alors la méthode de comptage dite « des noyaux de condensation ». Les particules sont injectées dans une chambre sursaturée en vapeurs d'eau ou d'alcool. Les processus de condensation qui se produisent permettent l'accroissement de la taille des particules et leur mesure par diffusion de Mie.

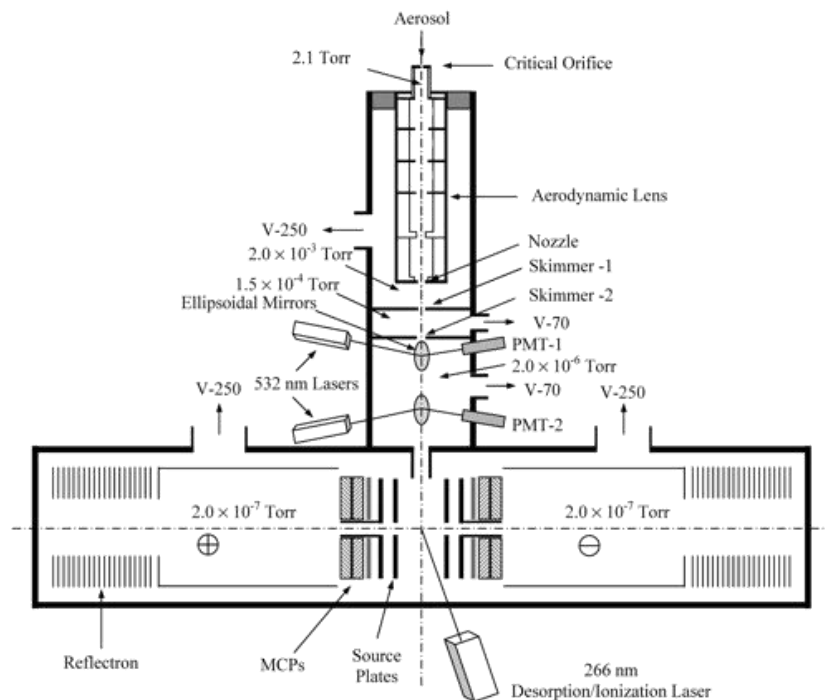


Figure I-7 : Représentation d'un dispositif ATOFMS²⁴

24 Su, Y.; Sipin, M. F.; Furutani, H.; Prather, K. A. *Anal. Chem.* **2003**, *76*, 712-719.

Contexte général de l'étude

Il est également possible de déterminer la composition chimique conjointement à la taille des particules d'un aérosol grâce à des techniques de mesures par spectrométrie de masse à temps de vol des aérosols ou AToFMS associé à des systèmes de lentilles aérodynamique et de mesure de diffusion de la lumière.²⁵ Ainsi, les particules sont classées par gammes de taille de particules et par type de composition chimique (sulfate, nitrates, carbone élémentaire, carbone organique, HAPs,...). Les dispositifs AToFMS sont associés à des systèmes d'ionisation laser comme cela est reporté sur la **Figure I-7**. Ils permettent une acquisition des spectres de masse à une vitesse adaptée à des mesures en temps réel.

1.3.7.B.c. Détermination de composition chimique des particules.

Dans cette partie, les principales techniques de caractérisation chimique des composés présents dans les particules seront citées sans être détaillées. Elles seront développées notamment à travers des exemples ciblés concernant l'analyse de la matière particulaire relative aux fumées de cigarette dans certaines des sections suivantes.

De manière générale, l'ensemble des méthodes couramment employées sont des méthodes en mode différé qui se consacre à la mesure de composés ciblés. Une préparation des échantillons est en effet bien souvent requise. Après extraction par des solvants organiques adaptés en employant classiquement l'activation par ultrasons ou un soxhlet, les composés organiques solubilisés sont fractionnés sur colonne de silice et d'alumine avant d'être analysés par chromatographie liquide ou gazeuse. La détection est réalisée par ionisation de flamme, par capture d'électrons et spectrométrie de masse pour la chromatographie gazeuse et par spectrométrie UV, de fluorescence ou de masse pour la chromatographie liquide. L'analyse de la fraction inorganique peut être menée de manière *in-situ* par fluorescence X, PIXE ou activation neutronique. La mise en solution par lixiviation, attaque acide ou alcaline est requise si l'analyse est réalisée par chromatographie ionique, absorption atomique, émission par plasma inductif ou colorimétrie.

Les analyses en ligne de la composition chimique des particules sont également très répandues et basées sur des propriétés physico-chimiques des aérosols qui peuvent être sensiblement différentes. Les méthodes couramment employées sont la spectrométrie de masse^{26,27}, la spectroscopie photo-acoustique²⁸, la spectrométrie de flamme (espèces soufrées

25 Pratt, K. A.; Prather, K. A. *Mass Spectrom. Rev.* **2012**, *31*, 17-48.

26 Carson, P. G.; Neubauer, K. R.; Johnston, M. V.; Wexler, A. S. *J. Aerosol Sci.* **1995**, *26*, 535-545.

27 Hearn, J. D.; Smith, G. D. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2820-2826.

28 Adams, K. M.; Davis Jr., L. I.; Japar, S. M.; Pierson, W. R. *Atmos. Environ.* **1989**, *23*, 693-700.

et azotées), la fluorescence X.²⁹ Elles permettent une surveillance continue de la qualité de l'air ou de rejets industriels.

I.3.8. Conclusion

L'ensemble des concepts relatifs à la chimie, la physique, la toxicologie ainsi que ceux associés aux prélèvements et à la caractérisation des aérosols ayant été posé, nous allons dans la partie suivante détailler de manière plus exhaustive les principales caractéristiques liées à l'aérosol sujet de cette étude : les fumées de cigarette.

I.4. Les fumées de cigarette : définitions et généralités.

I.4.1. Les différentes classes de fumées de cigarettes.

Il n'existe pas un type de fumées de cigarette mais plusieurs, comme le montre la **Figure I-8**.

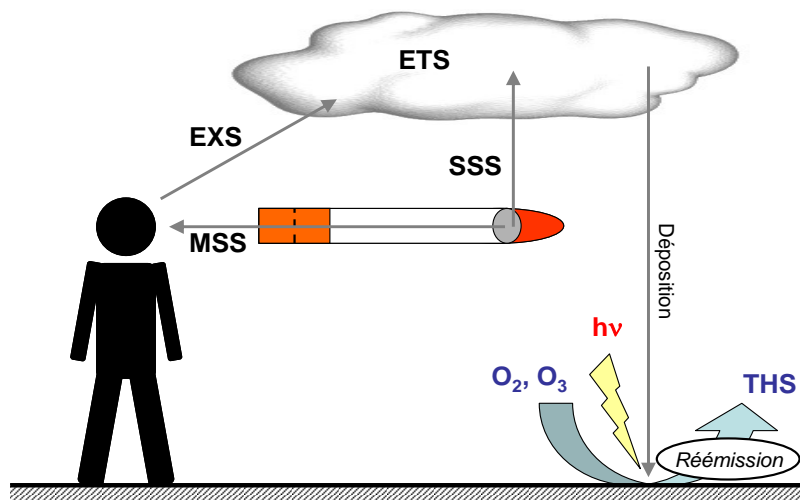


Figure I-8 : Les différents types de fumées de cigarette

En effet, on peut au moins en dénombrer quatre. Les premières correspondent aux fumées inhalées par le fumeur et sont relatives au courant principal. On les appelle MSS pour *Mainstream Smoke*. Lorsqu'elles sont exhalées, ces fumées sont appelées EXS (*Exhaled Smoke*), elles s'associent avec les fumées du courant secondaire ou SSS (*Sidestream Smoke*) qui émanent de l'extrémité de la cigarette entre deux bouffées pour former les ETS ou

29 McMurry, P. H. *Atmos. Environ.* **2000**, 34, 1959-1999.

Contexte général de l'étude

Environmental Tobacco Smoke. Finalement certaines fractions de ces ETS peuvent, après s'être déposées et avoir subi des processus d'oxydation ou des transformations photochimiques, être remises en suspension pour constituer les THS ou *Third Hand Smoke*. Une description de chacune de ces fumées va être réalisée dans les paragraphes suivants.

I.4.1.A. Le courant principal de fumée (MSS)

Il correspond aux fumées inhalées par le fumeur au cours d'une bouffée. Les processus de combustion qui seront décrits un peu plus loin, sont les principaux responsables de la production de ces fumées. La température de ces fumées est par conséquent très importante. Avant leur inhalation lors du tirage, ces fumées traversent tout le tube de tabac non brûlé, ainsi que le filtre de la cigarette. Leur composition est extrêmement complexe et diverse puisque les espèces qui les composent proviennent de la combustion et de la pyrolyse du tabac et du papier mais aussi des composés du tabac qui ont distillé sous l'effet du courant de gaz chaud. Par ailleurs, le tabac non brûlé et le filtre conduisent également à modifier la nature et la distribution des espèces initialement produites dans la zone de combustion par fixation ou rétention de certaines classes d'espèces.

I.4.1.B. Les fumées expirées (EXS)

Ces fumées ont été définies comme étant des MSS expirées, après leur passage au travers du système respiratoire du fumeur actif. Elles représentent 15 à 43% de la phase particulaire et 1 à 13% de la phase gazeuse des ETS³⁰. Les propriétés des fluides physiologiques et des muqueuses du système respiratoire sont à même de modifier la nature des espèces présentes dans les phases gazeuses et particulaires si on les compare au MSS. Ces fumées n'ont à notre connaissance fait l'objet que de peu d'études.

I.4.1.C. Le courant secondaire de fumée (SSS)

Les fumées de type secondaires sont émises à l'extrémité de la cigarette durant la phase de consommation de la cigarette entre deux bouffées. Pendant cette étape, la combustion est entretenue uniquement par l'apport convectif d'oxygène aux abords du foyer, ce qui implique une cinétique plus lente mais également une température plus basse que durant une bouffée. Les processus ayant lieu sont principalement ceux de la pyrolyse. L'essentiel de la matière particulaire est directement émise de la zone de pyrolyse dans l'atmosphère, sans filtration ou discrimination d'aucune sorte.

30 Borgerding, M.; Klus, H. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2005**, *57*, 43-73.

I.4.1.D. Les fumées de tabac environnementales (ETS)

Les ETS représentent toutes les fumées de cigarettes émises dans l'atmosphère et donc inhalables par les fumeurs actifs ou passifs. C'est la raison pour laquelle, l'analyse des ETS est bien documentée et un certain nombre d'études comme celle de Pandey *et al.* leur ont été consacrées.³¹ Ces études portent classiquement sur l'analyse de la fraction gazeuse et/ou particulaire au sein d'un espace clos après qu'un nombre donné de cigarettes y ait été fumées. De cette manière, certaines molécules ont été définies comme des marqueurs de la phase particulaire (solanesol) ou de la phase gazeuse (nicotine, 2,5-diméthylfurane) des ETS. La concentration en 2,5 diméthylfurane (2,5-DMF) est ainsi, fortement corrélée avec l'émission d'ETS.³² Très peu d'autres sources sont à l'origine de ce composé en atmosphère intérieure. De plus, les variations de la concentration au cours du temps du 2,5-DMF sont identiques à celles d'un grand nombre de molécules associées aux fumées de cigarettes. Il est ainsi possible, grâce à cette molécule de suivre spécifiquement la dissipation des ETS dans des espaces confinés soumis à différents niveaux de ventilation.³³ Après une heure de ventilation forcée, la concentration de ce traceur (et donc des composés relatifs aux ETS) est revenue à son niveau d'origine. A l'inverse, en atmosphère confinée, certaines molécules associées aux ETS ont pu encore être détectées 48 h après que des cigarettes aient été fumées dans cet espace. Dans ce dernier cas, la diminution de concentration des ETS peut être expliquée par :

- la dissipation de la fumée par les aérations et les mouvements d'air dans la pièce ;
- l'adsorption à la surface des meubles, moquettes, peintures,... présents dans la pièce ;
- la transformation des molécules sous l'action de l'oxygène et de la lumière ;
- la combinaison de processus d'adsorption et de transformation chimique (sous l'effet de l'oxygène notamment) ou photochimique (effet du rayonnement UV et visible) pour former des SOA qui s'ils sont remis en suspension dans l'air sont appelés courant tertiaire de fumées (THS).

I.4.1.E. Le courant tertiaire de fumée (THS)

Le courant tertiaire correspond à l'émission dans les milieux confinés de SOA d'ETS. Il peut prendre place sur des périodes de temps comprises entre quelques heures et plusieurs

31 Pandey, S. K.; Kim, K.-H. *Trac-Trend Anal. Chem.* **2010**, *29*, 804-819.

32 Alonso, M.; Godayol, A.; Antico, E.; Sanchez, J. M. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 8289-8294.

33 Xie, J.; Wang, X.; Sheng, G.; Bi, X.; Fu, J. *Atm. Environ.* **2003**, *37*, 3365-3374.

Contexte général de l'étude

mois.³⁴ Durant cette période, les composés de la fumée qui se sont déposés comme par exemple la nicotine, peuvent subir des réactions chimiques dépendantes de la nature de la surface où le dépôt a eu lieu, de l'humidité, de la présence de molécules réactives (ozone, radicaux...) ou de la lumière.³⁵ Des composés oxygénés non présents dans les fumées initiales ainsi que des particules ultrafines peuvent être formés et donc observés. Sleiman *et al.* ont plus spécifiquement montré que des particules ultrafines de diamètre aérodynamique centré autour de 60 nm apparaissent après exposition des ETS à l'ozone.³⁶ Leur taille leur permet de se répandre et d'être fixées très facilement par diffusion dans les voies respiratoire profondes. Ce type de fumée mérite d'autant plus d'attention que les personnes les plus exposées sont les enfants en bas âge qui brassent et respirent l'air très proche du sol. En conséquence, l'analyse de la matière particulaire des ETS est d'autant plus pertinente.

I.4.2. Toxicité des fumées de cigarette

Un grand nombre d'études épidémiologiques ont mis en évidence l'aspect néfaste des fumées de cigarettes³⁷. Une étude menée sur une période de 50 ans portant sur des sujets masculins, dont une partie des résultats est présentée sur la **Figure I-9**, montre que la différence de taux de mortalité entre fumeurs et non fumeurs s'élève à 23% à l'âge de 70 ans et que pour un même taux de survie, les fumeurs perdent en moyenne 10 ans d'espérance de vie.

Ceci est cohérent avec les résultats obtenus par Valdes *et al.* en 2005 montrant que les fumeurs sont biologiquement plus âgés d'environ 8 ans.³⁸ Les maladies liées au tabagisme sont le plus souvent des cancers ainsi que des pathologies cardio-vasculaires et/ou respiratoires. Au total, elles seraient responsables d'environ 15% des cancers dans le monde et de 80 à 90 % des cancers du poumon aux Etats-Unis à la fin des années 90.³⁹ En effet, parmi les 4800 composés identifiés, 69 sont considérés comme cancérigènes et plusieurs sont à l'origine de l'apparition de tumeurs. Parmi ces composés, on trouve un certain nombre de molécules dont la toxicité est avérée, qu'elles se trouvent dans la phase gazeuse ou

34 Petrick, L. M.; Sleiman, M.; Dubowski, Y.; Gundel, L. A.; Destailats, H. *Atmos. Environ.* **2011**, *45*, 4959-4965.

35 Petrick, L. M.; Svidovsky, A.; Dubowski, Y. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 328-333.

36 Sleiman, M.; Destailats, H.; Smith, J. D.; Liu, C.-L.; Ahmed, M.; Wilson, K. R.; Gundel, L. A. *Atmos. Environ.* **2010**, *44*, 4191-4198.

37 Bernhard, D. *Cigarette smoke toxicity: Linking Individual Chemicals to Human Diseases*; Wiley-VCH, 2011.

38 Valdes, A.; Andrew, T.; Gardner, J.; Kimura, M.; Oelsner, E.; Cherkas, L.; Aviv, A.; Spector, T. *Lancet* **2005**, *366*, 662-664.

39 Hoffmann, D.; Hoffmann, I.; El-Bayoumy, K. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 767-790.

particulaire (HAP, aldéhydes, monoxyde de carbone, nitrosamines...). Au niveau pathologique, leur activité peut s'exprimer directement, ou indirectement au travers de l'apparition d'un stress oxydant lié à leur biotransformation c'est-à-dire leur métabolisation. L'exemple du benzo(a)pyrène (BaP) est le plus connu, puisque son activité toxicologique ne se manifeste qu'après une série de réactions d'oxydation conduisant à la formation de fonctions hydroxyles et époxys qui sont alors en mesure de former des liaisons covalentes avec l'ADN. Il en est de même pour certaines nitrosamines, composés dérivés de la nicotine, comme le 4-(méthylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ou la N'-nitrosornicotine (NNN), dont l'activité cancérigène ne s'exprime qu'après métabolisation dans l'organisme.⁴⁰ Ces composés sont inhalés par le fumeur (tabagisme actif), mais également par les personnes présentes dans son environnement (tabagisme passif) qui sont exposées aux fumées émises entre deux bouffées.

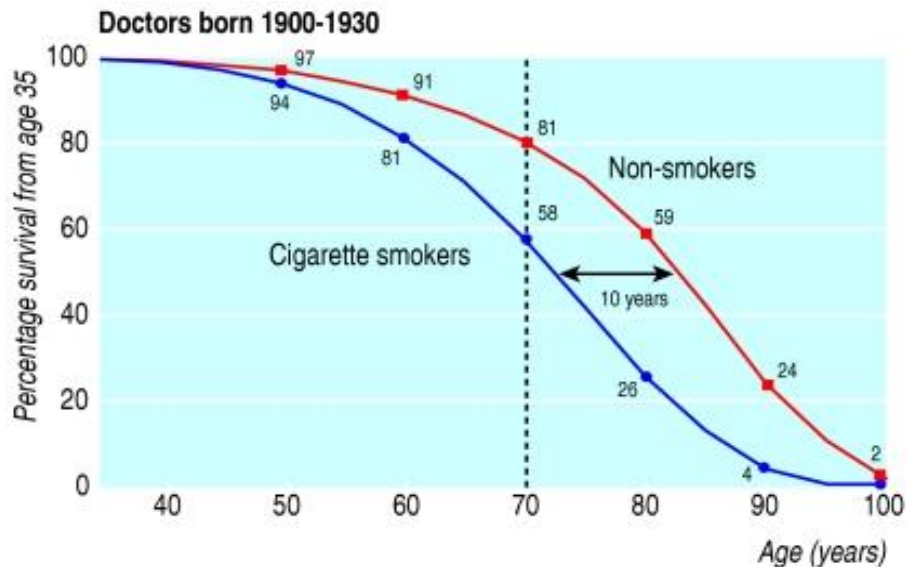


Figure I-9 : Comparaison du taux de survivants masculins fumeur et non fumeur⁴¹.

Il est donc légitime de s'interroger sur de potentielles ressemblances et/ou différences de composition entre les MSS et les ETS. A ce titre, une étude de la composition chimique de ces différentes fumées est nécessaire, nous allons en détailler l'état de l'art dans un prochain paragraphe. Cependant, il apparaît pertinent au préalable que soient présentés d'une part, les principaux constituants présents dans les cigarettes avant leur consommation et d'autre part, les principaux processus qui conduisent à leur transformation en constituants de la fumée de cigarette voire dans certains cas à leur transfert dans celle-ci.

40 Hecht, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 160-171.

41 Doll, R.; Peto, R.; Boreham, J.; Sutherland, I. *BMJ* **2004**, *238*, 1519.

Contexte général de l'étude

I.4.3. Les constituants d'une cigarette.

I.4.3.A. Le tabac

Le tabac est issu de matière végétale et plus particulièrement de la feuille de *Nicotiana tabacum*. Elle contient une grande diversité de molécules hydrocarbonées souvent oxygénées et/ou azotées : alcools, phénols, acides carboxyliques, acides aminées, alcaloïdes...⁴² mais aussi des bio-polymères comme la cellulose, l'hémicellulose ou la lignine. Certaines de ces molécules sont représentées sur la **Figure I-10**.

La culture des tabacs a lieu à des endroits différents de la planète et donc sur des sols et selon des conditions de culture différentes. Une fois les feuilles de tabac cultivées, elles sont séchées selon des protocoles différents (soleil, air chaud, feu). On obtient ainsi différents types de tabac, les plus répandus se nomment Virginie, Maryland, Burley et Oriental. A ces quatre grands types de tabac, des tabacs dit reconstitués, obtenus à partir des sous produits du tabac ou de tabac expansé (gonflement artificiel des structures cellulaires) peuvent être employés dans la conception d'une cigarette. Classiquement, une cigarette résulte de l'assemblage de tout ou partie des quatre types principaux de tabac afin de moduler la texture, l'arôme et le prix du produit final. Adam *et al.* ont par ailleurs montré que les produits de la combustion de ces quatre types de tabac conduit à la formation de molécules quantitativement voire qualitativement différentes.⁴³

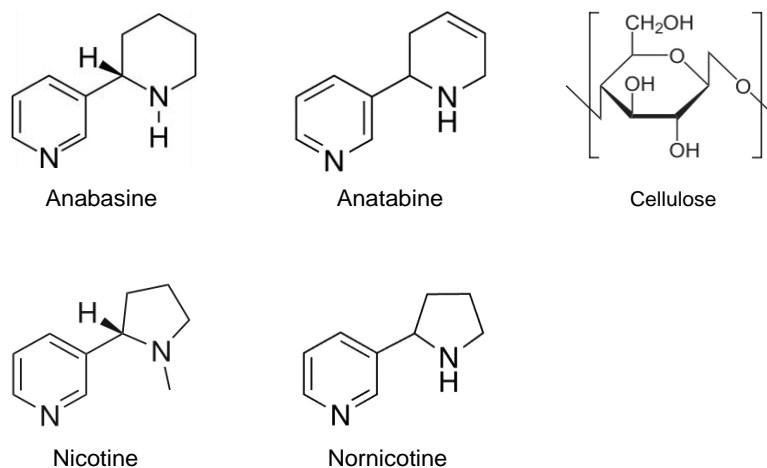


Figure I-10 : Structure de quelques molécules présentes dans le tabac.

La préparation du tabac avant la fabrication d'une cigarette s'achève par l'étape dite de « sauçage ». Elle consiste à pulvériser le tabac d'un certain nombre d'additifs. Cela a

42 Schmeltz, I.; Hoffmann, D. *Chem. Rev.* **1977**, 77, 295-311.

43 Adam, T.; Mitschke, S.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 572, 219-229.

également pour effet de modifier chimiquement la composition des fumées.⁴⁴ Une grande partie des additifs employés a pour objectif d'aromatiser les fumées. A ce titre, le menthol est l'un des plus connus.⁴⁵ L'addition de sucre est également connue pour aromatiser les fumées mais a aussi pour conséquence d'augmenter au sein des fumées la teneur en aldéhydes et en acides carboxyliques.⁴⁶ L'ajout d'ammoniaque dans le tabac permet d'ajuster le pH autour de 7 permettant ainsi d'adoucir les fumées. La quantité totale de nicotine vaporisée au cours de la combustion d'une cigarette est cependant invariante de la valeur du pH.⁴⁷ L'ajout d'acétaldéhyde quant à lui est soupçonné d'augmenter l'addiction à la cigarette.⁴⁸ Certaines molécules telles que la glycérine sont également ajoutées dans le but d'augmenter la qualité de la conservation d'une cigarette en préservant notamment son taux d'humidité.⁴⁹

I.4.3.A. Le filtre et le papier.

Le papier de la cigarette est formé essentiellement de cellulose, de fibre de renfort et d'additifs inorganiques (nitrates, phosphates) qui sont employés pour réguler la combustion (carbonate de calcium) ou pour l'esthétique. Il a pour objectif premier d'assurer la tenue mécanique de la cigarette au cours de sa fabrication et de sa consommation. Il a une influence tant qualitative que quantitative sur la composition des fumées de cigarette. Outre les composés qui sont associés à sa combustion, ses propriétés de perméabilité à l'air ambiant permettent un effet de dilution plus ou moins important qui a une influence significative sur la nature et la quantité des produits issus de la combustion ou de la pyrolyse du tabac.

Le filtre de la cigarette est constitué d'acétate de cellulose. Le degré de ventilation permis par le filtre est à relier à la densité de trous latéraux qui le caractérise. Son action est double au niveau de la fumée de cigarette. Il assure la rétention des particules dont la taille est supérieure à 0,25µm,⁵⁰ et il a un effet notoire sur la dilution des fumées au travers des aérations du papier qui le constitue. Cette dilution a pour effet la diminution de la concentration des molécules dans les fumées, et participe aux spécificités des cigarettes « regular », « light » ou « extra-light ».

-
- 44 Baker, R. R.; Pereira da Silva, J. R.; Smith, G. *Food Chem Toxicol* **2004**, *42*, Supplement, 3-37.
45 Gordon, S. M.; Brinkman, M. C.; Meng, R. Q.; Anderson, G. M.; Chuang, J. C.; Kroeger, R. R.; Reyes, I. L.; Clark, P. I. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1744-1753.
46 Talhout, R.; Opperhuizen, A.; van Amsterdam, J. G. C. *Food Chem Toxicol* **2006**, *44*, 1789-1798.
47 Callicutt, C. H.; Cox, R. H.; Hsu, F.; Kinser, R. D.; Laffoon, S. W.; Lee, P. N.; Podraza, K. F.; Sanders, E. B.; Seeman, J. I. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2006**, *46*, 1-17.
48 Talhout, R.; Opperhuizen, A.; van Amsterdam, J. G. C. *Eur. Neuropsychopharm.* **2007**, *17*, 627-636.
49 Carmines, E. L.; Gaworski, C. L. *Food Chem Toxicol* **2005**, *43*, 1521-1539.
50 Becquemin, M. H.; Bertholon, J. F.; Attoui, M.; Roy, F.; Roy, M.; Dautzenberg, B. *Rev. Mal. Respir.* **2007**, *24*, 845-852.

Contexte général de l'étude

I.4.4. Processus à l'œuvre durant le fumage d'une cigarette.

Lorsqu'un fumeur allume sa cigarette, il initie une série de processus chimiques impliquant la transformation ou la formation de certaines molécules, des phénomènes d'échange de chaleur, de matière ou de molécules. Ces différents processus se localisent à des endroits spécifiques de la cigarette comme le montre la **Figure I-11**. L'ensemble de ces phénomènes va être traité de manière détaillée.

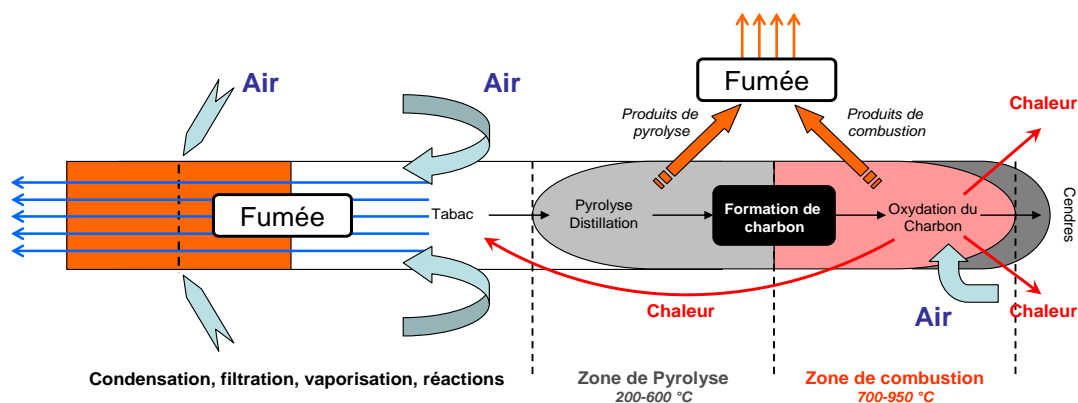


Figure I-11 : Processus mis en œuvre durant le fumage d'une cigarette

I.4.4.A. La zone de pyrolyse.

Il s'agit de la zone intermédiaire entre la zone de combustion et le tabac. Elle est caractérisée par une pauvreté en oxygène et une température comprise entre 200 et 600°C. Ces conditions conduisent à favoriser les réactions de pyrolyse, qui sont entretenues grâce à la chaleur apportée par la zone de combustion. Elle génère un nombre de composés conséquents à des teneurs diverses.⁵¹ C'est de cette partie de la cigarette que provient l'essentiel de la matière particulaire présente dans les fumées.

I.4.4.A.a. La pyrolyse de composés hétérocycliques azotés.

La nicotine ainsi que ses dérivés, présentent des hétérocycles azotés qu'ils soient ou non aromatiques. Leur pyrolyse suit les mécanismes proposés par Winkler *et al.*⁵² Dans la plupart des cas, pour une molécule donnée, entre 15 et 20 composés sont produits. On observe fréquemment des composés hétéro-aromatiques condensés, des HAPs, ainsi que leur homologues cyano-substitués. Les mécanismes font régulièrement intervenir le départ de petites molécules volatiles contenant un nombre limité d'atomes de carbone (cyanure d'hydrogène, acétylène, acétonitrile...) et font également apparaître des espèces radicalaires.

51 Baker, R. R.; Bishop, L. J. *J. of Anal. Appl. Pyrol.* **2004**, 71, 223-311.

52 Winkler, J. K.; Karow, W.; Rademacher, P. *Gas phase pyrolysis of heterocyclic compounds, part 3. Flow pyrolysis and annulation reactions of some nitrogen heterocycles. A product oriented study.*, **2000**.

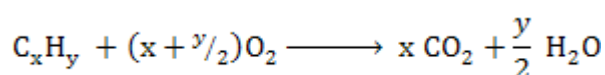
1.4.4.A.b. La pyrolyse de la biomasse.

Le tabac ayant pour origine un végétal, une partie des mécanismes associés à sa pyrolyse peuvent être identifiés à ceux de la pyrolyse de la biomasse. Les mécanismes impliqués sont aujourd'hui bien connus.^{53,54} Dans le cas de la cellulose et de l'hémicellulose, le mécanisme proposé le plus largement accepté est, le mécanisme de Waterloo.⁵⁵ Il met en jeu la compétition de trois réactions : la fragmentation de la cellulose ou de l'hémicellulose, leur dépolymérisation et leur déshydratation, la température étant un paramètre déterminant dans la prépondérance de l'un ou l'autre de ces processus. A haute température (600°C), la fragmentation des molécules associées à la biomasse entraîne l'apparition en phase gazeuse d'espèces carbonylées, d'hétérocycles oxygénés, d'acides et/ou d'alcools. A des températures plus basses (inférieure à 450°C), la dépolymérisation devient prépondérante provoquant ainsi l'apparition de sucres sous forme anhydre. Lorsque la température est inférieure à 350 °C, les réactions de déshydratation et de déshydrogénation sont majoritaires. Elles s'accompagnent de la formation de H₂, de vapeur d'eau et de charbons principalement constitués de carbone élémentaire. Une fraction de ces charbons sert à l'entretien de la combustion alors qu'une autre, appelée suie, est émise dans l'atmosphère.

1.4.4.B. La zone de combustion.

La zone de combustion correspond à l'extrémité de la cigarette. C'est la partie la plus chaude, les températures sont comprises entre 700 et 950°C. Elle se caractérise par un apport important d'oxygène. Celui-ci alimente la combustion du charbon produit par la pyrolyse du tabac. Cet apport est également renouvelé par les mouvements de convection de l'air à proximité du foyer de combustion ou lors de l'aspiration du fumeur lorsque celui-ci inhale une bouffée.

Les produits formés dans cette zone sont fortement dépendants de la quantité d'oxygène apportée au foyer de combustion. Plus la teneur en oxygène sera importante, plus la combustion sera complète. Les produits formés seront alors essentiellement de l'eau et du dioxyde de carbone selon la réaction :



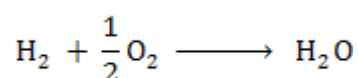
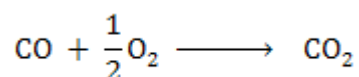
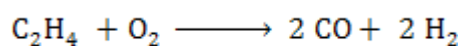
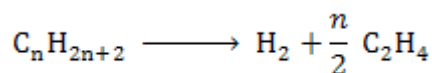
53 Faix, O.; Meier, D.; Fortmann, I. *Holz Roh. Werkst.* **1990**, *48*, 281-285.

54 Van de Velden, M.; Baeyens, J.; Brems, A.; Janssens, B.; Dewil, R. *Renew. Energ.* **2010**, *35*, 232-242.

55 Boukis, I. Thèse de doctorat, University of Aston, Birmingham, **1997**.

Contexte général de l'étude

Aux abords de la zone de pyrolyse, la teneur en oxygène diminue fortement et des composés moins oxygénés, comme le monoxyde de carbone, peuvent alors être formés. Les réactions mises en jeu sont plus nombreuses et font intervenir des espèces comme le monoxyde de carbone et le dihydrogène.



Les réactions s'apparentent alors à des processus pyrolytiques. Il est important de garder à l'esprit que les réactions de combustion sont fortement dépendantes du combustible. Il s'agit ici essentiellement de processus impliquant de composés fortement carbonés produit par la pyrolyse de la biomasse pauvres en atomes d'hydrogène. La présence d'atomes d'azote dans les composés du tabac conduit également à la formation significative d'oxydes d'azote NO^\bullet et NO_2^\bullet .

La matière imbrulée constitue les cendres et contient essentiellement des espèces inorganiques (métaux, oxydes métalliques ou sels).⁵⁶ Par effet mécanique lors d'une bouffée, il est possible que des particules de taille grossière d'un diamètre voisin ou supérieur à 10 μm soient arrachées des cendres.

I.4.4.C. Parcours des fumées au sein de la cigarette

Lors du passage des fumées au travers de la colonne de tabac, la dilution des fumées due à la perméabilité du papier conduit à une diminution rapide de la température des fumées avec l'éloignement au foyer de combustion. Des phénomènes de condensation sous forme de gouttelettes peuvent avoir lieu et conduire à la déposition de certaines molécules produites au cours de la combustion sur la fraction imbrulée du tabac. De la même manière, la matière particulaire des fumées va être « filtrée » par le tabac. Chaque bouffée va donc altérer la composition du tabac entre le foyer et le filtre et conduire à une modification de la composition chimique des fumées lorsque ce tabac entrera dans la zone de combustion ou de

56 Pérez-Bernal, J. L.; Amigo, J. M.; Fernandez-Torres, R.; Bello, M. A.; Callejon-Mochon, M. *Forensic Sci. Int.* **2011**, *204*, 119-125.

pyrolyse. De la même manière, la combinaison température/courant des fumées peut permettre à certains composés volatils ou semi-volatils contenu initialement dans le tabac de passer en phase gazeuse et/ou de s'adsorber sur la phase particulaire sous l'effet du flux de fumées "chaud" qui traverse le tabac imbrulé.

Ces processus ont été illustrés par des études menées en temps réel permettant une analyse bouffées par bouffées, réalisées notamment par l'équipe de Zimmermann⁵⁷. Elles montrent par exemple, que la concentration de certaines molécules comme l'acétaldéhyde augmentent progressivement avec l'avancée de la procédure de fumage de la cigarette.

Il apparait au regard des différents processus décrit dans les paragraphes précédents que les processus conduisant à la production des MSS et des SSS peut être significativement différent. En conséquence, les fumées inspirées par le fumeur et celle inhalées par le fumeur passif peut être différentes. La partie suivante consacrée à l'analyse des différents types de fumée de cigarette va apporter d'ores et déjà un certain nombre d'éléments tangibles à ce propos.

I.5. Analyses des différentes classes de fumées.

I.5.1. Introduction

Différentes méthodologies ont été mises en place pour réaliser l'analyse ciblée ou non ciblée des différentes fumées de cigarettes. Certaines s'intéressent spécifiquement à un composé particulier, elles seront détaillées en premier lieu. D'autres ont pour but de déterminer comment évolue la composition des fumées et notamment celle des MSS au cours du processus de fumage et s'intéressent plus spécifiquement à une analyse bouffée par bouffée. Enfin, les techniques d'analyse en temps réel, dites également technique *on-line*, feront l'objet d'un paragraphe à la fin de cette partie.

I.5.2. Les composés aromatiques

I.5.2.A. Les HAPs

Les risques toxicologiques associés à une exposition à ces contaminants environnementaux ont conduit depuis plusieurs décennies à largement les étudier. Il s'agit de

⁵⁷ Adam, T.; Mitschke, S.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 572, 219-229.

Contexte général de l'étude

molécules purement hydrocarbonées, formés par condensation de cycles aromatiques. Ce sont des molécules planes possédant un coefficient de partage eau/octanol élevé. Ils présentent ainsi une capacité d'adsorption élevée à la surface des particules atmosphériques et un fort potentiel de bioconcentration dans les organismes.⁵⁸ Du nombre de cycles accolés dépend leur présence en phase gazeuse ou en phase particulaire voire, dans ces deux phases. Les composés possédant une forte pression de vapeur saturante comme le naphthalène (deux cycles, **Figure I-12**) se trouve essentiellement dans la phase gazeuse alors que les moins volatils sont exclusivement présents dans la phase particulaire.⁵⁹ Les HAPs à quatre cycles sont partagés dans les deux phases. La température, l'humidité^{60,61} et la taille des particules⁶² sont autant de paramètres qui peuvent modifier ce partitionnement.

Classiquement les méthodes analytiques employées pour leur étude sont développées en chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un spectromètre de masse. Il a ainsi été montré que la concentration en HAP peut varier de 10 ng/cig (ng/cigarette) pour le benzo(k)fluoranthène à 500 ng/cigarette pour le naphthalène, dans les MSS selon les cigarettes étudiées.⁶³

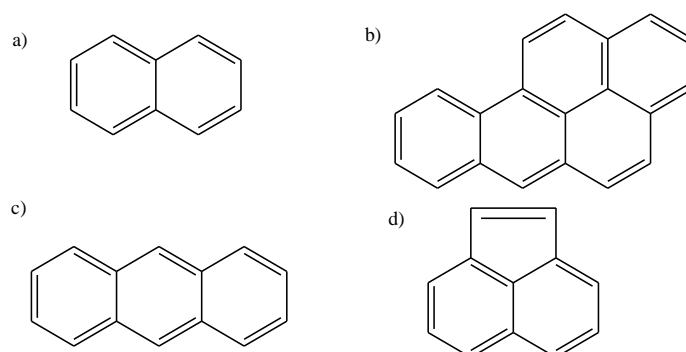


Figure I-12 : Structure moléculaire de quelques HAPs a) naphthalène b) benzo[a]pyrène c) anthracène et, d) acénaphthylène

I.5.2.B. Les nitro-HAPs

Il s'agit de composés aromatiques polycycliques nitro-substitués (**Figure I-13**). Ils résultent en général de la réaction de HAPs avec des polluants atmosphériques ou des produits de combustion. Deux voies de formations peuvent être distinguées. La première correspond à des réactions d'addition du radical $\bullet\text{OH}$ suivie d'une réaction avec le dioxyde d'azote et du

- 58 Sloof, W.; Janus, J. A.; Matthijsen, A. J. C. M.; Montizaan, G. K.; Ros, J. P. M.; National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM): Buthoven, Netherlands, 1989, pp 199.
- 59 Kalaitzoglou, M.; Samara, C. *Food Chem Toxicol* **2006**, *44*, 1432-1442.
- 60 Yamasaki, H.; Kuwata, K.; Miyamoto, H. *Environ. Sci. Technol.* **1982**, *16*, 189-194.
- 61 Pankov, J. F.; Storay, J. M. E.; Yamasaki, H. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 4087-4099.
- 62 Offenberg, J. H.; Backer, J. E. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 1205-1220.
- 63 Ding, Y. S.; Trommel, J. S.; Yan, X. J.; Ashley, D.; Watson, C. H. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *39*, 471-478.

départ d'une molécule d'eau. La seconde voie est la nitration électrophile au cours de la combustion. Cette voie est la voie principale de formation des nitro-HAPs présents dans les fumées de cigarettes. A la différence des HAPs qui ne présentent généralement d'effets délétères qu'après métabolisation par les organismes vivants, les dérivés nitrés ont un pouvoir mutagène direct. Ils sont donc plus dangereux que les HAPs. En effet leur pouvoir cancérigène peut être jusqu'à 100 000 fois supérieur à celui des analogues non nitrés.⁶⁴

Leur teneur dans les fumées s'élève à quelques picogrammes par cigarette ce qui rend leur détection et leur analyse particulièrement délicate au regard notamment, de la complexité de la matrice.

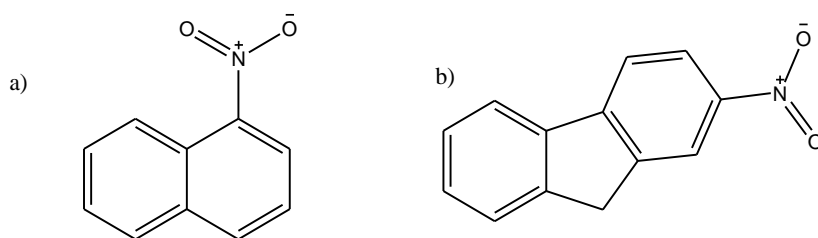


Figure I-13 : Structure du a) 1-nitronaphtalène et du b) 2-nitrofluorène

L'analyse par GC-MS a permis la quantification de deux nitro-naphtalènes dans les MSS et les SSS.⁶⁵ Une concentration de l'ordre de 20 pg/cig en 1-nitro-naphtalène a été obtenue pour les MSS, alors qu'elle atteint 40 à 60 ng/cig dans les SSS.

I.5.2.C. Les composés à cycles aromatiques azotés

Parmi les composés hétérocycliques azotés, on peut distinguer deux familles : les composés dérivés de la pyridine et les azaarènes.

➤ Les pyridines

Elles correspondent à des composés hétérocycliques aromatiques pouvant être conjugués contenant au minimum un atome d'azote. Elles sont caractérisées par une forte odeur et une toxicité importante notamment pour le système respiratoire et les organes de reproduction. Il est important de pouvoir les détecter à des teneurs faibles. Saha *et al.* ont proposé une méthode d'analyse de la pyridine, de la 2-picoline et de la 4-picoline, comportant une étape de préparation, une étape d'extraction en phase solide (SPE), une étape de séparation par chromatographie liquide (HPLC) ainsi qu'une étape de détection sélective par

64 Durant, J. L.; Busby JR, W. F.; Lafleur, A. L.; Penman, B. W.; Crespi, C. L. *Mutat. Res-Genet. Tox.* **1996**, *371*, 123-157.

65 Havey, C.; Dane, A.; Abbas-Hawks, C.; Voorhees, K. In *Environmental Chemistry Letters*; Springer Berlin / Heidelberg, 2009; Vol. 7, pp 331-336.

Contexte général de l'étude

spectrométrie de masse en tandem associée à une ionisation par électro-nébulisation (ESI).⁶⁶ Des limites de détection de 1,74 ng/cig à 14,32 ng/cig associées à des écart-types faibles permettent une quantification fiable de ces composés dans les fumées. Les résultats montrent que la pyridine est présente à hauteur de 3 à 9 µg/cigarette dans les MSS. Les composés méthylés de la pyridine sont présents à des teneurs comprises entre 0,3 et 6 µg/cigarette.

➤ Les azaarènes

Les azaarènes ont une structure similaire aux HAPs, un ou plusieurs atomes d'azote venant en substitution d'un ou plusieurs atomes de carbone au sein du système conjugué (**Figure I-14**). Ils se forment principalement au cours de processus de pyrolyse de la matière organique azotée. Comme les HAPs, les azaarènes sont des composés semi-volatils, ils se partagent donc entre la phase gazeuse et la phase particulaire. Ils font l'objet de très peu d'études dans les fumées de cigarette. Seule la concentration de la quinoline a été déterminée par LC-ESI-MS/MS, elle est d'environ 1 µg/cigarette dans les MSS.⁶⁷

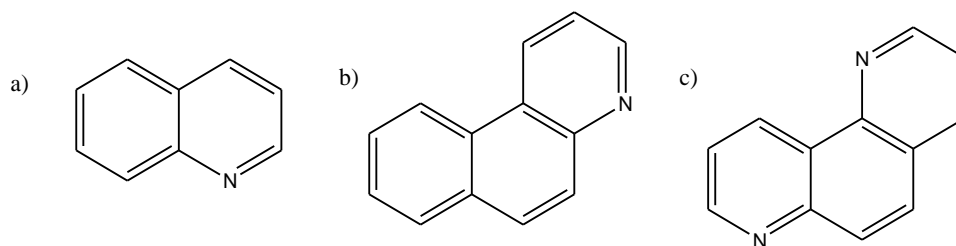


Figure I-14 : Structure de quelques azaarènes : a) quinoline b) benzo(f)quinoline et c) 1,7-phenantroline

➤ Les amines aromatiques.

Les amines aromatiques correspondent à des cycles benzéniques ou des structures aromatiques condensées (HAPs) pour lesquels au moins un atome de carbone est substitué par un atome d'azote associé à une fonction amine (**Figure I-15**). De par leur toxicité, elles représentent un risque important pour l'Homme, d'où un fort développement méthodologique pour en assurer la quantification, notamment par GC-MS,^{68,69} ou encore par LC-ESI-MS/MS.⁷⁰

66 Saha, S.; Mistri, R.; Ray, B. C. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 307-311.

67 Saha, S.; Mistri, R.; Ray, B. C. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 307-311.

68 Smith, C. J.; Dooly, G. L.; Moldoveanu, S. C. *J. Chromatogr. A* **2003**, *991*, 99-107.

69 Forehand, J. B.; Dooly, G. L.; Moldoveanu, S. C. *J. Chromatogr. A* **2000**, *898*, 111-124.

70 Saha, S.; Mistri, R.; Ray, B. C. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3059-3063.

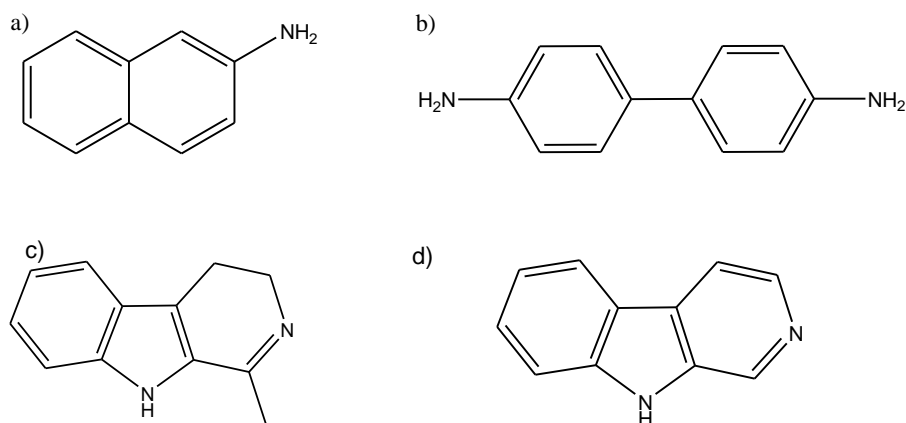


Figure I-15 : Structure de a) la naphtylamine b) la benzidine c) l'harmane et d) le norharmane

I.5.2.D. Les composés oxygénés

Les atomes d'oxygène présents dans les molécules contenues dans les fumées de cigarettes peuvent être associés à différentes fonctions chimiques. Ils peuvent faire partie intégrante du squelette hydrocarboné (furane, quinone) ou être relatifs à des fonctions alcool, phénol, aldéhyde, ou acide carboxylique. Toutes ces molécules pouvant être produites au cours de la dépolymérisation de la biomasse sous l'action de la chaleur. Une partie des composés oxygénés peuvent correspondre également à des molécules de plus petites tailles correspondant à des dérivés de composés aromatiques pour lesquels des cycles benzéniques ou furane sont substitués par des groupements hydroxyles, methoxy, ou carbonyles.

Le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, ou d'autres composés carbonylés très volatils sont également formés lors de pyrolyse de la biomasse. Ceux-ci sont reconnus pour être particulièrement toxiques. Leur analyse peut être effectuée notamment en dérivant la fonction carbonyle de manière à conduire ensuite l'analyse plus aisément par chromatographie gazeuse. Ainsi, des teneurs en acétaldéhyde comprises entre 76 et 176 $\mu\text{g}/\text{cigarette}$ ont été obtenues.⁷¹

I.5.3. Les nitrosamines

Les nitrosamines ont fait l'objet de nombreux développements analytiques pour en réaliser le dosage dans différentes matrices dont les fumées de cigarette. Les structures moléculaires de certaines d'entre elles sont représentées sur la **Figure I-16**.

71 Pang, X.; Lewis, A. C. *Sci. Total Environ.* **2011**, *409*, 5000-5009.

Contexte général de l'étude

Dès 2003, l'équipe de Watson a développé une technique LC-ESI-MS/MS pour le dosage des cinq nitrosamines spécifiques au tabac (TSNA). Des limites de détection de 0,05 à 1,23ng/mL ont été obtenues pour ces différentes molécules.⁷²

En 2005, ces limites de détection ont été abaissées à 0,01 ng/mL.⁷³ En 2008, la sélectivité et la robustesse de ces méthodes analytiques ont pu être améliorées par le suivi de plusieurs ions fragments en spectrométrie de masse en tandem en mode MRM.⁷⁴ Il est désormais possible de mesurer de très faibles teneurs de ces composés dans des milieux très complexes. Ce type de méthode est appliqué pour la détermination de la concentration en TSNA dans les fumées de cigarette⁷⁵ mais également dans les urines. En effet, la 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) est présente dans les urines des fumeurs, mais également dans celles des non fumeurs exposés aux SSS. Les très faibles teneurs nécessitent ainsi des méthodes à la fois sélectives (complexité de la matrice) et très sensibles.⁷⁶ Le développement de méthodes de dosage par LC-ESI-MS/MS de la 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ainsi que d'un certain nombre de ses métabolites dans les urines a été proposé plus récemment.⁷⁷

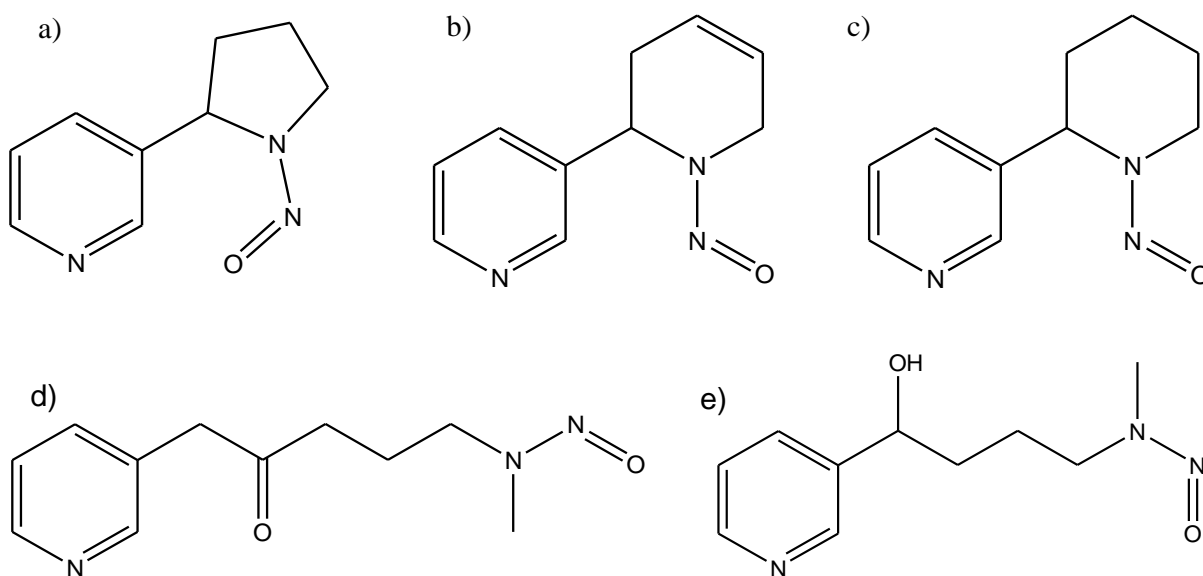


Figure I-16 : Structure de a) la N'-nitrosornicotine b) la N'-nitrosoanatabine c) la N'-nitrosoanabasine d) la NNK et e) la NNAL

72 Wu, W.; Ashley, D. L.; Watson, C. H. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4827-4832.

73 Wagner, K. A.; Finkel, N. H.; Fossett, J. E.; Gillman, I. G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1001-1006.

74 Wu, J.; Joza, P.; Sharifi, M.; Rickert, W. S.; Lauterbach, J. H. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1341-1345.

75 Xiong, W.; Hou, H.; Jiang, X.; Tang, G.; Hu, Q. *Anal. Chimica Acta* **2010**, *674*, 71-78.

76 Xia, Y.; McGuffey, J. E.; Bhattacharyya, S.; Sellergren, B.; Yilmaz, E.; Wang, L.; Bernert, J. T. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7639-7645.

77 Lee, H.-L.; Wang, C.; Lin, S.; Hsieh, D. P. H. *Talanta* **2007**, *73*, 76-80.

I.5.4. Les autres composés organiques volatils

Les composés organiques volatils (COV) regroupent une large variété de molécules. On peut citer le benzène, le toluène, l'éthyl-benzène et les xylènes (diméthyl benzène) qui sont généralement regroupés sous l'acronyme BTEX. D'autres composés comme les alcanes, les alcènes, les phénols, les aldéhydes sont également associés à la classe des COVs. Leur analyse quantitative peut être menée par GC-MS. Les comparaisons de différents types de fumées, de différents types de cigarettes reposent souvent sur la mesure de la concentration de ces molécules. L'émission de COV pour des cigarettes à très faible teneur, faible teneur et teneur normale en nicotine a permis d'être corrélée à la concentration des cigarettes en nicotine.⁷⁸ Cette évolution similaire de ces deux classes de composés peut être expliquée par la variation du taux de ventilation du filtre pour ces différentes cigarettes. Les aérations présentes sous forme de trous au niveau de papier du filtre de la cigarette permettent en effet de diluer les fumées inspirées. De plus, lors d'une bouffée, la ventilation par le filtre de la cigarette abaisse le débit d'air apporté au niveau du foyer de combustion qui est ainsi moins complète et donc affecte la composition chimique des fumées.⁷⁹

De la même manière, la comparaison des quantités de COVs pour différentes marques de cigarettes ainsi que pour des cigares a été entreprise.⁸⁰ Une large part des composés détectés sont communs aux cigares et aux cigarettes. La majorité des COVs proviennent donc de la combustion du tabac et non de celle du papier.⁸¹

I.5.5. Les composés inorganiques

Différents métaux sont présents dans les fumées de cigarettes (Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Sb, Sn, Tl, Zn...), essentiellement à l'état de traces. Les méthodes qui en permettent le dosage font souvent appel à des techniques de spectrométrie de masse associées à des sources d'ionisation par plasma (ICP-MS). Les teneurs observées pour les différents métaux sont classiquement comprises entre le ng/cig (pour le thallium par exemple) et plusieurs dizaines de ng/cig. Elles diffèrent légèrement selon la marque et le type de cigarettes. Pour les métaux lourds comme le cadmium, le thallium et le plomb, il a été montré que les quantités détectées

78 Charles, S. M.; Batterman, S. A.; Jia, C. *Atm. Environ.* **2007**, *41*, 5371-5384.

79 Adam, T.; McAughey, J.; Mocker, C.; McGrath, C.; Zimmermann, R. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *657*, 36-44.

80 Polzin, G. M.; Kosa-Maines, R. E.; Ashley, D. L.; Watson, C. H. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 1297-1302.

81 Pieraccini, G.; Furlanetto, S.; Orlandini, S.; Bartolucci, G.; Giannini, I.; Pinzauti, S.; Moneti, G. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1180*, 138-150.

Contexte général de l'étude

sont fortement corrélées avec la quantité de goudron⁸² ce qui confirme la présence majoritaire des métaux dans la phase particulaire. Certains métaux peuvent cependant être partagés entre phase gazeuse et particulaire voire, dans le cas du mercure, principalement sous forme gazeuse.⁸³

I.5.6. Les particules

Les particules contenues dans les fumées de cigarette sont jusqu'à présent essentiellement caractérisées par leur diamètre aérodynamique qui peut être obtenu comme nous l'avons déjà signalé par des méthodes d'impaction⁸⁴ ou des méthodes optiques.⁸⁵ La taille moyenne des particules de MSS se situe aux environs 200 à 300 nm, celle des SSS entre 100 et 200 nm. Ces valeurs diffèrent légèrement d'une étude à l'autre du fait de la variabilité des méthodes d'analyse, de fumage et de prélèvement employées qui ont une influence sur la croissance des particules. Cette variabilité est également associée à « l'âge » des particules qui sont mesurées ainsi qu'à l'hygrométrie et à la concentration totale en particules.

Une étude visant à mesurer la dépendance de la taille des particules sur leur origine en milieu confiné dans une atmosphère de référence exposée à la fumée de cigarette a montré que 27% des PM_{2,5} et 5% des PM_{2,5-10} sont issues des fumées de cigarette.⁸⁶

La composition chimique de la matière particulaire est relativement peu documentée. Les études qui y sont associées sont en général restreintes aux HAPs^{87,88} ou à certains composés adsorbés sur les particules tels que la nicotine.⁸⁹ Il est cependant couramment admis que la phase particulaire contient une grande proportion de carbone organique.

Tableau I-1 regroupe un certain nombre de publications parues ces dix dernières années visant à déterminer la composition chimique des fumées de cigarette. Il met en valeur à la fois la complexité de la matrice et les possibilités apportées par la spectrométrie de masse. Celle-ci permet, en effet, d'examiner un large panel de molécules. De plus, le couplage à la chromatographie gazeuse ou liquide à la spectrométrie de masse est une méthode de choix pour assurer la quantification d'une large gamme de molécule. La spectrométrie de masse

82 Pappas, R. S.; Polzin, G. M.; Zhang, L.; Watson, C. H.; Paschal, D. C.; Ashley, D. L. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 714-723.

83 Chang, M. J.; Naworal, J. D.; Walker, K.; Connell, C. T. *Spectrochim. Acta B* **2003**, *58*, 1979-1996.

84 Becquemin, M. H.; Bertholon, J. F.; Attoui, M.; Roy, F.; Roy, M.; Dautzenberg, B. *Rev. Mal. Respir.* **2007**, *24*, 845-852.

85 Kleeman, M. J.; Schauer, J. J.; Cass, G. R. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3516-3523.

86 Slezakova, K.; Pires, J. C. M.; Martins, F. G.; Pereira, M. C.; Alvim-Ferraz, M. C. *Atmos. Environ.* **2011**, *45*, 863-872.

87 Lee, H.-L.; Hsieh, D. P. H.; Li, L.-A. *Chemosphere* **2011**, *82*, 477-482.

88 Li, S.; Olegario, R. M.; Banyasz, J. L.; Shafer, K. H. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2003**, *66*, 155-163.

89 Lauterbach, J. H.; Bao, M.; Joza, P. J.; Rickert, W. S. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2010**, *58*, 45-63.

apparaît alors comme une technique très sensible, et permet d'envisager des analyses par bouffées en ligne ou en temps réel, sujet qui sera traité plus en détail dans le paragraphe suivant.

Tableau I-1 : Bilan bibliographique des travaux menés au cours de la dernière décennie dans le cadre de l'analyse des fumées de cigarette.

Famille de molécules	Type de fumée	Technique	Références
COV	MSS	TOF-MS	Mitschke, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chem.</i> 2005 , <i>77</i> , 2288-2296
COV	MSS	TOF-MS	Hertz, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chim. Acta</i> 2012 , <i>714</i> , 104-113
COV	MSS	TOF-MS	Adam, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chim. Acta</i> 2006 , <i>572</i> , 219-229
COV	Souffle de fumeur + MSS	TOF-MS	Mühlberger, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chem.</i> 2005 , <i>77</i> , 7408-7414
COV	MSS	TOF-MS	Adam, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chim. Acta</i> 2010 , <i>657</i> , 36-44
COV	Tabac pyrolysé	TOF-MS	Adam, <i>et al.</i> ⁹⁰
COV	SSS+THS	ATOFMS	Sleiman, <i>et al.</i> , <i>Atmos. Environ.</i> 2010 , <i>44</i> , 4191-4198
COV	ETS/MSS/SSS	GC-MS	Charles, <i>et al.</i> , <i>Environ. Sci. Technol.</i> 2008 , <i>42</i> , 1324-1331
COV	MSS+SSS	GC-MS	Charles, <i>et al.</i> , <i>Atm. Environ.</i> 2007 , <i>41</i> , 5371-5384
COV	ETS	GC-MS	Xie, <i>et al.</i> , <i>Atm. Environ.</i> 2003 , <i>37</i> , 3365-3374
COV	MSS+SSS	GC-MS	Pieraccini, <i>et al.</i> , <i>J. Chromatogr. A</i> 2008 , <i>1180</i> , 138-150
COV	MSS	GC-MS	Polzin, <i>et al.</i> , <i>Environ. Sci. Technol.</i> 2007 , <i>41</i> , 1297-1302
COV	ETS	GC-MS	Alonso, <i>et al.</i> , <i>Environ. Sci. Technol.</i> 2010 , <i>44</i> , 8289-8294
COV, HAP, Hétérocycles	THS	GC-MS	Petrick, <i>et al.</i> , <i>Atmos. Environ.</i> 2011 , <i>45</i> , 4959-4965
HAP	SSS + THS	GC-MS	Hoh, <i>et al.</i> , <i>Environ. Sci. Technol.</i> 2012 , <i>46</i> , 4174-4183
HAP	Tabac	GC-MS	Stepanov, <i>et al.</i> , <i>Chem. Res. Toxicol.</i> 2010 , <i>23</i> , 66-73
HAP	MSS+SSS	GC-MS	Ding, <i>et al.</i> , <i>Environ. Sci. Technol.</i> 2004 , <i>39</i> , 471-478
HAP	EXS	GC-MS	Moldoveanu, <i>et al.</i> ⁹¹
HAP	SSS	LC-Fluorimètre	Lodovici, <i>et al.</i> , <i>J. Appl. Toxicol.</i> 2004 , <i>24</i> , 277-281
HAP	MSS	LC-Fluorimètre	Kalaitzoglou, <i>et al.</i> , <i>Food Chem Toxicol</i> 2006 , <i>44</i> , 1432-1442
HCN, NO _x , amine aromatique, HAP	MSS+SSS	GC-MS	Moir, <i>et al.</i> , <i>Chem. Res. Toxicol.</i> 2008 , <i>21</i> , 494-502
Nitro-HAP	MSS/SSS	GC-MS	Havey, <i>et al.</i> , 2009 , <i>7</i> , 331-336
Pyridine, picoline,	MSS	LC-MS	Saha, <i>et al.</i> , <i>J. Chromatogr. A</i> 2010 , <i>1217</i> ,

90 Adam, T.; Mitschke, S.; Baker, R. R. *Investigation of Tobacco Pyrolysis Gases and Puff-by-puff Resolved Cigarette Smoke by Single Photon Ionisation (SPI) - Time-of-flight Mass Spectrometry (TOFMS)*; Verband der Cigarettenindustrie: Bonn, ALLEMAGNE, **2009**.

91 Moldoveanu, S. C.; Coleman, W.; Wilkins, J. M. *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Exhaled Cigarette Smoke*; Verband der Cigarettenindustrie: Bonn, ALLEMAGNE, **2008**.

Contexte général de l'étude

quinoline			307-311
Nicotine	MSS	GC-MS	Bao, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chim. Acta</i> 2010 , 663, 49-54
Nicotine	MSS	FTICRMS	Xie, <i>et al.</i> , <i>Rapid Commun. Mass Spectrom.</i> 2006 , 20, 2573-2578
Nicotine, menthol, TSNA	MSS	GC-MS	Gordon, <i>et al.</i> , <i>Chem. Res. Toxicol.</i> 2011 , 24, 1744-1753
TSNA	MSS	LC-MS	Xiong, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chimica Acta</i> 2010 , 674, 71-78
TSNA	MSS	LC-MS	Wu, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chem.</i> 2003 , 75, 4827-4832
TSNA	Tabac +MSS	LC-MS	Wu, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chem.</i> 2008 , 80, 1341-1345
TSNA	Tabac	GC-TEA	Stepanov, <i>et al.</i> , <i>J. Agr. Food Chem.</i> 2005 , 53, 8082-8086
Aldéhydes	MSS	FTICRMS	Xie, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chimica Acta</i> 2009 , 638, 198-201
Composés carbonylés	MSS	GC-MS	Pang, <i>et al.</i> , <i>Sci. Total Environ.</i> 2011 , 409, 5000-5009
Composés carbonylés	MSS	LC-UV	Uchiyama, <i>et al.</i> , <i>J. Chromatogr., A</i> 2010 , 1217, 4383-4388
Solanesol	MSS-EXS	LC-MS	McGrath, <i>et al.</i> , <i>J. Phys.: Conf. Ser.</i> 2009 , 151, 012018
CO, CO ₂ , NH ₃ , NO _x , C ₂ H ₄	MSS+SSS	Spectrométrie laser	Baren, <i>et al.</i> , <i>Spectrochim. Acta. A</i> 2004 , 60, 3437-3447
O ₃ , NO _x , Nicotine	THS	GC-MS, FTIR-ATR	Petrick, <i>et al.</i> , <i>Environ. Sci. Technol.</i> 2011 , 45, 328-333
NH ₃	MSS	Colorimétrie	Callicutt, <i>et al.</i> , <i>Regul. Toxicol. Pharm.</i> 2006 , 46, 1-17
Arsenic	Tabac+MSS+cendres	Absorption rayons X	Liu, <i>et al.</i> , <i>Spectrochim. Acta B</i> 2009 , 64, 1294-1301
Métaux	Cendres	ICP-AES	Pérez-Bernal, <i>et al.</i> , <i>Forensic Sci. Int.</i> 2011 , 204, 119-125
Inorganiques	MSS	ICP-MS	Chang, <i>et al.</i> , <i>Spectrochim. Acta B</i> 2003 , 58, 1979-1996
Inorganiques, carbone élémentaire et organique	ETS+THS	SEM-EDS	Slezakova, <i>et al.</i> , <i>Atmos. Environ.</i> 2011 , 45, 863-872
Organiques	MSS+SSS	FTICRMS	Schramm, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chem.</i> 2011 , 83, 133-142
Organiques	MSS	FTICRMS	Carré, <i>et al.</i> , <i>Anal. Chimica Acta</i> 2005 , 540, 257-268
Organiques	MSS	RMN	Barsanti, <i>et al.</i> , <i>Magn. Reson. Chem.</i> 2007 , 45, 167-170

I.5.7. Analyses par bouffées.

I.5.7.A. Techniques hors-ligne « Off-line »

Il s'agit d'analyses réalisées en mode différé pour lesquelles un prélèvement est effectué bouffée par bouffée. La mesure est ensuite conduite sur chacun des échantillons collectés pour chacune des bouffées. Il est nécessaire par conséquent, de mettre en œuvre des techniques très sensibles. Les performances obtenues par les méthodes de couplage chromatographie – spectrométrie de masse permettent tout particulièrement d'examiner ces échantillons. La séparation chromatographique est typiquement précédée d'étapes

d'extraction ou de solubilisation. Dans le cadre de l'analyse d'aldéhydes, une étape de dérivation et de séparation peut être la transformation en base de Schiff par action de la diphénylamine.⁹² Grâce à ces méthodes, la spécificité de la première bouffée relative à l'influence de la méthode d'allumage de la cigarette a plus particulièrement été mise en évidence.⁹³

1.5.7.B. Techniques en ligne « On-line »

L'analyse des bouffées est plus couramment réalisée par les méthodes *on-line*. Ces méthodes d'analyse « à la volée » sont conduites en introduisant directement les fumées dans l'analyseur. Elles sont ainsi réalisées en temps réel.

Ces systèmes nécessitent de pouvoir analyser sélectivement certaines molécules sans avoir besoin de les séparer ou de les extraire de la matrice mais aussi d'avoir une réponse dans un délai aussi court que possible. La spectrométrie de masse par temps de vol (TOF) couplée à une méthode d'ionisation SPI (single photon ionization) pour l'étude des composés aliphatiques, ou REMPI (resonance enhanced multiphoton ionisation) pour les espèces aromatiques, permet d'avoir une importante sensibilité, une certaine sélectivité ainsi qu'une cadence d'analyse suffisante pour étudier séparément et quantitativement chaque bouffée. Le dispositif expérimental employé est présenté sur la **Figure I-17**.

De cette manière, Mitsche *et al* ont montré les variations de composition chimique entre les différentes bouffées d'une cigarette au cours de son fumage. La concentration de certaines molécules comme l'acétone, augmente régulièrement avec l'avancement de la consommation de la cigarette. Pour d'autres molécules comme le propyne, le signal mesuré est très intense lors de la première bouffée, beaucoup moins sur la seconde, puis augmente progressivement avec le nombre de bouffées. La modification de ce dispositif analytique a récemment permis de prélever directement à l'intérieur de la cigarette au cours de son fumage des fumées à l'aide d'une micro-sonde. Cela a permis de sonder les zones de pyrolyse et de combustion de la fumée de cigarette dans le but d'identifier les procédés thermochimiques qui y sont associés.⁹⁴

92 Xie, J.; Yin, J.; Sun, S.; Xie, F.; Zhang, X.; Guo, Y. *Anal. Chimica Acta* **2009**, 638, 198-201.

93 Li, S.; Olegario, R. M.; Banyasz, J. L.; Shafer, K. H. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2003**, 66, 155-163.

94 Hertz, R.; Streibel, T.; Liu, C.; McAdam, K.; Zimmermann, R. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 714, 104-113.

Contexte général de l'étude

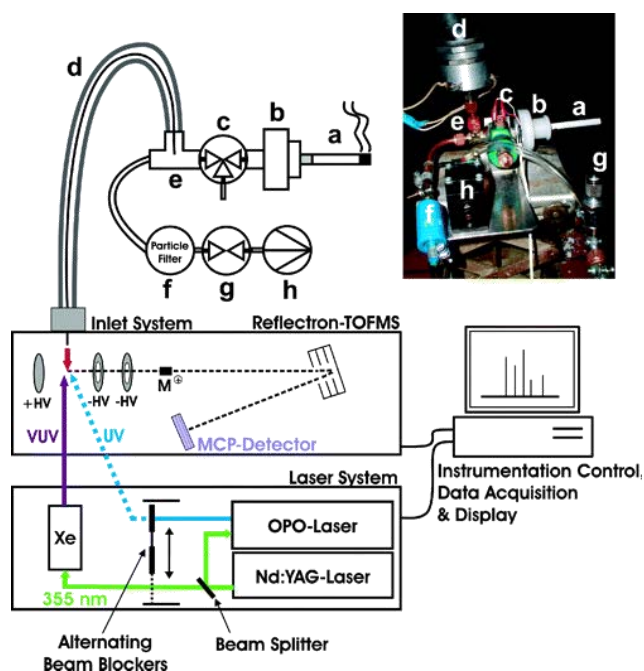


Figure I-17 : Dispositif expérimental REMPI/SPI-TOFMS pour l'analyse en ligne de fumées de cigarettes. (a) cigarette, (b) filtre, (c) vanne, (d) ligne de transfert chauffée, (e) branche de connexion, (f) filtre à particules, (g) vanne de contrôle du débit, (h) pompe à membrane.⁹⁵

A défaut d'analyser l'ensemble des composés présents, il est également possible de suivre simultanément un nombre défini d'espèces par spectroscopie d'absorption différentielle à l'aide d'un laser infra rouge accordable (Tunable infrared laser differential absorption spectroscopy : TILDAS) au sein d'une bouffée. Ces études ont permis de suivre l'évolution des concentrations entre différentes bouffées mais également le profil de concentrations au sein d'une même bouffée. Comme pour les analyses précédemment rapportées, il a été noté que certains composés voient leur concentration augmenter avec l'avancement de la combustion (ammoniac, nicotine) tandis que celle d'autres est invariante (isoprène). Cela conduit à penser que certaines molécules s'adsorbent sur le tabac présent dans la partie de la cigarette non consommée, alors que les autres demeurent en phase gazeuse dans les MSS.

L'analyse et le suivi au sein d'une seule bouffée de la concentration de certaines molécules montre des profils analyte – dépendants. Ils peuvent être gaussiens, présenter un plateau, ou adopter différents maxima comme c'est le cas notamment pour l'ammoniac. Dans ce dernier cas, il est possible d'envisager que ce comportement soit associé à la présence de différentes voies de formation ou d'émission.⁹⁶ On peut par exemple penser que l'ammoniac soit formé par pyrolyse de composés azotés, mais aussi résulte de sa désorption de la surface

95 Mitschke, S.; Adam, T.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2288-2296.

96 Baren, R. E.; Parrish, M. E.; Shafer, K. H.; Harward, C. N.; Shi, Q.; Nelson, D. D.; McManus, J. B.; Zahniser, M. S. *Spectrochim. Acta. A* **2004**, *60*, 3437-3447.

du tabac imbrulé, ces molécules d'ammoniac s'étant adsorbées sur le tabac au cours d'une précédente bouffée. Des profils de bouffées en concentration en ammoniac différentes entre la première et les suivantes semblent confirmer cette double origine.

1.5.8. Conclusion.

La description de la composition des fumées de cigarette au travers des approches principalement ciblées laisse apparaître une très forte diversité de composition chimique. La complexité des analyses nécessaires à leur caractérisation est accrue par la multiplication des phases présentes et le caractère dynamique de ce type d'échantillon. La présence d'espèces réactives comme les radicaux oxygénés, les oxydes d'azote conduit également à la possibilité qu'un nombre important de processus chimiques aient lieu après que ces espèces aient été formées par combustion ou pyrolyse. Une description exhaustive de ce type de matrice requiert donc l'emploi d'un grand nombre des méthodologies différentes décrites dans les paragraphes précédents. Couteuse en temps d'analyse, elles peuvent être avantageusement remplacées par des méthodes non – ciblées. Cette approche est ainsi susceptible de mettre en évidence des composés ou des classes de composés non encore identifiées dans ce type de matrice environnementale. Il est nécessaire dans ce cas que l'analyse soit réalisée avec des dispositifs performants permettant d'atteindre des informations moléculaires moyennées ou individuelles. Dans ce dernier cas, la multiplicité des composés présents et leur faible concentration requièrent des moyens analytiques sensibles, possédant une gamme dynamique relativement étendue et capable de discriminer l'ensemble des composés présents. A ce titre la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS) apparaît être un outil particulièrement pertinent tout comme l'est l'ionisation par désorption ionisation laser pour l'analyse de composés en phase solide. Dans ce cadre, de nombreux développements méthodologiques ont en effet été réalisés ces dernières années notamment en pétroléomique et dans le domaine de l'analyse de la matière organique naturelle ou dissoute dans les eaux (DOM, NOM). La dernière partie de ce chapitre va donc être consacrée à un état de l'art de ces différentes méthodologies ainsi qu'à la présentation d'un certain nombre de travaux relatifs à une approche complémentaire à celle par spectrométrie de masse très haute résolution : la résonance magnétique nucléaire (RMN).

I.6. Spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire dans l'analyse de milieux complexes.

I.6.1. La Résonance Magnétique Nucléaire.

La RMN est une technique de choix pour l'analyse fine d'édifices moléculaires et l'analyse structurale de molécules notamment organiques. Elle est également beaucoup utilisée dans l'analyse de milieux complexes en employant des stratégies spécifiques.

Les interprétations en RMN 1D du proton ou du carbone 13 se font essentiellement par zone de déplacement chimique. On obtient alors des informations semi-quantitatives moyennées sur l'ensemble des composés présents au sein du milieu complexe étudié. Il est ainsi possible d'observer différentes classes de proton et de carbone. La **Figure I-18** présente un exemple de spectre RMN ^1H de DOM (Dissolved Organic Matter) pour lequel différentes zones ont pu être attribuées à des composés aliphatiques (I), à des molécules alicycliques oxygénées (II), à des sucres (III), et à des aromatiques (IV). Ces analyses sont affinées en règle générale en appliquant le même type de démarche à des spectres obtenus en ^{13}C .

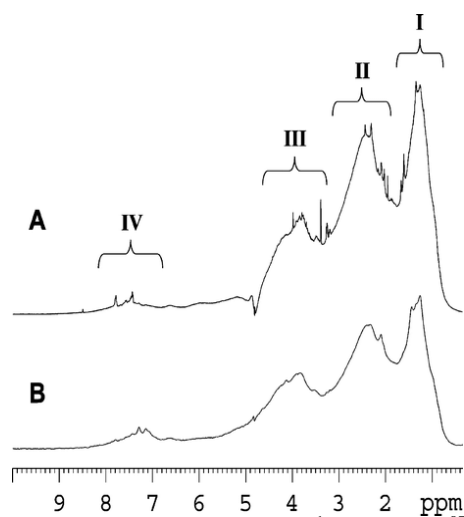


Figure I-18 : Spectre RMN ^1H de DOM⁹⁷

Des analyses approfondies peuvent être menées en utilisant des séquences impulsionnelles plus complexes permettant d'obtenir des cartes de corrélation homo ou hétéro-nucléaires.⁹⁸

97 Lam, B.; Baer, A.; Alae, M.; Lefebvre, B.; Moser, A.; Williams, A.; Simpson, A. J. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 8240-8247.

I.6.2. La spectrométrie de masse

I.6.2.A. Les méthodes d'ionisation

L'étape d'ionisation possède une grande influence sur la nature des signaux détectés en spectrométrie de masse au travers de la spécificité que peut présenter une méthode d'ionisation vis-à-vis d'un type donné de composés. Les méthodes d'ionisation par électro-nébulisation (ESI) sont particulièrement sensibles pour la détection de molécules fortement polaires alors que l'ionisation chimique (APCI) ou la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) seront également adaptés à l'étude de composés possédant un caractère apolaire plus prononcé. L'association de différentes méthodes d'ionisation permet ainsi d'étendre le nombre de molécules accessibles par spectrométrie de masse comme cela a été montré dans l'examen de NOM.⁹⁹ Bae *et al.* sont parvenus en combinant les résultats obtenus avec une source ESI et une source APPI à observer jusqu'à 30000 contributions différentes pour un même échantillon.¹⁰⁰ L'utilisation de l'APCI en complément de l'ESI et de l'APPI permet d'étendre encore l'étendue des molécules accessibles à la détection et l'analyse par spectrométrie de masse.

L'ionisation laser est également largement répandue. La désorption/ionisation laser (LDI) peut être réalisée directement sur un matériau ou sur un dépôt permettant ainsi de limiter les étapes de préparations. Cependant, il est possible d'observer dans ce cas, au côté des espèces moléculaires ou pseudo-moléculaires, des photo-fragments. Il s'agit en fait d'ions associés aux molécules présentes dans l'échantillon pour lesquelles l'énergie du faisceau laser et/ou l'énergie transportée par chaque photon est suffisante pour conduire à la rupture de liaisons. Pour limiter ces effets, l'ionisation laser est bien souvent assistée par une matrice organique (MALDI) qui joue un rôle protecteur par rapport aux molécules de l'analyte mais aussi permet l'augmentation de l'absorption du rayonnement laser par l'échantillon tout en assistant à l'ionisation en mettant en jeu et en favorisant les processus de transferts de protons vers les molécules d'analyte.

La possibilité de modifier la longueur d'onde laser permet également de favoriser sélectivement l'ionisation de certaines molécules en faisant intervenir notamment leur propriété d'absorption à la longueur d'onde du laser employé. L'augmentation de la

98 Edison, A. S.; Schroeder, F. C. *9.06 - NMR - Small Molecules and Analysis of Complex Mixtures Comprehensive Natural Products II*; Elsevier: Oxford, **2010**.

99 Hertkorn, N.; Frommberger, M.; Witt, M.; Koch, B. P.; Schmitt-Kopplin, P.; Perdue, E. M. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8908-8919.

100 Bae, E.; Na, J.-G.; Chung, S. H.; Kim, H. S.; Kim, S. *Energy & Fuels* **2010**, *24*, 2563-2569.

Contexte général de l'étude

sélectivité est encore accrue lorsque les étapes de désorption et d'ionisation laser sont découplées. Deux lasers de longueur d'onde différentes sont alors employés, on parle alors d'expériences de L2-MS. Dans le cadre de l'analyse de SSS, Morrical *et al.* ont employé un laser infrarouge à 10,6 μm pour favoriser la désorption thermique des espèces et un laser UV à 266 nm pour ioniser en phase gazeuse les espèces désorbées (**Figure I-19**).

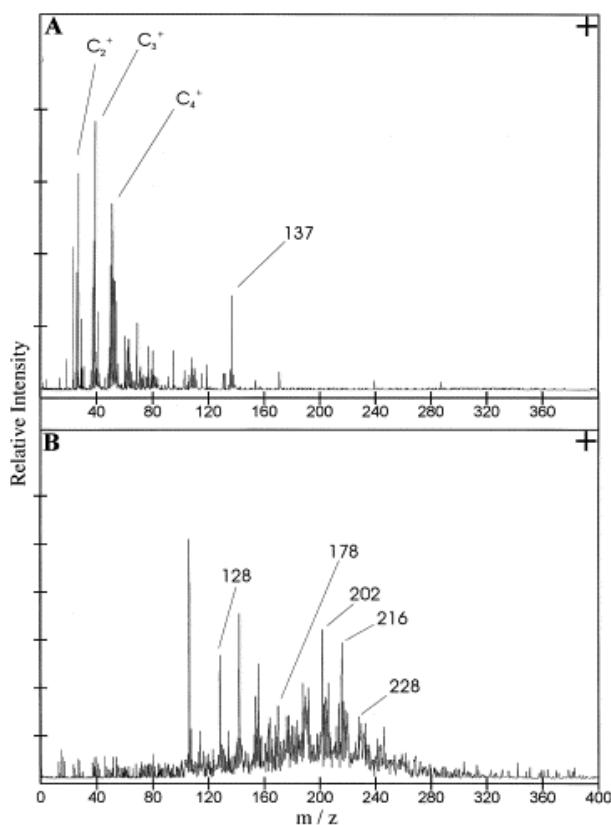


Figure I-19 : Analyse de SSS par (A) LDI-MS, 266 nm et (B) L2-MS, désorption par laser 10,6 μm et ionisation par laser 266nm.¹⁰¹

La comparaison faite sur la **Figure I-19** entre une analyse LDI-MS et L2-MS montre clairement l'apport de cette dernière méthodologie. Alors que les espèces observées par LDI (spectre A) sont majoritairement le résultat de processus de fragmentation des espèces contenues dans les SSS étudiés, l'analyse par L2-MS (spectre B) conduit majoritairement à la détection d'ions moléculaires de HAPs, de HAPs alkylés et de composés hétéroaromatiques.

Ces techniques ont largement fait leurs preuves dans l'analyse de la matière particulaire.¹⁰² Il existe pour certains polluants spécifiques des alternatives à ces méthodes. Ainsi, dans le cadre des HAPs présents dans la matière particulaire issue de l'échappement de moteur diesel, Carré *et al.* ont proposé d'ioniser sélectivement ces composés en les complexant au préalable pour former des complexes à transfert de charge. La sensibilité

101 Morrical, B. D.; Ferguson, D. P.; Prather, K. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9, 1068-1073.

102 Aubriet, F.; Carré, V. *Anal. Chimica Acta* **2010**, 659, 34-54.

obtenue lorsque l'analyse est menée par spectrométrie de masse haute résolution est alors excellente, de l'ordre de 10^{-18} g.¹⁰³ Cette méthodologie a également été utilisée dans le cadre de l'analyse de fumées de cigarette pour mettre en évidence les HAPs présents sur la phase particulaire. Les analyses ont également été réalisées dans cette étude, sans agent complexant par prélèvement sur un disque d'extraction greffé avec des chaînes carbonées en C₁₈ puis par ionisation laser directe du dépôt. Dans ce cas, des composés comme la nicotine ont été détectés mais aussi des espèces hydrocarbonées azotés et/ou oxygénés. De plus, des espèces inorganiques comme des sulfates et des nitrates ont pu être observées, mettant en évidence la possibilité d'étendre ce mode d'analyse à l'examen de composés de nature différente.¹⁰⁴

I.6.2.B. La spectrométrie de masse très haute résolution

L'un des domaines d'application de la spectrométrie de masse à très haute résolution est l'analyse de milieux complexes. Les matières organiques dissoutes (DOM) dans les eaux sont à ce titre, un bon exemple. Elles contiennent un grand nombre de composés de nature différente. Leur analyse est en conséquence extrêmement délicate. Jusqu'au début des années 2000, la spectrométrie de masse basse résolution ne permettait pas de lever un certain nombre d'ambiguïtés quant à la caractérisation fine des DOMs. Le développement de la spectrométrie de masse à très haute résolution comme la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier (FTICRMS) permet désormais de s'affranchir de ces difficultés. Il est ainsi possible de distinguer et d'identifier précisément toutes les contributions pour une masse nominale comme l'illustre la **Figure I-20**.

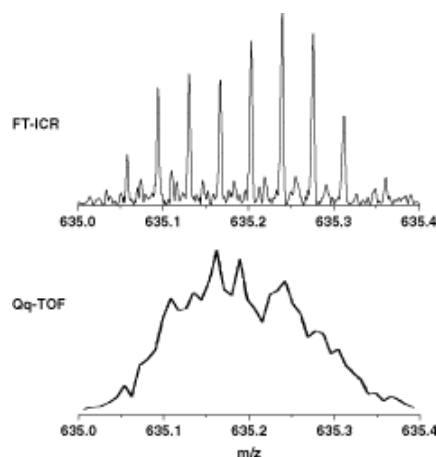


Figure I-20 : Comparaison d'un spectre de masse de NOM en haute et basse résolution.¹⁰⁵

103 Carré, V.; Vernex-Loset, L.; Krier, G.; Manuelli, P.; Muller, J.-F. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3979-3987.

104 Carré, V.; Aubriet, F.; Muller, J.-F. *Anal. Chimica Acta* **2005**, *540*, 257-268.

105 Sleighter, R. L.; Hatcher, P. G. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 559-574.

Contexte général de l'étude

Le spectre reporté sur la **Figure I-20**, indique qu'au moins huit contributions existent à la masse nominale 635, en conséquence sur une gamme de masse de 300 unités de masse, le nombre de signaux détectés peut atteindre plusieurs milliers ce qui rend l'information obtenue extrêmement riche. Pour chacun de ces pics, la précision sur la mesure de masse permet l'attribution non ambiguë d'une composition élémentaire avec une erreur relative inférieure au ppm. L'attribution d'une formule brute peut par ailleurs être validée par l'étude de la distribution du massif isotopique.¹⁰⁶ L'augmentation du champ magnétique des instruments FTICRMS a permis à certains auteurs de rapporter des erreurs sur les masses mesurées inférieures à 0,2 ppm pour 75% des attributions.¹⁰⁷ D'autres auteurs proposent également de coupler la spectrométrie de masse FTICR à une séparation chromatographique pour fractionner les échantillons de DOM.¹⁰⁸ Des associations spectres de masse, temps de rétentions sont alors possibles et permettent d'associer les ions à des fractions de polarité différentes.

I.6.2.C. Méthodes d'exploitation des spectres

L'importance des données générées conduit nécessairement à l'impossibilité de traiter l'information obtenue de manière individuelle. Sur la base des compositions élémentaires attribuées aux différents pics, le traitement est réalisé en regroupant les composés par classe. Ainsi des familles regroupant un même nombre d'hétéroatomes sont constituées, il peut s'agir d'espèces plus ou moins oxygénées, azotées, soufrées ou relatives à des combinaisons diverses en hétéroatomes. C'est l'évolution de ces différents groupes qui assurent la comparaison entre les échantillons étudiés. La connaissance des propriétés associées à telle ou telle méthode d'ionisation, l'utilisation de données complémentaires issues de la littérature ou de résultats obtenus à l'aide d'autres techniques analytiques assure de possibles attributions de ces familles à des classes de composé. Les compositions élémentaires de type $C_xH_yO_2$ peuvent par exemple, être associée au ions $[M-H]^-$ d'acides carboxyliques si on les observe en mode de détection négatif en employant le mode d'ionisation ESI. Un autre critère important est la distribution relative du nombre d'atomes de carbone et du nombre d'atomes d'hydrogène qui permet de calculer sur la base de la connaissance de la formule brute l'«équivalent en double liaison» ou DBE. Celui-ci assure la détermination du nombre d'insaturations (double liaison DBE = 1, triple liaison DBE = 2 et/ou de cycle DBE = 1) au

106 Miura, D.; Tsuji, Y.; Takahashi, K.; Wariishi, H.; Saito, K. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5887-5891.

107 Barrow, M. P.; Witt, M.; Headley, J. V.; Peru, K. M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3727-3735.

108 Koch, B. P.; Ludwischowski, K.-U.; Kattner, G.; Dittmar, T.; Witt, M. *Mar. Chem.* **2008**, *111*, 233-241.

sein d'une molécule. Le classement des espèces au sein d'une famille par DBE en conservant l'information relative à l'abondance de chacun des signaux permet également d'affiner la comparaison entre différents échantillons.¹⁰⁹ Le rapport de la DBE au nombre de carbone est également couramment employé, il permet d'estimer la « densité » de double liaisons et donc le degré d'aromaticité d'une molécule ou d'un groupe de molécule. Le calcul d'un indice d'aromaticité pour les différentes compositions élémentaires est susceptible de renseigner encore plus finement sur la structure des ions observés. Il est possible à l'aide de cet indice de classer les espèces observées en aromatiques condensés, espèces possédant des doubles liaisons conjuguées, ou composés à caractère oléfinique ou aliphatique.¹¹⁰ Ce critère est souvent associé à des diagrammes reportant le rapport du nombre d'hydrogène au nombre de carbone en fonction du rapport du nombre d'hétéroatomes (souvent l'oxygène, ou l'azote, voire le soufre) au nombre de carbone. On trace ainsi des diagrammes de Van Krevelen. En fonction des rapports O/C, N/C et H/C des hypothèses sur les fonctions présentes au sein d'une molécule peuvent être émises. Des études sur des produits de pyrolyses ont été menées en utilisant ces méthodes d'analyse des données.¹¹¹ Il est ainsi possible de proposer à partir de spectre de masse à très haute résolution de milieux complexes certaines considérations structurales, sans pour autant effectuer des expériences de spectrométrie de masse en tandem. Il faut cependant garder à l'esprit que sans analyses complémentaires comme celles obtenues par RMN ou par spectrométrie de masse en tandem, la proposition de structures reste hypothétique. Dans le cadre de la métabolomique dans l'étude des processus de vieillissement des vins de Bourgogne et de Champagne, la confrontation des données obtenues par ESI-FTICRMS aux voies métabolomiques propres aux composés associées à la vigne et aux levures utilisées, a également permis d'aboutir à une proposition d'identification structurale de certains signaux détectés sans avoir recours à la spectrométrie de masse en tandem. En effet, si l'analyse est en mesure de définir les signaux (formules brutes) qui pourraient être connectés au travers d'une voie métabolomique connue, il est possible en combinant la connaissance de cette voie et le spectre de masse, de proposer une formule développée pertinente à un certain nombre de pics.¹¹²

109 Wu, Z.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G. *Energy & Fuels* **2004**, *18*, 1424-1428.

110 Koch, B. P.; Dittmar, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 926-932.

111 Podgorski, D. C.; Hamdan, R.; McKenna, A. M.; Nyadong, L.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.; Cooper, W. T. *Anal. Chem.* **2011**, *84*, 1281-1287.

112 Boutegrabet, L. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, Dijon, **2012**.

I.7. Conclusion.

Ce premier chapitre a eu pour objet de donner une description des problématiques associées aux contaminants environnementaux que représente la phase particulaire dans les atmosphères ouvertes ou confinées. Après avoir décrit les principales voies de formation, de prélèvements et d'analyses des particules atmosphériques ainsi que leur implication en matière de toxicologie de manière générale pour l'ensemble des types d'aérosol, nous avons recentré notre propos sur le sujet de cette étude, à savoir les fumées de cigarette. La complexité évidente de cette matrice, conduit dans le choix qui a été le nôtre d'une analyse non ciblée d'avoir notamment recours à des techniques de spectrométrie de masse à très haute résolution par désorption/ionisation laser. C'est la raison pour laquelle la partie finale de ce chapitre traite des potentialités de cette technique de spectrométrie de masse et de ce mode d'ionisation. Ces concepts étant établis, le second chapitre va traiter de la mise en place et de la validation des méthodes de prélèvement des différents types de fumées, avant de présenter la technique analytique LDI-FTICRMS, les méthodes de dépouillement des données obtenues et les résultats relatifs à l'analyse des fumées inhalées dans le troisième chapitre. Ces résultats seront alors comparés à ceux obtenus dans l'étude des SSS et des fumées exhalées dans le chapitre 4. Le dernier chapitre de ce manuscrit aura pour objectif de compléter les données obtenues par LDI-FTICRMS par la mise en œuvre d'autres techniques d'ionisation et par l'utilisation de la RMN.

Chapitre II.

**Mise en place et
validation de la
méthode de
prélèvement**

II.1. Introduction	II-53
II.2. Le prélèvement.....	II-53
II.2.1. Les échantillons	II-53
II.2.2. Le dispositif de fumage et de collecte.....	II-55
II.2.3. La procédure de fumage et de prélèvement.....	II-57
II.2.4. Préparation des échantillons.....	II-59
II.2.4.A. Introduction	II-59
II.2.4.B. Conservation des prélèvements.....	II-59
II.2.4.C. Les composés associés à la phase gazeuse.....	II-59
II.2.4.D. Les composés associés à la phase particulaire.....	II-59
I.3. Analyses quantitatives et validation de méthodes.....	II-61
II.3.1. Introduction.....	II-61
II.3.2. Choix des traceurs.....	II-61
II.3.3. La chromatographie	II-62
II.3.3.A. Analyse de la Nicotine et des HAPs	II-63
II.3.3.B. Analyse des BTEX	II-64
II.3.4. Détection par ionisation de flamme	II-64
II.3.5. Détection par spectrométrie de masse de type piège à ions.....	II-66
II.3.5.A. Production des ions.....	II-66
II.3.5.B. Spectromètre de masse par piège à ions.....	II-67
II.3.5.B.a. Description du piège ionique	II-67
II.3.5.B.b. Mécanisme de piégeage des ions	II-68
II.3.5.B.c. Détection des ions	II-69
II.3.5.B.d. Analyse en mode MS/MS	II-70
II.3.5.B.e. Chromatogrammes obtenus en GC-MS/MS.....	II-70
II.3.6. Validation des méthodes de quantification des traceurs.....	II-73
II.3.6.A. Validation de la linéarité.....	II-73
II.3.6.A.a. Introduction	II-73
II.3.6.A.b. Méthodes des écarts maximums acceptables (EMA).....	II-73
II.3.6.A.c. Validation de la linéarité par les statistiques globales	II-74
II.3.6.B. Détermination des incertitudes sur la mesure	II-75
II.3.6.C. Détermination des rendements de préparation	II-76
II.3.6.D. Mise en place de la carte de contrôle	II-78
II.3.6.E. Conclusion	II-78
II.4. Méthode de prélèvement et de fumage validation et paramètres influents	II-79
II.4.1. Introduction.....	II-79
II.4.2. Formalisme et définitions des plans d'expériences	II-79
II.4.3. Application au prélèvement des fumées de cigarette	II-81
II.4.3.A.a. Débit et durée des bouffées	II-81
II.4.3.A.b. Conditionnement et ventilation.....	II-81
II.4.3.A.c. Les points centraux	II-82
II.4.4. Interprétation des résultats	II-83
II.4.4.A. Etude des points centraux	II-83
II.4.4.B. Détermination des effets de facteurs	II-84
II.4.4.B.a. Effet de la dilution.....	II-84
II.4.4.B.b. L'effet du conditionnement/hygrométrie de la cigarette	II-86
II.4.4.B.c. Effet du débit et de la durée des bouffées.....	II-87
II.4.4.C. Conclusions	II-87
II.5. Conclusion	II-88

II.1. Introduction

Ce second chapitre vise à mettre au point et valider la technique de fumage des cigarettes et de prélèvement des particules produites. Dans le but d'obtenir des échantillons représentatifs et répétables, l'élaboration d'une machine à fumer respectant un cahier des charges défini a été entreprise. Celle-ci doit permettre d'obtenir des échantillons de la phase particulaire des différentes fumées, d'en assurer le prélèvement selon la norme ISO 4387 pour les MSS tout en permettant de garder une certaine flexibilité dans l'ajustement des paramètres de fumage de la cigarette (débit d'aspiration, fréquence et durée des bouffées). Elle doit être compatible avec différents types de supports de prélèvement afin de collecter la phase particulaire et/ou la phase gazeuse des fumées de cigarette.

Il est également essentiel que soit validée la méthodologie combinant le fumage des cigarettes et le prélèvement en évaluant notamment la répétabilité et la reproductibilité de cette étape clé de notre étude. Pour cela, la mesure quantitative de la concentration de traceurs spécifiques est indispensable. A ce titre, notre choix s'est porté sur la nicotine, certains HAPs et les BTEX (benzène, toluène, éthyl-benzène et xylènes). Le premier chapitre a montré que les techniques chromatographiques sont parfaitement adaptées à l'analyse quantitative de ces traceurs spécifiques. En conséquence, la validation de la méthode de fumage et de prélèvement impliquera le suivi quantitatif des traceurs retenus par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS) ou à une détection par ionisation de flamme (GC-FID). Pour cela, il sera nécessaire de développer et de valider, au préalable, les méthodologies analytiques retenues. Finalement, un plan d'expériences sera mis en place pour définir la nature des paramètres influençant de manière significative le prélèvement. On s'intéressera en particulier aux effets de la dilution, du conditionnement de la cigarette, de la durée et du débit d'aspiration des bouffées.

II.2. Le prélèvement

II.2.1. *Les échantillons*

Les cigarettes étudiées sont de deux types. Les unes sont européennes (cigarette A) et « light ». Elles conduisent à la production de 7 mg de goudron, 0,6 mg de nicotine et 8 mg de CO (données fournisseur) lorsqu'elles sont fumées. Les autres (cigarette B) sont d'origine

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

asiatique et de type « normale ». Aucune indication complémentaire n'est disponible. Elles ont été choisies de manière à ce qu'elles soient les plus différentes possibles des cigarettes A. Ainsi, il est raisonnable de penser que les espèces produites par fumage puissent être significativement différentes. Les principales caractéristiques de masse et de taille de ces deux types de cigarette sont données dans le **Tableau II-1**. Elles correspondent aux moyennes de mesures effectuées sur six cigarettes de chaque type. Ces différentes grandeurs des cigarettes A et B sont alors comparées par un test de Student (t-test). Ce dernier a pour objectif de déterminer si les deux moyennes sont ou non identiques.

Tableau II-1 : Comparaison des masses et des dimensions de deux cigarettes testées par un test de Student bilatéral au risque alpha de 1%. Le nombre d'individus retenus pour chaque type de cigarette est n = 6

		Cigarette A		Cigarette B		T test
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Bilatéral α =1%
m filtre	(g)	0,193	0,004	0,151	0,003	différentes
L filtre	(cm)	2,68	0,04	2,16	0,04	différentes
Densité de filtre	(g/cm ³)	0,0042	0,0002	0,0032	0,0002	différentes
L cigarette	(cm)	8,27	0,03	8,22	0,03	différentes
m tabac	(g)	0,560	0,02	0,570	0,03	Identiques
Volume tube	(cm ³)	2,6	0,1	2,9	0,2	Identiques
Densité de tabac	(g/cm ³)	0,22	0,01	0,20	0,02	Identiques

Des différences essentielles apparaissent au niveau du filtre de la cigarette. En effet, le filtre de la cigarette A est à la fois plus lourd et plus long. De plus, la densité du filtre est plus importante dans le cas de la cigarette européenne, ce qui laisse penser que les fibres du filtre sont plus resserrées. Cela peut conduire à la fois à une rétention plus importante des particules par le filtre de la cigarette A, mais aussi à une modification de la nature (principalement au niveau de la granulométrie) des particules retenues.

Pour la cigarette A, utilisée pour l'ensemble de la procédure de validation de la méthode de fumage et de prélèvement, le niveau de perméabilité du filtre à l'air a également été évalué. Pour cela, on fixe une bande de téflon renforcée par un adhésif sur le filtre de la cigarette sur une longueur de 2,2 cm. Les aérations percées (principale différence entre cigarettes « normales » et « light ») sont alors obstruées. On définit ainsi un niveau bas de perméabilité noté niveau -, le niveau + correspond quant à lui à un niveau de perméabilité haut, c'est-à-dire à un filtre normal non étanchéifié. Pour les niveaux de perméabilité + et -,

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

on mesure le débit D2 en amont du filtre en fonction du débit de tirage D1 imposé en aval du filtre (**Figure II-1**). Pour chaque valeur de débit, 6 mesures sont réalisées et l'expérience est répétée pour 7 filtres différents. Ces résultats, reportés sur la **Figure II-1**, permettent de déterminer le facteur de dilution relatif au filtre.

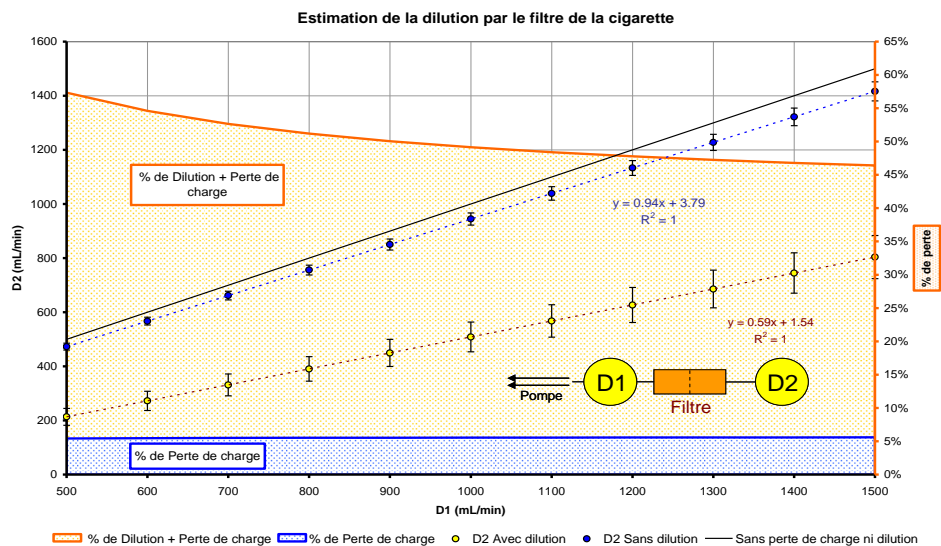


Figure II-1 : Estimation de la dilution par le filtre de la cigarette A

Pour les deux niveaux de perméabilité, dans une gamme de débit comprise entre 500 et 1500 mL/min, le débit D2 est proportionnel au débit D1 comme le montre les deux droites en pointillés sur la **Figure II-1**. La droite en trait continu correspond à la situation où il n'y a pas de perte de débit due au filtre. La comparaison de la droite noire et de la droite en pointillé bleu (niveau - de perméabilité) permet de définir que la présence du filtre conduit de manière constante à une perte de charge d'environ 5 % (trait plein en bleu, axes vertical de droite). Celle-ci peut être associée à la déformation des fibres et/ou à un très léger échauffement. La comparaison de la droite noire continue et de la droite pointillée jaune (niveau + de perméabilité) permet d'évaluer l'effet conjoint de dilution et de perte de charge (courbe jaune en trait plein). En fonction du débit, un différentiel de 40 à 50 % est observé. Il correspond à la perte de charge estimée à ~5 % mais surtout à l'effet de dilution du filtre que l'on peut évaluer entre 35 et 45 %. Cet effet est d'autant plus marqué que le débit d'aspiration est bas et montre une dilution considérable des fumées par le filtre.

II.2.2. Le dispositif de fumage et de collecte

Les cigarettes sont intégrées dans le dispositif de fumage et de prélèvement, conçu de manière à pouvoir échantillonner les composés présents en phase gazeuse et en phase

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

particulière pour les fumées de type MSS. Sa représentation schématique est donnée sur la **Figure II-2**. Il est monté sous une sorbonne dont l'aspiration est coupée durant le prélèvement de manière à ne pas perturber la combustion de la cigarette. Plusieurs lignes conduisant le flux d'air ou de fumées y sont présentes dont une ligne de tirage pour la simulation des bouffées, une ligne d'allumage et une ligne de mesure du débit. Le passage d'une ligne à l'autre est assuré par actionnement des vannes P (côté pompe) et C (côté cigarette).

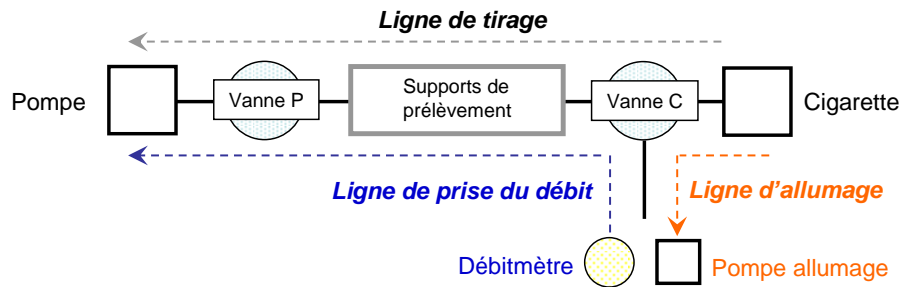


Figure II-2 : Représentation schématique du dispositif de prélèvement

Le prélèvement des fumées est assuré par deux types de supports de collecte. Le premier est un filtre constitué de fibres de quartz (SKC). De forme ronde et d'un diamètre de 37 mm, il est disposé dans une cassette de prélèvement en plastique transparent. Les particules de type $PM_{2,5}$ y sont ainsi collectées. Ces filtres permettent, après prélèvement, une extraction aisée des molécules organiques en employant des solvants appropriés et une forte rétention des composés inorganiques. Par conséquent, au cours des extractions à l'aide de solvants organiques (nécessaires pour conduire un certain nombre d'analyse, en particulier par RMN), la solubilisation de composés organiques peu polaires tels que les HAPs sera particulièrement efficace, ce qui ne sera pas le cas des composés fortement polaires ou inorganiques. Les teneurs en sels métalliques dans les extraits seront donc faibles, ce qui limitera les perturbations lors de l'analyse des extraits par RMN.

Le second support de prélèvement vise à collecter les composés présents dans la phase gazeuse des fumées de cigarettes. Il se compose d'un tube de verre contenant du charbon actif (SKC). Deux zones doivent être distinguées. La première, dite d'analyse, contient 400 mg de charbon actif. Elle est placée frontalement à l'arrivée des fumées. La seconde est nommée zone de contrôle et contient 200 mg d'adsorbant. Ces deux zones sont séparées par de la laine de verre. La zone de contrôle doit rester systématiquement vierge de tout composé d'intérêt. Dans le cas contraire, toute analyse quantitative est impossible, on dit alors que le tube est « claqué ». Deux facteurs peuvent être à l'origine de ce phénomène. La saturation de

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

l'adsorbant de la zone d'analyse ou un débit d'air trop élevé. Dans ce dernier cas, l'efficacité de l'adsorption n'est plus de 100 %. En effet, le processus de collecte de la phase gazeuse est basé sur la mise en jeu d'interactions faibles (physisorption). Un débit excessif peut être en mesure de perturber ces équilibres d'interactions. Ces équilibres de physisorption peuvent par ailleurs être facilement déplacés pour permettre par exemple la récupération des composés par désorption à l'aide de solvants.

L'emploi d'un tube de 400 et 200 mg de charbon actif permet une marge de manœuvre dans l'ajustement du débit de prélèvement mais induit une perte de charge importante dans le dispositif. Il est indispensable que la pompe soit robuste et adaptée. Il s'agit d'une pompe portative SKC 224-52TX dont le débit peut atteindre 3000 mL/min. Avant et après chaque prélèvement, le débit est contrôlé à trois reprises à l'aide d'un débitmètre à lame de savon. Selon la norme de fumage des cigarettes ISO 4387, le volume, la durée, ainsi que la fréquence des bouffées doivent être ajustés à 35 cm³, 2 s et 60 s respectivement. Un débit de 1050 mL/min doit donc être imposé au cours des bouffées. Deux vannes trois voies (P et C) situées de part et d'autre des supports de prélèvement permettent de simuler les bouffées manuellement sur une durée de 2 s.

Le prélèvement de la matière particulaire des SSS est réalisé, quant à lui, à l'aide d'un entonnoir renversé au dessus du foyer de combustion de la cigarette. Celui-ci est relié au support de prélèvement puis à une pompe du même type que celle utilisée pour les MSS mais à un débit de 2 L/min. Toutefois, il n'est pas possible d'être assuré de capter l'intégralité des SSS par cette méthode, des analyses quantitatives ne seront donc pas réalisées.

II.2.3. La procédure de fumage et de prélèvement

Avant d'effectuer un prélèvement, le débit de la pompe principale est mesuré grâce à un débitmètre à lame de savon connecté sur la vanne C (**Figure II-2**). Ainsi, les pertes de charges dues aux différents supports de prélèvement sont prises en compte.

Le prélèvement est réalisé en plusieurs phases qui sont décrites sur la **Figure II-3**.

La phase 1 correspond à l'allumage de la cigarette à l'aide d'une voie spécifique de la vanne C et grâce à une pompe dédiée et étalonnée à un débit d'environ 400 mL/min. Ainsi la première bouffée ne sera pas collectée permettant alors de s'affranchir des particularités liées à l'allumage.¹¹³ Celui-ci est réalisé à l'aide d'un briquet à gaz.

113 Li, S.; Olegario, R. M.; Banyasz, J. L.; Shafer, K. H. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2003**, *66*, 155-163.

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

La phase 2 est associée à la combustion de la cigarette entre deux bouffées. La pompe d'allumage est déconnectée et les supports de prélèvement sont isolés par les vannes P et C.

La phase 3 consiste à simuler une bouffée. Les deux vannes P et C sont ouvertes de façon à connecter la pompe à toute la ligne de prélèvement pendant 2 s. L'arrivée d'air à l'extrémité de la cigarette est forcée, ce qui accélère la combustion et conduit à l'apparition d'une zone incandescente.

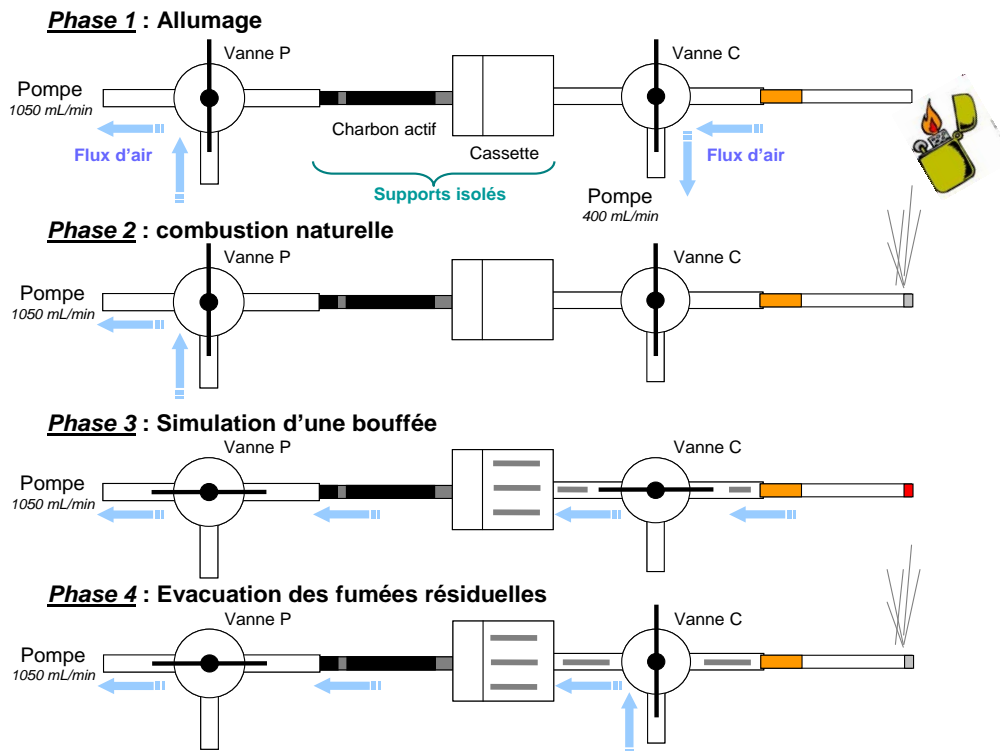


Figure II-3 : Description des différentes phases d'un prélèvement.

Durant la phase 4, la vanne C est positionnée de manière à permettre une arrivée d'air dans la ligne de prélèvement sans tirer sur la cigarette. Cette phase a pour but d'évacuer les fumées résiduelles dans la ligne et d'éviter la déposition de particules dans les conduits. Cette ouverture n'excède pas 2 s pour éliminer au maximum les contaminations présentes dans l'atmosphère et particulièrement celles dues aux SSS.

Les phases 2, 3 et 4 sont répétées jusqu'à ce que le foyer de combustion soit à 3,2 cm de l'extrémité de la cigarette. Cela correspond typiquement à 7 bouffées dans les conditions normalisées de fumage. Le prélèvement est alors terminé, la cigarette éteinte et le débit de la pompe de prélèvement à nouveau mesuré à trois reprises au niveau de la vanne C.

Régulièrement, des blancs de prélèvements sont effectués avec le dispositif mis en place, en appliquant la procédure normalisée de fumage sans intégrer de cigarette, ce qui

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

permet de définir dans quelle mesure les prélèvements précédents ont contribué à « contaminer » le dispositif. Ainsi, après 4 prélèvements successifs, l'analyse quantitative des BTEX d'un blanc de prélèvement met en évidence les pics du benzène et du toluène. Bien que les teneurs observées restent en deçà du seuil de quantification, un nettoyage du dispositif devient alors nécessaire pour éviter une dérive des mesures quantitatives.

II.2.4. Préparation des échantillons

II.2.4.A. Introduction

Après prélèvement, une préparation adéquate des différents échantillons recueillis (phase particulaire sur le filtre et phase gazeuse sur le charbon actif) est nécessaire pour permettre l'analyse quantitative par chromatographie gazeuse des traceurs retenus. Ces données quantitatives sont en effet indispensables pour valider la procédure de fumage et de prélèvement d'échantillon.

II.2.4.B. Conservation des prélèvements

Après chaque prélèvement, lorsqu'une conservation est nécessaire, les tubes de charbons actifs ainsi que les cassettes sont fermés hermétiquement et placés au réfrigérateur à 4°C. Avant d'être pesé, le filtre chargé de particules est conservé pendant 12 h au dessiccateur, puis 1 h à l'air ambiant. La masse mesurée est ensuite corrigée des variations d'hygrométrie, elles-mêmes déterminées par la pesée de trois filtres témoins.

II.2.4.C. Les composés associés à la phase gazeuse

Après prélèvement de la phase gazeuse des MSS sur charbon activé, l'adsorbant présent dans les zones de contrôle et dans la zone d'analyse est traité séparément, mais avec une procédure identique. Après extraction du tube, lui est ajouté 4 mL de sulfure de carbone (CS₂, LGC Promochem, pauvre en aromatiques) et il est mis pendant 20 minutes sous agitation (agitateur à rouleaux). Après décantation, un millilitre du surnageant est prélevé et introduit dans un flacon avant d'être déposé sur le passeur d'échantillons pour en réaliser l'analyse par chromatographie gazeuse.

II.2.4.D. Les composés associés à la phase particulaire

Le filtre de quartz peut suivre trois procédures différentes de préparation en fonction du type d'analyse à effectuer. Celle-ci est soit qualitative (LDI-FTICRMS, ESI-FTICRMS ou RMN), soit quantitative (GC-MS).

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

Pour une analyse quantitative par GC–MS, le filtre est soumis à deux extractions successives par 50 mL de dichlorométhane (Carlo Erba de qualité pestipur) pendant 20 min sous ultrasons. Les 100 mL de solution sont ensuite regroupés dans un flacon puis concentrés à l'aide d'un évaporateur de type Turbovap sous flux d'azote. Le principe de ce dispositif est décrit sur **Figure II-4**.

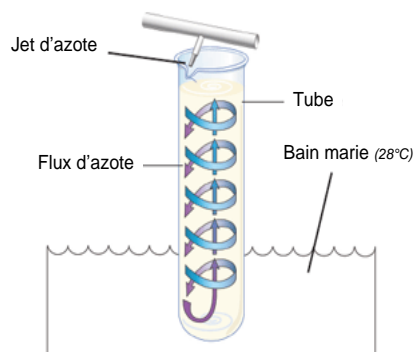


Figure II-4 : Principe de l'évaporation au Turbovap

L'extrait est introduit dans un tube adapté à l'évaporateur puis placé dans l'enceinte contenant de l'eau thermostatée à 28°C. Un courant d'azote est ensuite envoyé à la surface de l'échantillon pour accélérer l'évaporation. Celui-ci est stoppé lorsqu'il ne reste plus qu'environ 10 mL de solvant. La solution est ensuite filtrée sur une membrane de 0,2 µm pour éliminer les fibres de quartz en suspension et le volume amené à 20 mL avec du dichlorométhane. Un millilitre de cette solution est introduit dans un flacon et placé sur le passeur d'échantillons pour analyse chromatographique.

Lorsque l'analyse de l'extrait est réalisée par ESI–FTICRMS, une extraction au soxlhet a été préférée de manière à limiter la détérioration du filtre en fibres de quartz et réduire les risques d'obturation du capillaire pendant l'infusion (plusieurs minutes) dans la source ESI. L'extraction est réalisée sur 20 cycles par 75 mL de solvant (hexane, dichlorométhane ou méthanol).

Pour une analyse par LDI–FTICRMS, le filtre est coupé en deux parties selon l'axe vertical du dispositif de prélèvement pour moyenniser les effets de discrimination en fonction de la masse des particules (particules les plus pesantes en bas et les plus légères en haut) dus à l'orientation de la cassette lors du prélèvement. Cette moitié de filtre est ensuite fixée sur une plaque en acier inoxydable et introduite dans la source d'ionisation laser du spectromètre de masse.

Pour les analyses par RMN et pour des raisons de sensibilité, deux cigarettes sont fumées successivement à l'aide de notre dispositif et la phase particulaire issue de ces deux

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

expériences est collectée sur un même filtre. Les composés organiques sont ensuite extraits des particules avec deux fois 50 mL de dichlorométhane par sonication pendant 20 min. Cette procédure (collecte et extraction) est répétée une seconde fois, l'ensemble des extraits est alors regroupé. Les 200 mL de solution sont ensuite concentrés et amenés à environ 10 mL à l'aide du Turbovap puis amenés à sec à l'aide d'un évaporateur de type Réactitherm© (Thermo) à une température de 28°C. Le résidu est repris avec 200 µL de chloroforme deutéré (CDCl₃), amené une nouvelle fois à sec puis finalement dissous dans 600 µL de CDCl₃ pour l'analyse RMN. Cette procédure est nécessaire pour éviter que le signal RMN en ¹H ne soit perturbé et saturé par les contributions du solvant (dichlorométhane).

II.3. Analyses quantitatives et validation de méthodes

II.3.1. Introduction

La validation de la méthode de prélèvement et de fumage décrite dans le paragraphe précédent requiert l'obtention de données quantitatives pour un certain nombre de composés reconnus comme traceurs. Cette validation nécessite de déterminer l'étendue des variations possibles, la reproductibilité des résultats obtenus et de les comparer, dans la mesure du possible, à la littérature. La quantification des traceurs retenus est effectuée à l'aide de différentes méthodes de chromatographie gazeuse qui seront décrites avant que des analyses statistiques ne soient entreprises dans un premier temps pour valider les méthodes de quantification avant que ne soit réellement conduite l'étape de validation de la méthode de prélèvement et de fumage.

II.3.2. Choix des traceurs

Les traceurs sont choisis de manière à être représentatifs de différents processus qui ont lieu au sein de la cigarette. Ainsi, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont reconnus pour être formés par des réactions de pyrolyse. La formation des HAPs résultent de processus impliquant un cycle benzénique originel. En conséquence, l'étude des composés mono-aromatiques (BTEX) a été jugée pertinente. L'examen conjoint du benzène et des HAPs permet une description des variabilités de comportements des composés pyrolytiques volatils (BTEX) et semi volatils (HAPs).

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

L'examen de la concentration en nicotine dans les différents échantillons apparaît également intéressant puisqu'il s'agit d'un composé qui peut être transféré de manière intacte du tabac à la fumée. Il s'agit aussi d'une molécule qui est étudiée de manière quasi-systématique au sein des fumées de cigarette. Son analyse est donc fortement documentée dans la littérature.

La nécessité de recourir pour la validation de notre méthode de fumage et de prélèvement à des données quantitatives et de devoir travailler au sein d'une matrice complexe nous a conduits à employer la chromatographie en phase gazeuse pour les différentes classes de traceurs retenus. L'analyse des BTEX est conduite par GC-FID, celle de la nicotine et des HAPs par GC-MS/MS. Le principe de ces méthodes va être décrit dans les paragraphes suivants.

II.3.3. *La chromatographie*

La chromatographie est une technique visant à séparer les différents constituants d'un mélange en fonction d'une ou de plusieurs caractéristiques physiques, physico-chimiques ou chimiques. Dans le domaine analytique, elle sert à identifier et quantifier des composés au sein d'un échantillon. Le principe repose sur la mise en place d'équilibres de partage entre deux phases lorsqu'une molécule se retrouve à leur interface. Classiquement, en chromatographie, l'une de ces phases est immobilisée, on parle de phase stationnaire, alors que la seconde est dite mobile. Des molécules différentes dans un mélange présentent des affinités spécifiques à chacune des deux phases et des équilibres caractéristiques de chacun des composés s'établissent. Une forte affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire ralentira sa progression dans la colonne chromatographique, il sortira de la colonne plus tardivement qu'un composé qui possède une faible affinité avec la phase stationnaire. L'ordre d'élution (de sortie) est donc fonction des ordres d'affinité molécules-phase stationnaire. Les molécules apparaissent ainsi séparées.

Il existe d'autres principes de séparation chromatographique comme l'emploi de tamis moléculaire ou le principe de l'exclusion stérique. Non utilisés dans cette étude, ils ne seront pas détaillés.

Parmi toute les techniques chromatographiques disponibles actuellement, la méthode qui sera mise en œuvre dans cette étude sera la technique de chromatographie en phase gazeuse (GC). La phase stationnaire se trouve dans ce cas dans une colonne capillaire pouvant atteindre plusieurs centaines de μm de diamètre et de quelques dizaines de mètre de longueur

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

qui est traversée par la phase mobile, dans ce cas un gaz (généralement de l'hélium ou de l'azote) à un débit ou une pression fixe. De manière classique, le capillaire est constitué d'une paroi de silice fondu tapissée de phase stationnaire. Il existe une grande variété de phases disponibles, bien souvent plusieurs sont associées dans des proportions variables. L'ensemble est placé dans un four dont la température est comprise entre l'ambiante et quelques centaines de degrés Celsius. Dans la plupart des cas, des programmes de températures associant des rampes de température et des plateaux à température constante sont mis en jeu pendant une durée qui peut atteindre une à deux heures. L'échantillon est introduit en phase liquide (ou gazeuse pour certaines techniques) dans l'injecteur porté à très haute température afin qu'il soit vaporisé instantanément et arrive en tête de colonne. A la sortie de la colonne, les espèces sont détectées par des dispositifs appropriés comme l'ionisation de flamme ou la spectrométrie de masse par exemple. Pour chaque classe de traceurs retenus, il a été nécessaire de mettre en place une méthode chromatographique spécifique.

II.3.3.A. Analyse de la Nicotine et des HAPs

Les concentrations en nicotine et en HAPs sont déterminées pour la phase particulière des fumées de cigarette prélevée sur le filtre de quartz. L'échantillon préparé se trouve dans le dichlorométhane.

L'analyse est conduite par GC-MS avec l'instrument « Varian 240 MS ». Au cours du processus d'injection, une seringue de 10 μL prélève 1 μL d'échantillon et 1 μL d'une solution d'étalon interne contenant un mélange de HAPs deutérés. L'ensemble est injecté en mode « splitless » (fermeture du split durant 0,5 min au moment de l'injection puis division de débit de 50%) dans un insert chauffé à 300 °C permettant de vaporiser les analytes et de les amener en tête de colonne.

Celle-ci est une colonne capillaire de Rxi-5Sil MS de 30 m de long (5 m de précolonne intégrée, dont le diamètre interne est de 0.25 mm et l'épaisseur du film de phase stationnaire de 0,25 μm ; aucune information sur la composition de la phase stationnaire n'est fournie par le fabricant. Elle est placée dans un four dont le programme de température est donné dans le **Tableau II-2**.

L'hélium pur, à un débit de 2 mL/min, est utilisé comme gaz vecteur. La détection est réalisée par spectrométrie de masse en tandem en faisant appel à des transitions spécifiques aux composés recherchés.

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

Tableau II-2 : Programme de température pour l'analyse GC-MS/MS de la nicotine et des HAPs

Température (°C)	Pente (°C/min)	Durée du palier (min)	Temps (min)
75	0	0.5	0.5
245	25	0	7.3
320	5	1	23.3

II.3.3.B. Analyse des BTEX

L'analyse des BTEXs est réalisée par GC-FID à partir des solutions obtenues par désorption au CS₂, des molécules adsorbées sur charbon actif. La matrice est en conséquence moins complexe que dans le cadre de l'analyse de la fraction particulaire. L'analyse des BTEX est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse « Varian 450 double FID » équipé d'un passeur d'échantillons, de deux colonnes capillaires de polarités différentes et de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID).

Au cours d'une injection, la pointe de la seringue traverse le septum et prélève 1 µL de la solution d'échantillon et 1 µL de bromofluorobenzène (BFB) utilisé comme étalon interne. L'ensemble est injecté dans un insert chauffé à 220°C. Les composés sont entraînés en tête de colonne en mode splitless par l'hélium utilisé comme gaz vecteur (1 mL/min). La partie de gaz restant dans l'insert (principalement des vapeurs de solvant) est évacuée par une vanne de purge après l'injection.

A la sortie de l'injecteur, une ligne de transfert remplie de silice désactivée est employée et conduit les composés volatilisés vers un diviseur de flux à rapport fixe. Les composés sont alors répartis de manière égale entre les deux colonnes en silice fondue. La première est une colonne rtx WAX (phase stationnaire constituée de silice greffé polyéthylène glycol, épaisseur 0,5 µm ; polaire) et la seconde de type rtx 502.2 (phase stationnaire diméthyle/diphényle-polysiloxane, épaisseur 1,40 µm ; moyennement polaire) de mêmes dimensions (60 m x 0,25 mm).

II.3.4. Détection par ionisation de flamme

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) est l'un des détecteurs les plus utilisés en chromatographie gazeuse notamment pour la détection de composés organiques volatils (COV). Le flux gazeux en sortie de colonne est amené dans la flamme via un gaz d'appoint (Hélium) ajusté de manière à avoir un débit total de 30 mL/min pour éviter la dilution et la stagnation des composés. La combustion des composés organiques dans une flamme air/hydrogène (10 :1, v :v) produit des ions qui sont collectés par une électrode entourant la

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

flamme. Ce courant de flamme est amplifié par un électromètre et transformé en tension qui peut être mesurée. Inopérante pour les composés inorganiques, la sensibilité dépend du nombre de liaisons carbone-hydrogène présent dans le composé analysé. Par ailleurs, la sensibilité peut être influencée par la présence d'hétéroatomes comme des halogènes.

La **Figure II-5** présente le chromatogramme obtenu par GC-FID dans le cadre de l'analyse des BTEX sur les deux colonnes employées ainsi que le programme de température utilisé. Pour chacune des colonnes, la séparation chromatographique est efficace. Les différents composés sont séparés dans un premier temps selon leur température d'ébullition. Les composés les plus volatiles entrent donc en tête de colonne plus rapidement et sortent en premier (le benzène, puis le toluène etc ...). Cette séparation est ensuite affinée selon la polarité des différentes molécules. Les temps de rétentions sont, par conséquent, fonction des affinités entre les différentes molécules et la phase stationnaire. On observe sur la **Figure II-5** un décalage des temps de rétention lorsque la phase stationnaire est modifiée. En effet les BTEX sortent plus rapidement sur une colonne de type WAX, polaire, que sur une colonne 502.2, moyennement polaire. De plus, les noyaux aromatiques des BTEX vont être plus retenus de part les interactions attractives des électrons aromatiques π avec les électrons π des groupements phényle de la phase stationnaire. Les temps de rétention du benzène et du toluène sur les deux colonnes sont donnés dans le **Tableau II-3**.

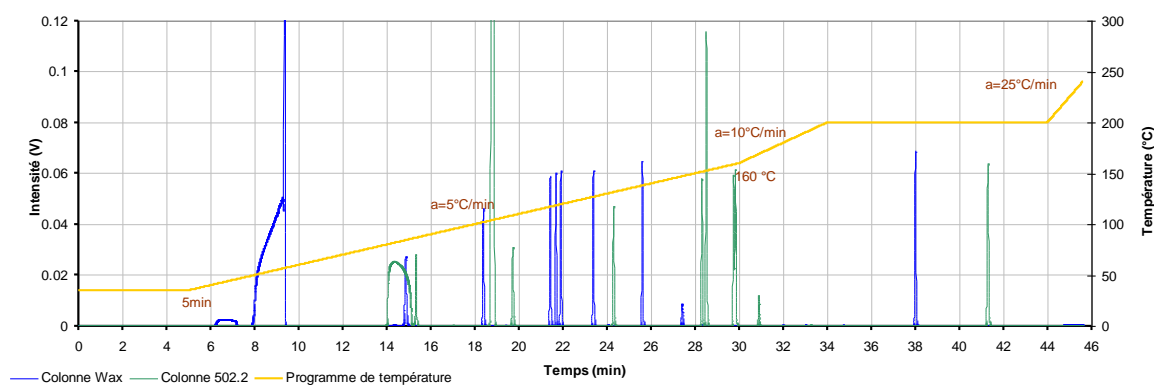


Figure II-5 : Chromatogramme d'un échantillon contrôle de BTEX à 100 ng/mL obtenu en CG-FID sur une colonne WAX (bleu) et 502.2 (vert)

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

Tableau II-3 : Temps de rétention du benzène, du toluène et du bromofluorobenzène (étalon interne) sur les deux colonnes chromatographiques employées

Molécule	Colonne WAX	Colonne 502.2
Benzène	14.843	19.705
Toluène	18.369	24.281
BFB	27.303	30.847

Bien que très sensible, ce type de détecteur n'est pas spécifique. Adapté à l'analyse de mélanges peu complexes comme ceux associés à l'extrait CS₂ de charbon activé, il ne peut être employé dans l'étude des extraits obtenus à partir de la fraction particulaire de fumée de cigarette. L'utilisation d'un mode de détection plus spécifique comme la spectrométrie de masse en tandem a donc été privilégiée.

II.3.5. Détection par spectrométrie de masse de type piège à ions

II.3.5.A. Production des ions

Le spectromètre de masse utilisé est un piège à ions. La sortie de la colonne chromatographique permet d'injecter directement les espèces analysées au sein du piège. Un flux d'électrons produits par effet thermoélectronique et accéléré à une énergie de 70 eV est dirigé au centre du piège où ils interceptent le flux de molécules neutres venant de la colonne chromatographique.

L'interaction d'électrons rapides et de molécules neutres conduit à l'arrachement d'un électron et donc à la formation d'un ion chargé positivement. Ce mode d'ionisation est appelé impact électronique (EI). Il s'agit d'une méthode d'ionisation particulièrement efficace puisque l'énergie des électrons est bien supérieure à l'énergie de première ionisation de l'ensemble des composés organiques. Elle a cependant l'inconvénient de transférer un fort excès d'énergie à l'ion produit qui subit alors un nombre important de fragmentations. En conséquence, pour une molécule donnée, le spectre de masse est souvent très riche et constitue dans bien des cas une véritable carte d'identité du composé étudié. La normalisation des conditions d'ionisation offre à cette technique l'avantage considérable d'une importante reproductibilité des expériences. La comparaison du spectre de masse obtenu à une base de données peut assurer l'identification du composé étudié.

La structure condensée des HAPs leur confère une forte stabilité, les fragments produits par ionisation EI sont dans ce cas peu nombreux et peu intenses.

II.3.5.B. Spectromètre de masse par piège à ions

II.3.5.B.a. Description du piège ionique

La **Figure II-6** décrit de manière schématique un piège à ions quadripolaire. Le piège à ions est constitué d'une électrode annulaire de rayon r ainsi que d'un couple d'électrodes dites « chapeaux », distantes d'une longueur égale à $2Z$. Z est défini comme la distance qui sépare le centre du piège et le sommet de l'une ou l'autre des électrodes chapeaux. L'application sur ces deux types d'électrodes d'une combinaison de potentiel alternatif (appelée typiquement RF) et continus, conduit à créer au sein du piège un champ quadripolaire au sein duquel les ions produits par impact électronique vont adopter des trajectoires décrivant des figures de Lissajous. Afin de thermaliser et de contraindre les ions à demeurer proche du centre du piège, de l'hélium est introduit. Les électrodes chapeaux qui sont placées selon l'axe vertical sont toutes deux traversées par un orifice. Pour l'électrode supérieure, cela permet aux électrons d'être introduits dans le piège alors que pour l'autre, cet orifice permet le passage des ions afin qu'ils puissent être détectés.

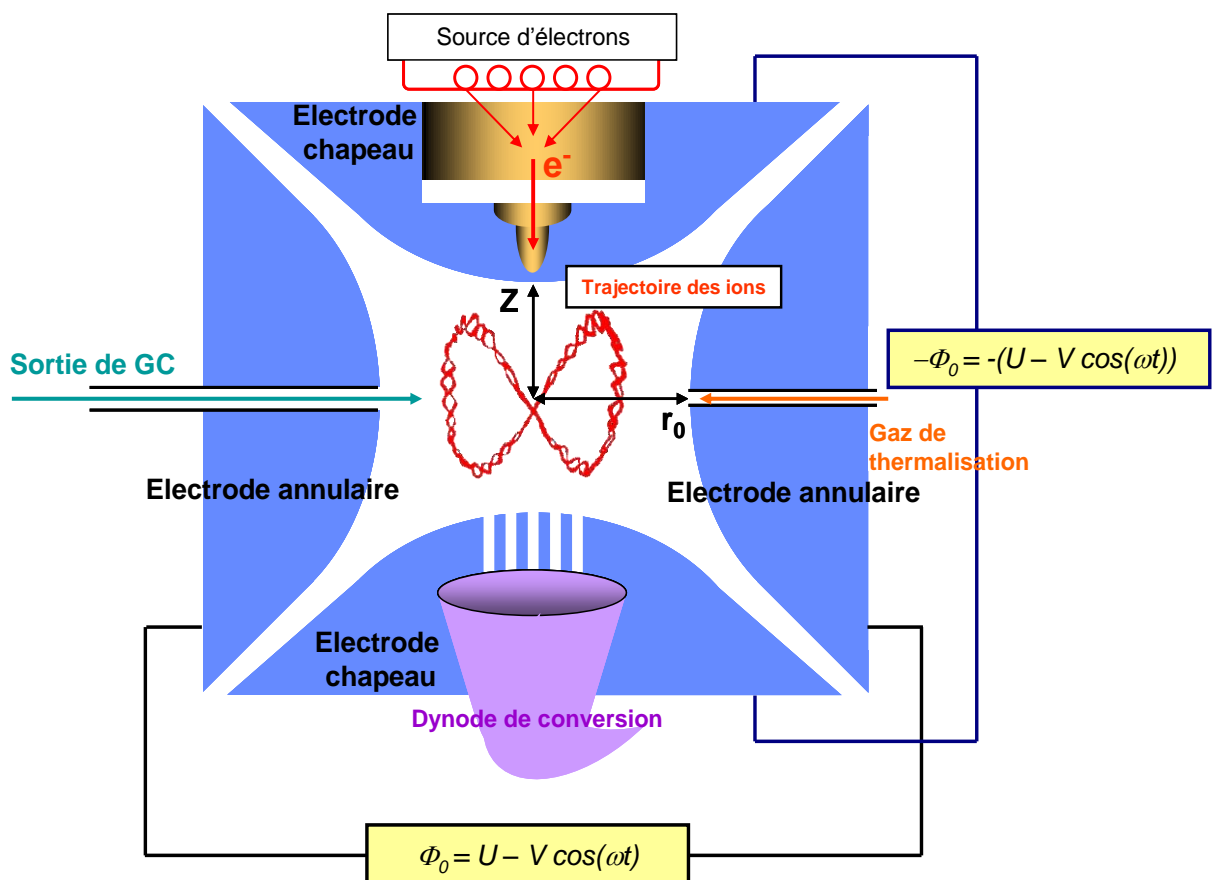


Figure II-6 : Représentation schématique d'un piège à ions

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

II.3.5.B.b. Mécanisme de piégeage des ions

L'application d'une combinaison d'un potentiel continu U et d'une tension alternative d'amplitude V et de fréquence ω conduit à la création d'un champ quadripolaire pour lequel la polarité des électrodes s'inverse périodiquement. Les ions d'une polarité donnée vont donc successivement être attirés puis repoussés par les différentes électrodes. Deux situations peuvent alors se produire. Soit l'amplitude de ces phénomènes d'attraction et de répulsion conduit l'ion à être peu à peu déstabilisé et finalement à être éjecté, ou bien l'amplitude des mouvements de l'ion sont suffisamment faibles pour qu'il puisse conserver une trajectoire stable dans le piège. Comme l'indique la **Figure II-6**, les combinaisons de potentiels alternatifs et continus sont différentes pour les électrodes chapeaux et pour l'électrode annulaire. Il faut en conséquence que l'ion adopte une trajectoire stable selon le plan médian du piège qui est couramment appelé axe radial ou r et l'axe axial noté Z .

La résolution des équations différentielles (appelées également équations de Mathieu que nous ne développerons pas ici) qui décrivent le mouvement d'un ion de rapport m/z donnée selon le plan xy – l'axe r – et l'axe Z conduit à deux équations (1) et (2) qui lient quatre paramètres a_r , a_z , q_r et q_z à U ou V

$$a_z = -2a_r = \frac{-16zeU}{m\omega^2(r_0^2 + 2Z_0^2)} \quad (1)$$

$$q_z = -2q_r = -\frac{8zeV}{m\omega^2(r_0^2 + 2z_0^2)} \quad (2)$$

Où z est la charge de l'ion, e la charge élémentaire, m la masse de l'ion, r_0 le rayon de l'électrode annulaire et U et V les potentiels continus et alternatifs, respectivement.

Ces paramètres permettent de définir, pour un ion de rapport m/z donné, des zones de stabilité selon a_u et q_u ($u = r$ ou Z) donc en fonction de U et V . Elles sont reportées sur la **Figure II-7**. La nécessité que la trajectoire d'un ion soit stable selon les deux axes r et Z impose qu'il faille que l'on se trouve simultanément dans les zones bleues et vertes qui sont appelées zone de stabilité. Pour limiter la valeur des potentiels appliqués on se place de manière quasi systématique dans la zone de stabilité I dont un agrandissement est donné sur la gauche de la **Figure II-7**.

En réalité, pour un couple de valeurs U/V , des ions possédant des rapports m/z différents peuvent être piégés simultanément comme par exemple les ions de rapport m/z m_1 ,

m_2 et m_3 sur la **Figure II-7**. Cependant, l'efficacité du piégeage n'est pas identique pour chacun d'entre eux. Celui qui possède la stabilité la plus grande est celui pour lequel le puits de potentiel quadripolaire (fonction de U et de V) est le plus profond (E_{\max}).

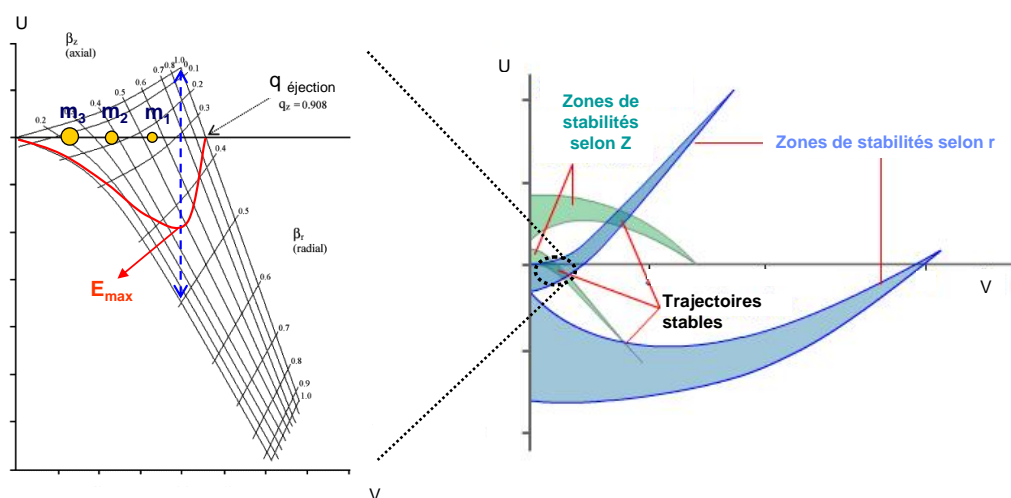


Figure II-7 : Zones de stabilité des ions selon Z et r (gauche) et agrandissement d'une zone de piégeage efficace des ions (droite) dans un piège ionique¹¹⁴

II.3.5.B.c. Détection des ions

L'analyse des ions est réalisée par éjection des ions vers le détecteur qui est orienté selon l'axe z . En conséquence, l'étape de détection aura pour objet de déstabiliser la trajectoire de l'ion selon cet axe. Deux procédures sont employées :

➤ Détection à la limite de stabilité

Dans les instruments commerciaux, aucun potentiel continu n'est appliqué. La zone de stabilité correspond donc à l'axe des abscisses ou axe V . Elle est souvent appelée droite des q_z puisque ce paramètre est directement proportionnel à V . Selon le schéma de la **Figure II-7**, pour une valeur V donnée, les autres paramètres étant fixés, tous les ions de rapport m/z qui possèdent une valeur de $q_z < 0,908$ adoptent une trajectoire stable. En augmentant progressivement la valeur de V on va déstabiliser progressivement tous les ions qui se trouvent dans le piège en commençant par les ions de bas rapport m/z . Ils frappent alors le détecteur où ils produisent un signal. La connaissance de la valeur de V (donc du rapport m/z de l'ion) et de l'intensité du courant produit permet ainsi de tracer le spectre de masse.

114 Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry, Principles and Applications*; Wiley.

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

➤ Détection par éjection résonnante

Pour ce mode de détection, une radio-fréquence supplémentaire est appliquée. Celle-ci correspond à la fréquence d'oscillation selon Z de l'ion que l'on cherche à détecter. Il entre alors en résonance, est déstabilisé, éjecté et finalement détecté.

II.3.5.B.d. Analyse en mode MS/MS

L'analyse par spectrométrie de masse en tandem requiert toujours trois étapes : l'isolation d'un ion précurseur (ion parent), sa fragmentation par une méthode d'activation et la détection du ou des ions fils. Dans notre cas, l'isolation de l'ion parent se fait par éjection résonnante de tous les autres ions présents.

L'ion parent est amené sur une orbite haute en appliquant sur les électrodes une radio-fréquence correspondant à la fréquence d'oscillation de l'ion. Dans ce cas, un phénomène de résonance prend place. Il faut cependant prendre garde que l'ion ne soit pas amené sur une trajectoire trop haute ce qui aurait pour effet de l'éjecter. L'ion parent voit ainsi son énergie cinétique augmenter après son excitation résonnante. Les collisions entre cet ion et le gaz résiduel conduisent à transformer une partie de son énergie cinétique en énergie interne. L'excès d'énergie interne se répartit dans les différents degrés de liberté de l'ion et va conduire si cela est suffisant, à la dissociation de liaisons et produire ainsi des ions fragments. Ce mode de fragmentation est appelé dissociation induite par collision (CID).

II.3.5.B.e. Chromatogrammes obtenus en GC-MS/MS

Dans le cadre du couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse en tandem, afin d'augmenter la sensibilité pour un composé considéré, seul un ion parent et une transition (c'est à dire une seule voie de fragmentation) sont considérés. Ce mode d'acquisition est le mode MRM ou Multiple Reaction Monitoring, il s'agit de la méthode classiquement employée pour réaliser, grâce à la spectrométrie de masse en tandem, la quantification des espèces étudiées. Le chromatogramme obtenu et les transitions observées en fonction du temps sont donnés sur la **Figure II-8** et sur le **Tableau II-4**. L'ensemble des traceurs (HAPs et nicotine) sont parfaitement séparés comme le montre la **Figure II-8**.

Les fragments suivis correspondent à des pertes de : (2H), (2C), (2C, 2H), (2C, 3H) en MS/MS pour les HAPs. Celles-ci sont typiques des HAPs en CID et déjà référencées dans la

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

littérature.¹¹⁵ Pour la nicotine, la transition choisie correspond à la fragmentation de l'ion parent $[M - H]^+$ de la nicotine, à m/z 161, pour conduire à l'ion fragment $[M - H - 2H]^+$, le plus intense sur le spectre de fragmentation (**Figure II-9**).

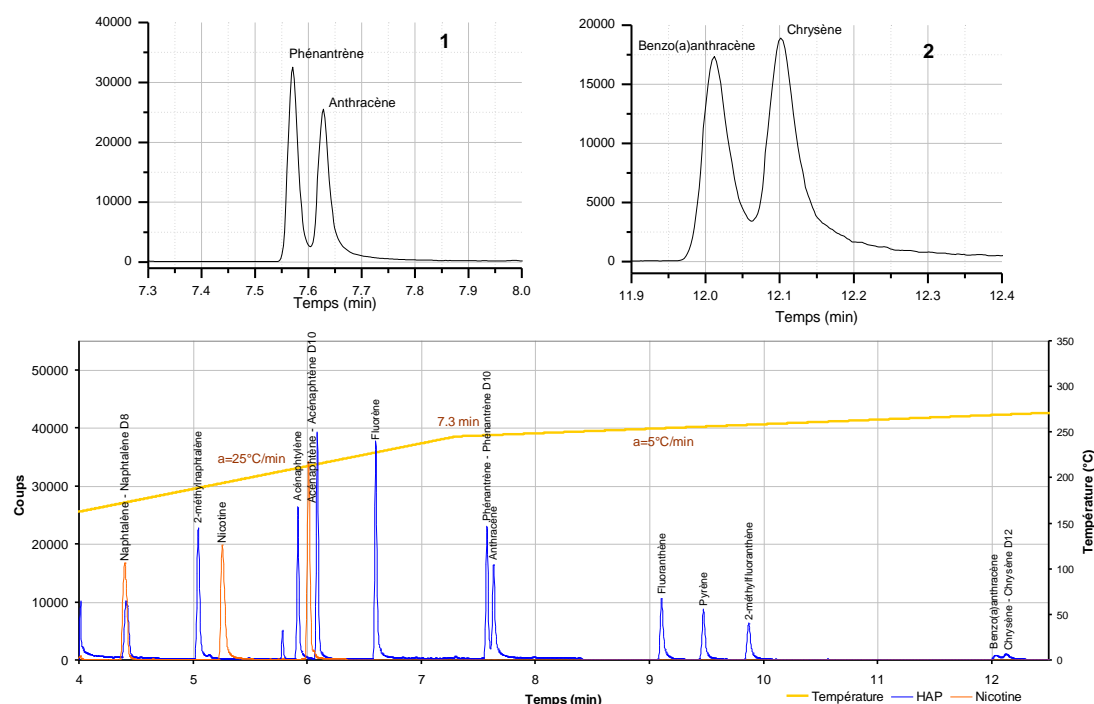


Figure II-8 : Chromatogramme d'un échantillon de contrôle à 100 ng/mL pour les HAP (bleu) et 6,4 µg/mL pour la nicotine (orange). Dans les deux cas, les étalons internes sont présents à 100 ng/mL

Tableau II-4 : Segments GC-MS/MS pour l'analyse de la nicotine, de 12 HAPs et méthyl-HAPs

N°	Nom du segment	Début (min)	Fin (min)	Ion(s) parent(s)	Ion(s) Fragment(s)
Segments de la méthode GC-MS/MS : HAPs et méthyl-HAPs					
1	Filament OFF	0	4	/	/
2	Napht ; Napht D8	4	4,7	$C_{10}H_8^{+} / C_{10}D_8^{+}$	$C_8H_6^{+} / C_8D_6^{+}$
3	2 méthyl-napht.	4,7	5,4	$C_{11}H_{10}^{+}$	$C_9H_7^{+}$
4	Acenaphtylène	5,4	6	$C_{12}H_8^{+}$	$C_{12}H_6^{+}$
5	Acenaphtène ; Acenapht D10	6	6,4	$C_{12}H_{10}^{+} / C_{12}D_{10}^{+}$	$C_{12}H_8^{+} / C_{12}D_8^{+}$
6	Fluorène	6,4	7,1	$C_{13}H_9^{+}$	$C_{13}H_7^{+}$
7	Phen.-Anthra. ; Phen. D10	7,1	8,4	$C_{14}H_{10}^{+} / C_{14}D_{10}^{+}$	$C_{12}H_{10}^{+} / C_{12}D_{10}^{+}$
8	Fluoranth-Pyr.	8,4	9,7	$C_{16}H_{10}^{+}$	$C_{16}H_8^{+}$
9	2-méthylfluoran.	9,7	11	$C_{17}H_{12}^{+}$	$C_{17}H_{10}^{+}$
10	Benzo(a)antr-Chrysène ; Chrys D12	11	13,5	$C_{18}H_{10}^{+} / C_{18}D_{10}^{+}$	$C_{18}H_8^{+} / C_{18}D_8^{+}$
Segments de la méthode GC-MS/MS : Nicotine					
1	Filament OFF	0	4	/	/
2	Napht D8	4	4,7	$C_{10}H_8^{+} / C_{10}D_8^{+}$	$C_8H_6^{+} / C_8D_6^{+}$
3	Nicotine	4,7	6	$C_{10}H_{13}N_2^{+}$	$C_{10}H_{11}N_2^{+}$
4	Acenapht D10	6	6,4	$C_{12}H_{10}^{+} / C_{12}D_{10}^{+}$	$C_{12}H_8^{+} / C_{12}D_8^{+}$
5	Filament OFF	6,4	23	/	/

¹¹⁵ Wang, X.; Becker, H. r.; Hopkinson, A. C.; March, R. E.; Scott, L. T.; Böhme, D. K. *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, *161*, 69-76.

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

Le chromatogramme de la **Figure II-8** qui reporte le TIC en fonction du temps semble indiquer une grande différence de facteur de réponse pour les différents HAPs étudiés alors qu'ils sont injectés à la même concentration. L'effet conjoint de plusieurs phénomènes peut expliquer la diminution de sensibilité observée. Des processus de diffusion plus importants, à mesure que la taille du HAP augmente, conduisent, comme on peut le voir en haut de la **Figure II-8**, à un élargissement des pics. Une diminution de l'efficacité de vaporisation des HAPs à mesure que leur masse croît mais aussi une moins grande efficacité de piégeage des ions de plus haut rapport m/z (comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent) peuvent expliquer une partie de la baisse du facteur de réponse.

La **Figure II-9** présente les chromatogrammes obtenus au cours de l'analyse des composés extraits des particules de MSS. Aucune interférence associée à la matrice dans le cas d'un échantillon d'extrait de fumées de cigarette n'est observée. La validation de la méthode va être réalisée en employant le mode MRM pour les traceurs retenus et en employant des HAPs deutérés comme étalon interne.

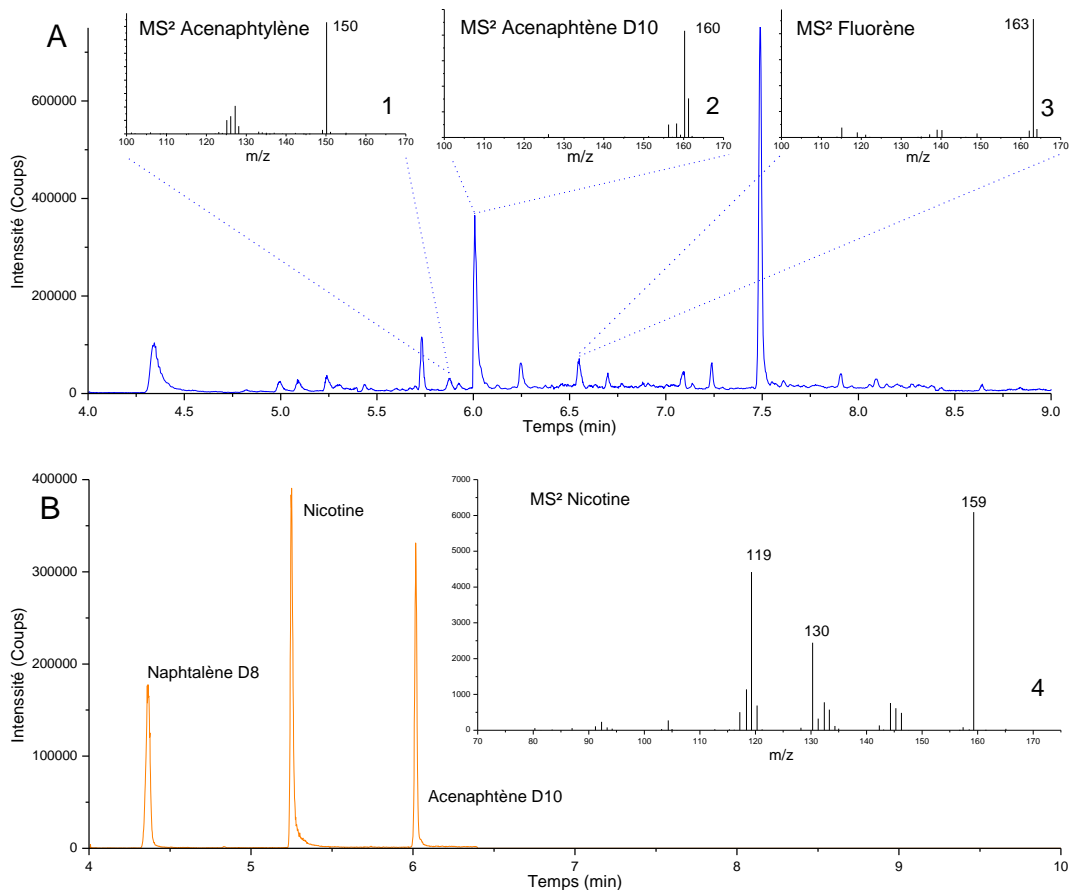


Figure II-9 : Chromatogrammes des composés adsorbés à la surface de particules de MSS et extraits du filtre de quartz. Spectres de masse en tandem de différents HAPs employés comme traceurs A et de la nicotine B

II.3.6. Validation des méthodes de quantification des traceurs

Avant de pouvoir valider notre méthodologie de fumage et de prélèvement des fumées de cigarette à l'aide du suivi quantitatif des différents traceurs retenus, il est nécessaire que soient au préalable validées les différentes méthodes mises en place pour mesurer la concentration des BTEX, des HAPs et de la nicotine dans les MSS. Cette validation consiste à vérifier la linéarité de la réponse sur la gamme de concentration considérée, à déterminer les incertitudes de mesure ainsi que les rendements de préparation et à établir pour finir des cartes de contrôle.

Les jeux de données utilisés ainsi que les résultats des différents tests sont donnés en annexe I, II et III, seuls sont présentés dans ce chapitre les résultats obtenus pour la nicotine analysée par GC-MS/MS. L'ensemble des tests statistiques utilisés dans ce travail est réalisé avec un niveau de confiance de 99%. La méthode de quantification des BTEX par GC-FID est validée par le laboratoire Eurofins Hygiènes des Lieux de Travaux et utilisée en routine dans le cadre d'analyse sous accréditation COFRAC. Ces résultats ne seront pas présentés ici.

II.3.6.A. Validation de la linéarité

II.3.6.A.a. Introduction

Pour effectuer le test de linéarité, on analyse quotidiennement par GC-MS/MS avec la méthode décrite précédemment, cinq solutions de concentrations différentes définissant cinq niveaux pendant cinq jours. On obtient ainsi un jeu de 25 essais. L'ensemble de ce jeu de données permet de définir l'équation qui relie de manière linéaire l'intensité et la concentration de nicotine. La droite d'étalonnage a pour équation :

$$C_{mes} = a \times C_e + b \quad (3)$$

C_{mes} est la concentration en analyte mesurée par GC-MS² dont la valeur est calculée par le logiciel de traitement à partir des aires des pics chromatographiques de l'analyte et de l'étalon interne. C_e est la concentration de l'étalon injecté. Ces deux concentrations sont données en masse par millilitre de solvant. Ce modèle va être validé selon deux méthodes : celle des écarts maximum acceptables et celle des statistiques globales.

II.3.6.A.b. Méthodes des écarts maximums acceptables (EMA)

Pour cette étude, le modèle linéaire est testé pour chaque niveau. Ainsi, pour les 25 essais réalisés, dont les résultats sont regroupés dans le **Tableau II-5**, les concentrations sont

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

recalculées par le modèle et comparées aux valeurs théoriques. L'écart, amené en pourcentage doit être inférieur à une valeur seuil. La norme de validation de méthode NF 90 210 préconise dans ce cas des écarts inférieurs à 10% pour chaque niveau, hormis pour le premier (0,32 µg/mL) qui correspond à la limite de quantification et pour lequel une valeur seuil de 40% est tolérée.

Tableau II-5 : Vérification des EMA dans le cas de la nicotine

Calcul des écarts relatifs					
	Niv 1	Niv 2	Niv 3	Niv 4	Niv 5
Linéarité N°	0,32 µg/mL	3,23 µg/mL	6,45 µg/mL	9,03 µg/mL	12,90 µg/mL
1	11%	0%	-1%	0%	0%
2	18%	-3%	-3%	5%	-1%
3	-38%	3%	3%	-2%	0%
4	-17%	-8%	6%	2%	-2%
5	-16%	-3%	5%	-1%	0%
Ecart max	38%	8%	6%	5%	2%
EMA (%)	40%	10%	10%	10%	10%
Test	Validé	Validé	Validé	Validé	Validé

Les écarts de prédiction du modèle linéaire n'excèdent pas les limites définies par la norme de validation de méthode NF 90 210, le modèle linéaire est donc validé par cette première méthode.

II.3.6.A.c. Validation de la linéarité par les statistiques globales

Pour valider la méthode de quantification par GC-MS/MS, la linéarité de la réponse obtenue sur l'ensemble de la gamme de concentration choisie est soumise à un certain nombre de calculs statistiques qui ont pour but de définir les variations totales attribuées à la linéarité des variations, au défaut de linéarité et à l'erreur expérimentale. Le détail des calculs est donné dans le **Tableau II-6**, pour un jeu de N données notées i et de niveaux de concentrations notés j.

La variance est calculée en effectuant le rapport de la somme des carrés des écarts à la moyenne (SCE) sur le nombre de degrés de liberté (ddl) correspondant. Les variations expliquées par la linéarité ainsi que celles expliquées par la non-linéarité sont comparées à la variance expérimentale par un test de Fisher. Il s'agit d'un test unilatéral qui vise à déterminer

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

si les variances testées sont statistiquement égales ou différentes pour un risque α donné, ici 1 %, puisque le niveau de confiance retenu est de 99 %.

Tableau II-6 : Vérification de la linéarité du modèle dans le cas de la nicotine

Source des variations	SCE	ddl	V _{estimée}	F _{calc}	F _{ddl1 ; ddl2}
Linéarité	$a^2 \sum (x_i - \bar{x})^2$	1	SCE _l /ddl _l	s_{reg}^2/s_e^2	
Non linéaire	$SCE_{tot} - SCE_e - SCE_l$	P-2	SCE _{nl} /ddl _{nl}	s_{nl}^2/s_e^2	
Expérimentale	$\sum_j SCE_j$	N-P	SCE _e /ddl _e		
Totale	$\sum_i (y_i - \bar{y})^2$	N-1			
Résultats					
Linéarité	477,1	1	477,14	11533,59	8,10
Non linéaire	0,2	3	0,05395	1,30	4,94
Expérimentale	0,8	20	0,04137	Test	Validé
Totale	478,1	24			

L'application du test de Fisher (deux colonnes de droite) montre que la variance expliquée par le défaut de linéarité est sensiblement égale à celle relative aux erreurs expérimentales ($F_{calc} = 1,30$; $F_{table} = 4,94$). Par contre la variance expliquée par la linéarité est différente de la variance due à l'erreur expérimentale ($F_{calc}=11533,59$ et $F_{table} = 8,10$). En conséquence, le modèle linéaire liant concentration en nicotine mesuré et concentration réelle de l'étalon est validé. Notre méthode de quantification de la nicotine est donc applicable à l'analyse de mélanges inconnus. Il en est de même pour la quantification des HAPs et des BTEX.

II.3.6.B. Détermination des incertitudes sur la mesure

La détermination des incertitudes de la mesure porte sur l'ensemble du protocole utilisé pour quantifier la nicotine. Elle associe donc l'erreur instrumentale, l'erreur relative à l'expérimentateur et celle introduite au niveau des différentes étapes de préparation de la méthodologie mise en place. Pour la déterminer, 10 filtres de prélèvement vierges sont dopés en nicotine de manière à obtenir une concentration après les étapes d'extraction et de concentration de 0,32 $\mu\text{g/mL}$ et 10 autres à 12,90 $\mu\text{g/mL}$, respectivement point bas et point haut de la gamme d'étalonnage. Ces 20 filtres sont soumis aux différentes étapes de

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

préparation définies par le protocole opératoire avant que l'analyse ne soit conduite par GC-MS/MS. L'incertitude est ensuite déterminée en employant la loi de Student pour les niveaux bas et haut de la gamme d'étalonnage à un niveau de confiance de 99 % avant qu'une interpolation ne soit utilisée sur l'ensemble de la gamme. Notons qu'avant de déterminer ces incertitudes, un test de Grubbs est réalisé à un niveau de confiance de 99% de manière à détecter d'éventuelles valeurs aberrantes. Celles-ci seront alors retirées de la population d'où un nombre d'individus pouvant être inférieur à 10. Les résultats sont présentés sur la **Figure II-10**. Grâce aux essais dopés, deux droites sont tracées (pointillés rouge et orange). Elles représentent les incertitudes inférieures et supérieures qui encadrent, comme attendu, la droite de calibration (trait plein noir).

Le rendement de récupération est calculé à l'aide de ces mêmes essais. Des valeurs de 66 et 92 % sont obtenus pour des filtres vierges dopés en nicotine aux niveaux bas et haut de la gamme d'étalonnage. Il est nécessaire que des essais complémentaires soient mis en place.

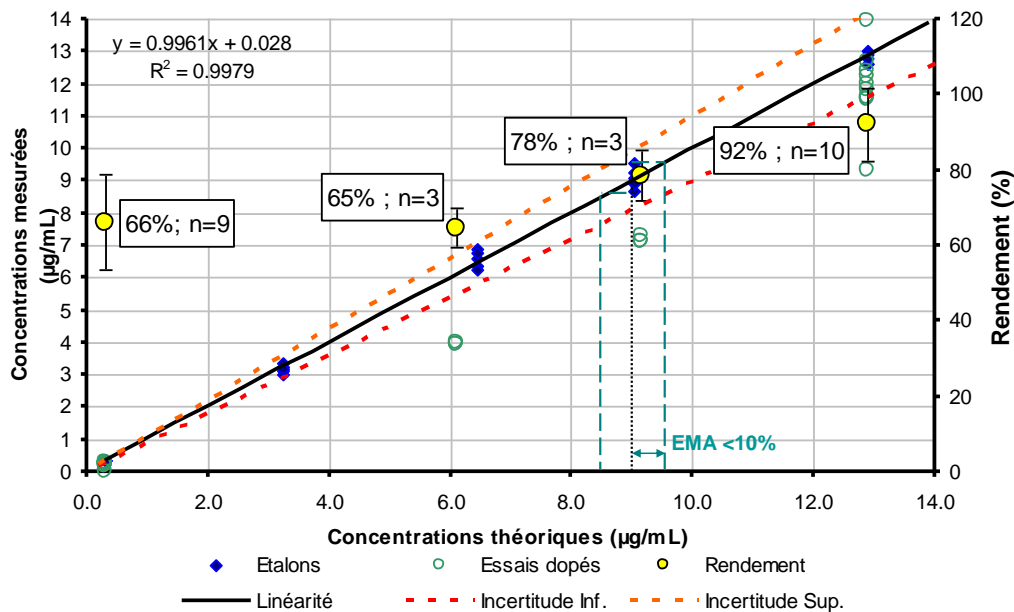


Figure II-10 : Représentation graphique des essais pour la validation de la méthode d'analyse de la nicotine. Les points bleus représentent les essais des étalons, les ronds verts représentent les essais dopés, les points jaunes sont les rendements de récupération de la nicotine. La ligne noire est le modèle linéaire et les lignes pointillées correspondent aux incertitudes de tout le procédé de préparation d'échantillons

II.3.6.C. Détermination des rendements de préparation

Les rendements de récupérations pour des teneurs en nicotine se trouvant aux extrémités de la gamme d'étalonnage sont bien inférieurs à 100 %. Deux nouveaux niveaux de teneurs en nicotine (intermédiaires entre ceux déjà évalués) sont considérés. Le but est de définir un paramètre ou une loi de correction des rendements de récupération. Pour chacun

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

des deux niveaux supplémentaires, trois essais sont réalisés. Les résultats obtenus ainsi que les rendements moyens de récupération sont indiqués sur la **Figure II-10** (rond jaunes). On obtient ainsi pour les 4 niveaux 4 populations différentes pour un nombre total d'essais de 26. Un test de comparaison de variance va être appliqué à l'ensemble de ces données. Le principe de la méthode est donné sur la **Figure II-11**.

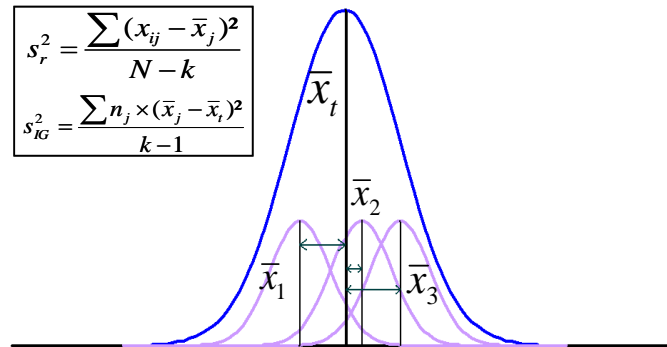


Figure II-11 : Principe du test de comparaison de variable pour évaluer l'homogénéité de plusieurs populations

La démarche consiste à comparer la variance inter-groupe à la variance intra-groupe par un test de Fisher. Si la variance inter-groupe s_{IG}^2 est égale à la variance intra-groupe s_r^2 , les différentes populations peuvent être considérées comme identiques et regroupées en une seule population homogène. Les résultats obtenus dans le cas du calcul des taux de récupération de nicotine sont présentés dans le **Tableau II-7**.

Tableau II-7 : Vérification de l'homogénéité des rendements de récupération de la nicotine

Test d'homogénéité des rendements

Moyenne totale (\bar{x}_t) : 77.8 %		
Variance inter-groupe (s_{IG}^2) : 1259.5	ddl _{IG} = 3	(Nb groupes -1)
Variance résiduelle (s_r^2) : 4725.8	ddl _r = 21	(Nb essais - Nb groupes)
$F_{calc} = 3.8$		
$F_{table 1\%} = 26.7$		

$F_{calc} < F_{table}$; les essais peuvent être considérés comme identiques et regroupés.

Dans le cas de la nicotine, à un niveau de confiance de 99 %, les 4 populations relatives aux 4 teneurs en nicotine testées sont identiques puisque la valeur calculée de F est inférieure à celle reportée dans la table de Student à un niveau de risque de 1 %. Ces quatre populations étant équivalentes, on peut donc, quelle que soit la concentration, utiliser un

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

facteur pour corriger le biais introduit par la préparation. Par conséquent on appliquera systématiquement une correction par division du rendement moyen en nicotine obtenu.

Pour les différents HAPs analysés un facteur correctif a pu être déterminé selon cette même procédure (Annexe VI et V). Cependant, et contrairement à la nicotine, les populations des différents niveaux ne sont pas homogènes dans le cas de l'acénaphthylène. La correction du rendement de récupération varie en effet linéairement par rapport à la teneur de ce HAP (Annexe VI). Dans ce dernier cas, un modèle linéaire de correction du rendement a été mis en place.

II.3.6.D. Mise en place de la carte de contrôle

De façon à vérifier la stabilité des instruments (GC-FID et GC-MS/MS) en cours de mesure, un étalon de contrôle en milieu de gamme d'étalonnage est analysé en début et en fin de série, ainsi que tous les dix échantillons. Les résultats de ces contrôles sont reportés sur une carte dite de contrôle. Sur cette carte sont définies des zones de surveillance et des zones de contrôles. Elles correspondent respectivement à 2 et 3 fois l'écart-type mesuré sur un minimum de 20 essais constituant la période préliminaire. Cette période est représentée sur la **Figure II-12** pour la nicotine. Pour valider une analyse, les mesures relatives aux étalons de contrôles doivent se trouver dans la zone de contrôle, c'est-à-dire entre les traits pointillés rouges.

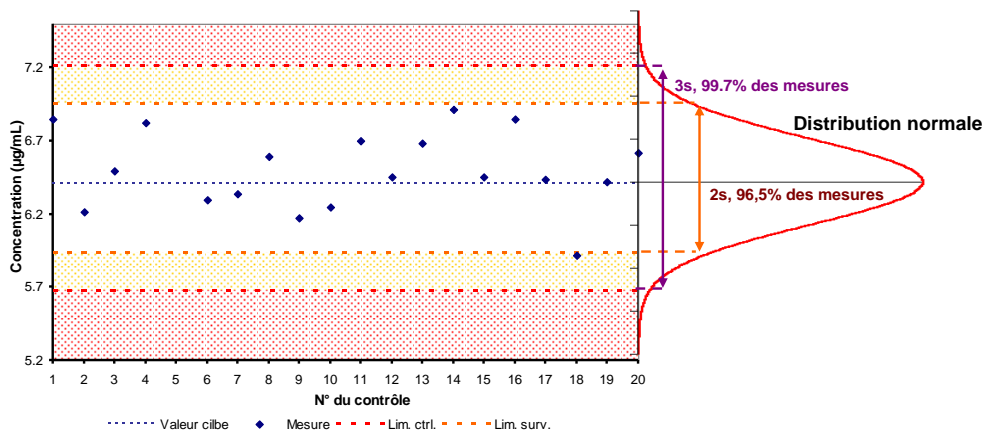


Figure II-12 : Période préliminaire de la carte de contrôle pour la mesure quantitative de la nicotine par GC-MS/MS

II.3.6.E. Conclusion

Les méthodes de quantification de l'acénaphthylène, du fluorène et de la nicotine par GC-MS/MS ont été mises en place et validées dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire Eurofins Hygiènes des Lieux de Travail. Nous rappelons que des données

complémentaires sont disponibles sur les annexes I à VI. Pour l'analyse des BTEX par GC-FID, nous avons employé la méthode déjà mise en place par ce laboratoire et qui est utilisée dans le cadre d'analyse de routine de d'échantillons d'air des lieux de travail sous accréditation (Cofrac). Ces résultats de validation ne sont pas présentés dans ce mémoire.

Cette étape préliminaire de mise en place et de validation des méthodes de quantification des différents traceurs retenus étant achevée, il va maintenant être possible de valider la méthode de prélèvement de la matière particulaire que nous avons mis en place et définir les principaux paramètres qui l'influent.

II.4. Méthode de prélèvement et de fumage validation et paramètres influents

II.4.1. *Introduction*

Afin de comparer les différentes analyses de particules obtenues par LDI-FTICRMS et décrites dans les chapitres suivants, il est important de définir dans quelle mesure la méthode de fumage et de prélèvement est répétable et quels sont les paramètres qui peuvent influencer le prélèvement. Pour cela, nous allons suivre les teneurs en traceurs (nicotine, HAPs et BTEX) des fumées en fonction de différentes variables liées à la cigarette (hygrométrie, perméabilité du filtre) ou aux conditions de prélèvements (débit et durée des bouffées). Dans ce dernier cas, ces variables pourront être prises comme une première approche de la variabilité du comportement d'un fumeur. Dans ce cadre, une analyse multivariée comme la méthodologie des plans d'expériences a été mise en œuvre.

II.4.2. *Formalisme et définitions des plans d'expériences*

L'objectif des plans d'expériences est d'organiser au mieux les essais pour déterminer un lien entre une grandeur mesurée et plusieurs variables. En d'autres termes, ils permettent d'obtenir un maximum d'informations tout en réalisant un minimum d'essais. Des modèles de prédictions ainsi que les interactions entre paramètres peuvent également être déterminés. Dans notre cas, seule l'évaluation des facteurs susceptibles d'influencer les teneurs en nicotine, en certains BTEX et pour certains HAPs a été entreprise.

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

➤ Les facteurs :

Il s'agit des différents paramètres testés. Ils sont associés à un numéro défini de façon arbitraire par l'expérimentateur et peuvent prendre des valeurs qualitatives ou quantitatives. Au cours de la réalisation du plan d'expériences, ces facteurs varient selon deux niveaux.

➤ Les niveaux :

Il s'agit des valeurs (pour les facteurs quantitatifs) ou des états (pour les facteurs qualitatifs) pris par les différents facteurs. Dans le but d'homogénéiser les niveaux des différents facteurs, on utilise des valeurs codées définies par la relation (4)

$$X_{\text{codé}} = \frac{X_{\text{Réel}} - \bar{X}_{\text{niveaux}}}{1/2[X_{\text{Réel}+} - X_{\text{Réel}-}]} \quad (4)$$

$X_{\text{Réel}+}$ et $X_{\text{Réel}-}$ sont les valeurs réelles des niveaux + et - définies par l'expérimentateur.

$$\bar{X}_{\text{niveaux}} = \frac{X_{\text{Réel}+} + X_{\text{Réel}-}}{2} \quad (5)$$

La relation (5) définit la moyenne des niveaux + et -. Elle correspond également à la valeur au centre du domaine d'étude, c'est-à-dire du niveau 0.

$X_{\text{Codé}}$ est la valeur codée de la grandeur quantitative considérée. Pour notre plan d'expérience, il pourra prendre la valeur +1 pour le niveau supérieur, -1 pour le niveau inférieur et 0 pour le centre du domaine d'étude.

Dans le cas de facteurs qualitatifs, les niveaux + et - sont associés à deux états définis arbitrairement. En conséquence, il n'est pas possible de les ajuster pour atteindre rigoureusement le centre du domaine.

➤ La réponse :

Il s'agit de la grandeur mesurée pour chaque expérience.

➤ Effet d'un facteur :

Il s'agit de la demi-différence entre la moyenne des réponses des essais pour lesquels le facteur considéré est à son niveau haut et la moyenne des réponses des essais pour lesquels

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

le facteur est à son niveau bas (équation (6)). Il correspond donc à la variation de la réponse lorsque le facteur passe du niveau – au niveau 0 ou du niveau 0 au niveau +.

$$Effet = \frac{\bar{x}_+ - \bar{x}_-}{2} \quad (6)$$

II.4.3. Application au prélèvement des fumées de cigarette

Les facteurs qui ont été retenus pour être pris en compte sont le débit et la durée des bouffées d'une part, le conditionnement/hygométrie et le taux de ventilation d'une cigarette d'autre part. Bien d'autres facteurs auraient pu être pris en compte comme la nature de la cigarette, le type de tabac, le temps entre deux bouffées. Mais nous avons choisi de nous limiter aux quatre paramètres retenus pour tenter de comprendre comment la variation du débit et de la durée de bouffée, ainsi qu'une modification des conditions de fumage et de stockage des cigarettes pouvaient être en mesure d'introduire un certain nombre d'incertitudes sur la quantification des différents traceurs retenus durant un prélèvement selon la procédure normalisée.

II.4.3.A.a. Débit et durée des bouffées

Le débit d'une bouffée fait partie des sources de variation possible. L'ajustement est en effet manuel et peut conduire à certaines incertitudes entre les prélèvements. Il en est de même pour la durée des bouffées. Non automatiques, elles sont déclenchées manuellement et le temps des bouffées et celui entre les bouffées est mesuré l'aide d'un chronomètre. Pour l'un ou l'autre de ces facteurs, les niveaux sont choisis de manière à surestimer largement les fluctuations au cours d'un prélèvement « normal ». Ainsi, on fait varier le débit d'aspiration de 800 à 1200 mL/min et la durée des bouffées de 2 à 4 s.

Outre l'intérêt que ces facteurs présentent vis-à-vis du dispositif de prélèvement, ils permettent dans une certaine mesure, de simuler la différence de comportement de deux individus lorsqu'ils fument une cigarette. En effet, même si les conditions de prélèvement à l'aide de notre machine à fumée sont loin de représenter la réalité (il s'agit, rappelons le, de conditions normalisées de fumage), les variations imposées dans le cadre de ce plan d'expériences peuvent être prises comme représentatives de celles de deux fumeurs consommant le même type de cigarette. Cet aspect sera développé dans le cadre de la comparaison des fumées exhalées (EXS) entre deux fumeurs dans un des chapitres suivants.

II.4.3.A.b. Conditionnement et ventilation

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

Les paramètres de conditionnement et de ventilation sont, à la différence des deux précédents, d'avantage associés aux caractéristiques de la cigarette qu'au comportement du fumeur.

Le niveau + du conditionnement correspond au stockage de la cigarette dans un dessiccateur, ce qui assèche le tabac avant la procédure de fumage. Ce paramètre peut être étendu à l'influence de la période pendant laquelle un paquet de cigarettes est ouvert sur la composition des fumées lors du fumage. Ce facteur peut être associé à un taux d'hygrométrie plus ou moins prononcé de la cigarette.

Pour la ventilation par le filtre (effet de dilution : paragraphe II.2.3 page II-57), le niveau + est défini lorsque la dilution est maximale (filtre de cigarette non étanchéifié).

II.4.3.A.c. Les points centraux

La dénomination « points centraux » est associée au fait que les niveaux de ces essais doivent correspondre au centre du domaine d'étude. Il s'agit de la moyenne des niveaux haut et bas pour les facteurs quantitatifs. Habituellement dénommé niveau 0, ils doivent être répartis régulièrement au sein des différents essais d'un plan d'expériences. Ils sont nécessaires pour valider un certain nombre d'aspects tels que l'absence de dérive au cours de l'exécution du plan, notamment lorsque les essais sont nombreux et que la durée de réalisation du plan est conséquente, mais également pour vérifier la validité du modèle de régression par la comparaison de l'ordonnée à l'origine du modèle à la valeur du point central. Etant donné que le modèle n'a pas ici été déterminé et que le point central n'est pas rigoureusement défini du fait de facteurs qualitatifs, ce dernier aspect n'a pas été réalisé. En revanche, les points centraux sont utilisés pour la détermination d'un coefficient de variation de la méthode ainsi que de l'incertitude sur la réponse mesurée. Cette dernière permet de définir le seuil à partir duquel une variation pour être considérée comme significative. On suppose ici que l'incertitude mesurée pour notre point central est égale ou supérieure à celle des différents essais du plan d'expérience. Ceci semble acceptable du fait que le paramètre posant le plus de problème de ce point de vue est la durée de la bouffée (2 s) mesurée au chronomètre digital et réalisée manuellement. Le choix de placer ce niveau à 2 s permet d'avoir une incertitude relative plus élevée qu'à 4s et donc d'être plus fiable du point de vue de la significativité des effets. De plus, une durée de 2 s permet de se placer dans les conditions normalisées et ainsi de comparer les résultats obtenus pour la nicotine à la valeur fournie par le fabricant (pour mémoire 600 µg/cigarette). Les points centraux sont donc

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

associés aux conditions normalisées de prélèvement. Cette dernière permet de définir le seuil à partir duquel une variation pour être considérée comme significative. L'ensemble des facteurs et de leurs niveaux sont résumés dans le **Tableau II-8**.

Tableau II-8 : Dénomination des facteurs et des niveaux du plan d'expériences

Facteur	N°	Niveau -	Niveau « 0 »	Niveau +
Débit (mL/min)	1	800	1050	1200
Durée (s)	2	2	2	4
Ventilation	3	NON	OUI	OUI
Conditionnement/hygro-métrie	4	NON	OUI	OUI

II.4.4. Interprétation des résultats

II.4.4.A. Etude des points centraux

La caractérisation statistique du dispositif de prélèvement a été réalisée sur les points centraux du plan d'expériences. Huit essais ont été réalisés sur une période de trois jours. Les résultats sont présentés sur la **Figure II-13**.

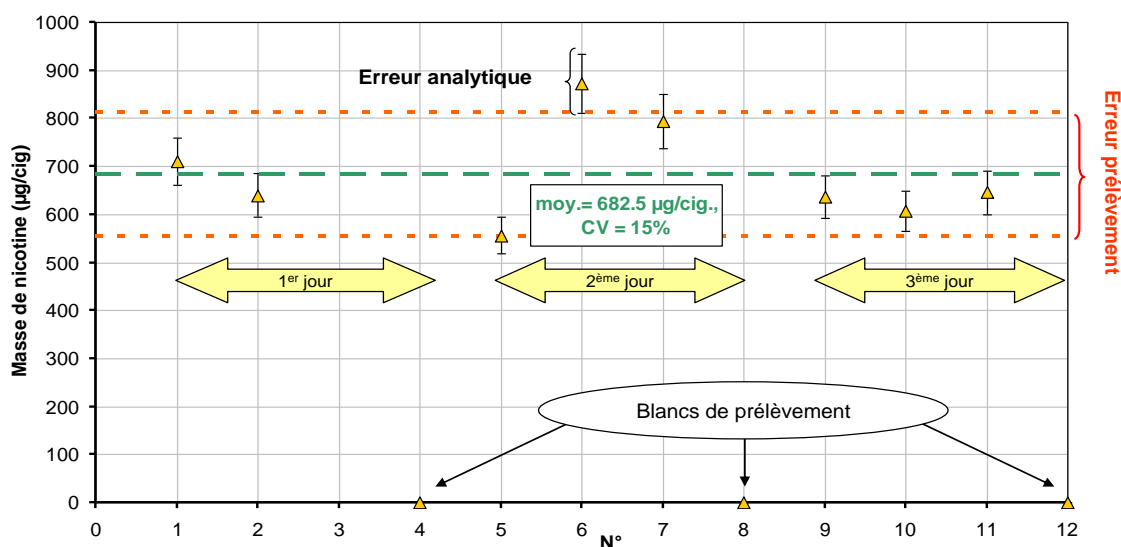


Figure II-13 : Etude des points centraux de la nicotine

Pour valider la répétabilité de la procédure de fumage et de prélèvement, on vérifie par un test de Fisher que la variance inter-journalière est égale à la variance expérimentale. Le principe de la méthode est identique à celui qui a déjà été employé pour le test d'homogénéité des rendements de récupération (paragraphe II.3.6.C page II-76). Le détail des calculs effectués est donné dans le **Tableau II-9**.

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

La valeur de F calculée étant inférieure à celle tabulée pour un niveau de confiance de 99 %, les résultats obtenus pour les différents jours peuvent être considérés comme identiques. Les essais peuvent donc être rassemblés en une seule population pour laquelle il est possible de calculer le coefficient de variations (CV) et les incertitudes associées à la détermination quantitative de la nicotine. Le CV de la nicotine s'élève à 15,2% sur les 8 essais, ce qui est acceptable au regard du mode opératoire utilisé. La concentration moyenne de nicotine mesurée à l'aide de la méthodologie développée est de $682,5 \pm 128 \mu\text{g}/\text{cig}$. Cette valeur est en accord avec la valeur indiquée par le fabricant qui est de $600 \mu\text{g}/\text{cig}$. Ceci permet de valider la méthode de fumage et de prélèvement.

Tableau II-9 : Test de reproductibilité des essais réalisés sur plusieurs jours

Test d'homogénéité des points centraux dans le cas de la nicotine			
Moyenne totale (\bar{x}_i) :	682,471		
Variance inter-groupe (s^2_{IG}) :	17113,910	ddl _{IG} =	2
Variance résiduelle (s^2_r) :	8301,414	ddl _r =	5
Test du F :	$F_{\text{calculé}}$:	2,062	
	$F_{0,01,2,1}$:	13,274	unilatéral 1%
<hr/>			
Ecart-type total (s_{tot}) :	104,016		
Coefficient de variation (CV) :	15,2%		

La même étude a été réalisée sur les autres traceurs. Les coefficients de variation s'élèvent à 15%, 14% 12% et 9% pour le benzène, le toluène, l'acénaphthylène et le fluorène respectivement.

II.4.4.B. Détermination des effets de facteurs

Après exécution du plan complet, les effets des différents facteurs sont calculés par la méthode de Yates. Les résultats sont présentés sur la **Figure II-14**. Les unités des effets sont données en masse/mL de fumée.

II.4.4.B.a. Effet de la dilution

Les radars en haut de la **Figure II-14** montrent clairement que l'effet de dilution est très important pour l'ensemble des traceurs considérés, qu'il s'agisse des BTEX pour la phase gazeuse des MSS ou de la nicotine et des HAPs pour la fraction particulaire. Sachant que l'effet d'un facteur correspond au passage du niveau 0 de ce facteur au niveau +, il est possible de calculer la proportion de perte de concentration due à l'effet de dilution par

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

rapport au niveau central (rapport effet/réponse au niveau 0). Les résultats sont regroupés dans le **Tableau II-10**.

Tableau II-10 : Estimation de la perte de quantité traceur liée à la ventilation/dilution calculée par le plan d'expérience

	C_{moy} (niv. 0)	Effet de la dilution/ventilation	Pourcentage de perte
Nicotine ($\mu\text{g/mL}$ de fumée)	3,66	- 0,85	- 23%
Benzène ($\mu\text{g/mL}$ de fumée)	0,20	- 0,06	- 30%
Toluène ($\mu\text{g/mL}$ de fumée)	0,28	- 0,09	- 30%
Acenaphtylène (ng/mL de fumée)	2,90	- 0,88	- 31%
Fluorène (ng/mL de fumée)	1,04	- 0,38	- 37%

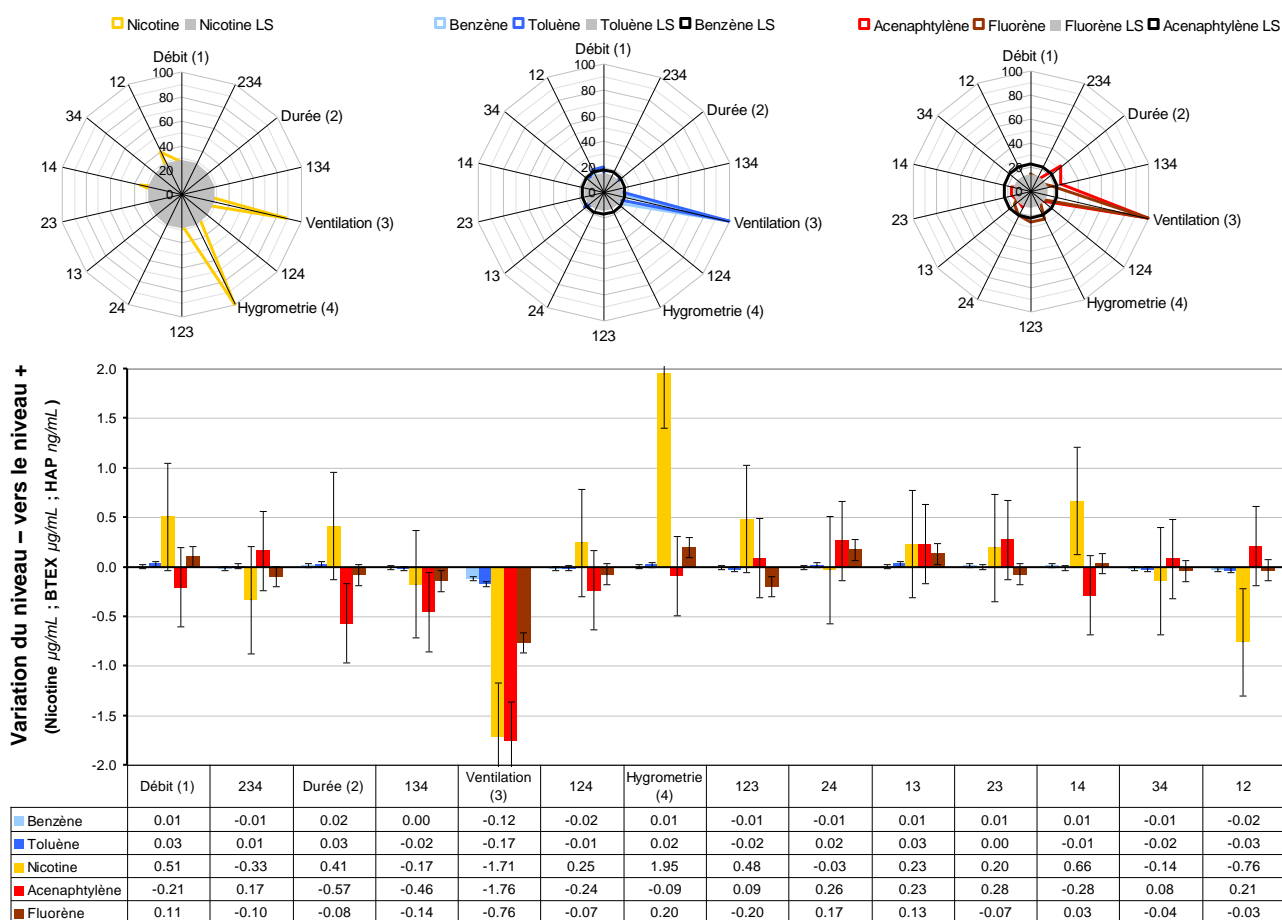


Figure II-14 : Résultats du plan d'expériences, les facteurs évalués sont l'effet du débit (1) et de la durée (2) de la bouffée ainsi que la ventilation (3) et le conditionnement/hygrométrie (4) de la cigarette. Les radars (en haut de la figure) représentent les effets relatifs des différents facteurs en %. Les rond gris et cercles noirs représentent les limites de significativité (LS) des effets pour les différentes molécules. L'effet de l'interaction 1234 est toujours non-significatif

Le pourcentage de perte des traceurs en fonction de l'effet de ventilation/dilution est compris entre 23 et 37 %. La perte de débit due au seul effet de dilution (passage du niveau bas au niveau haut) à quant à elle, pu être évaluée pour la gamme de débit considéré à environ

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

45 % (**Figure I-3** page II-55) soit un effet de 22,5% (passage du niveau central au niveau haut). On observe alors une assez bonne corrélation avec la nicotine. Au contraire, un écart allant de 8 à 15% de perte supplémentaire peut être observé pour les BTEX et les HAPs. Par conséquent, le fait d'étanchéifier le filtre induit un effet autre que le simple effet de dilution avec de l'air. Un effet de vaporisation des molécules retenues sur le filtre de la cigarette lors du passage de la fumée peut être une explication. En effet, lors d'une bouffée sans dilution, l'essentiel du flux au travers du filtre de la cigarette provient de la fumée, induisant donc une rétention des composés sur la matière particulaire plus marquée. Lors des bouffées suivantes, il peut être envisageable qu'une partie de ces molécules puissent enrichir la fumée issue du foyer de combustion et ainsi être collectées sur le filtre de prélèvement. Lorsque l'on augmente la perméabilité du filtre de la cigarette (niveau +) ce phénomène serait beaucoup moins marqué pour plusieurs raisons :

- la température des fumées est abaissée sous l'effet de l'air de dilution rendant ainsi le transfert des composés piégés vers la fumée plus difficile.
- le débit d'air dans le tube de tabac ainsi qu'à l'entrée du filtre de la cigarette est plus faible, la volatilisation des molécules qui sont adsorbées sur les particules piégées par le filtre ou le tabac est donc moins important. L'effet d'entraînement s'en trouve réduit.

II.4.4.B.b. Effet du conditionnement/hygro-métrie de la cigarette

De manière générale, le conditionnement (niveau d'hygro-métrie) de la cigarette n'est que peu influent sur les quantités de molécules traceurs obtenues, à l'exception de ce qui est observé pour la nicotine. En effet, la dessiccation de la cigarette semble augmenter considérablement la concentration de nicotine dans la matière particulaire (effet de +1.95µg/mL). On peut supposer que la faible présence d'eau dans la cigarette rend le transfert de la nicotine vers la fumée beaucoup plus aisé. En effet, la température des fumées peut être affectée de manière significative par la présence d'eau dans la cigarette. Le courant de gaz ayant une température plus basse (l'eau absorbe une partie de la chaleur), le transfert de la nicotine du tabac vers les MSS est moins efficace. Il faut également avoir à l'esprit que la modification de la teneur en eau peut modifier les propriétés acido-basique du milieu. Dans la mesure où une diminution de l'hygro-métrie rend plus acide les fumées, la nicotine pourrait plus facilement être transformée en amine quaternaire, limitant la possibilité de son transfert vers la phase gazeuse.

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

II.4.4.B.c. Effet du débit et de la durée des bouffées

La modification de ces paramètres n'entraîne pas d'effet significatif sur la concentration des traceurs étudiés. Cela permet de préciser un certain nombre d'éléments :

- Les écart-types observés dans le cadre de l'examen des points centraux du plan d'expériences ne sont que peu liés aux imprécisions concernant l'ajustement du débit et la mesure de la durée des bouffées ;
- les variations de débit d'aspiration et de durée d'une bouffée dans la gamme des valeurs évaluées ici n'entraînent pas de modifications détectables sur la concentration des HAPs. Ces espèces sont principalement formées par les processus de pyrolyse qui prennent place entre deux bouffées (sans action de la part du fumeur). Par conséquent, ces résultats semblent indiquer qu'une partie au moins des produits de pyrolyse du tabac, et notamment les HAPs, ne sont que faiblement affectés par les processus de combustion au cours d'une bouffée.

Au-delà des résultats et des conclusions établis rappelons-le dans le cadre de conditions expérimentales définies dans le plan d'expérience, certaines extrapolations au monde des fumeurs peuvent être tentées. Dans le cadre de l'étude d'EXS issues de deux fumeurs différents, leurs habitudes de fumage (débit d'aspiration et durée de bouffée) pourront être considérées comme n'ayant que peu ou pas d'impact sur la concentration de la phase particulaire en nicotine et HAP de faible taille. Une extrapolation de ces résultats pourrait être de considérer que l'influence du fumeur sur la fraction particulaire est faible.

II.4.4.C. Conclusions

Au terme de cette partie, différents facteurs de prélèvement (débit, durée, hygrométrie de la cigarette, ventilation de la cigarette) suspectés influents ont été testés à l'aide d'un plan d'expériences. Les marqueurs choisis sont le benzène et le toluène (essentiellement présents dans la phase gazeuse), l'acénaphthylène et le fluorène (représentatifs des processus de pyrolyse) et la nicotine qui, elle, fait partie des molécules transférées intactes vers la fumée. Il a ainsi pu être établi que l'assèchement de la cigarette par un conditionnement préalable influence fortement la concentration en nicotine dans les fumées. Cette observation peut être reliée à un abaissement de la température des fumées dû à la présence d'eau. En conséquence la volatilisation de la nicotine s'en trouve plus difficile. Dans un second temps, l'analyse de

Mise en place et validation de la méthode de prélèvement

l'effet de la ventilation par le filtre de la cigarette a révélé que d'autres phénomènes ont lieu, probablement une volatilisation de composés déposés par les fumées sur le cône de tabac ou le filtre de la cigarette. Enfin, les variations des facteurs sous l'action du débit et la durée des bouffées ne se sont pas révélées significatives. Par conséquent, l'incertitude associée à l'ajustement manuel du débit et de la durée des bouffées ne peut qu'un impact mineur dans le coefficient de variation global du prélèvement. Ce résultat peut également être extrapolé aux variations de débit et de durée de bouffée qui ont lieu lors du fumage d'une cigarette par deux fumeurs. Celles-ci sont probablement peu influentes sur la composition des fumées. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que les résultats du plan d'expériences ne sont valables que dans le domaine d'étude considéré (200 mL/min de variation de débit, et 1 s de variation de bouffée).

II.5. Conclusion

Au cours de ce chapitre, des méthodes d'analyse visant à quantifier certains traceurs (nicotine, HAPs et BTEX) des fumées de cigarette ont été développées. Celles-ci mettent en jeu la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur par ionisation de flamme ou par spectrométrie de masse. Ces méthodes permettent en effet à la fois l'analyse de composés volatils piégés sur charbon actif et semi-volatils présents quant à eux sur le filtre de quartz. Avant d'être appliquées, la linéarité des méthodes, ainsi que leurs incertitudes et les rendements de récupération des analytes ont été déterminés statistiquement. Elles ont ensuite été utilisées de façon à caractériser la machine à fumer développée pour la collecte des MSS. Celle-ci permet la collecte de la phase particulaire via un filtre de quartz et de la phase gazeuse par un tube de charbon actif. Ainsi, des variations potentielles ont été recréées artificiellement par un plan d'expériences pour en déterminer les influences sur la quantité de certaines molécules présentes dans les MSS. Les points centraux ont permis de déterminer un coefficient de variation du prélèvement de l'ordre de 15%. Le degré de fiabilité de la méthode d'échantillonnage des MSS étant connu, une analyse plus détaillée de la fraction particulaire par spectrométrie de masse à haute résolution va être réalisée.

Chapitre III.

**La LDI-FTICRMS –
Principes et applications à
l'analyse de fumées de
cigarette**

III.1. Introduction	III-89
III.2. La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions couplée à la désorption/ionisation laser (LDI-FTICRMS)	III-90
III.2.1. Introduction	III-90
III.2.2. Désorption/Ionisation laser (LDI).....	III-90
III.2.3. La spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier.....	III-92
III.2.4. Déroulement d'une analyse LDI-FTICR-MS	III-94
III.3. Exploitation et traitement des spectres de masse	III-100
III.3.1. Attribution des compositions élémentaires.	III-100
III.3.2. Outils d'interprétation des spectres de masse	III-103
III.3.2.A. Equivalent double liaison et indice d'aromaticité.....	III-103
III.3.2.B. Représentation par famille chimique	III-105
III.3.2.C. Diagramme de van Krevelen	III-106
III.3.2.D. Cartes de Kendrick	III-107
III.3.3. Choix de la gamme de masse étudiée.	III-108
III.3.4. Influence de l'énergie du faisceau laser.	III-111
III.4. Conclusion	III-115

III.1. Introduction

Après avoir traité dans le chapitre précédent des moyens mis en œuvre pour collecter de manière efficace et reproductible la matière particulaire des différents types de fumée de cigarette, nous allons détailler à présent les moyens analytiques employés pour leurs analyses. La complexité de la fraction particulaire mise en évidence dans le premier chapitre, conduit à considérer que, pour une analyse non-ciblée, seule une méthodologie telle que la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions par transformée de Fourier (FTICRMS) est en mesure de permettre une identification efficace et pertinente des différentes espèces présentes. Le choix de réaliser une analyse *in situ*, outre le gain appréciable de temps et l'absence de biais liés à de possibles contaminations ou pertes de composés assure l'obtention d'informations globales en un temps réduit. Le couplage désorption/ionisation laser FTICRMS est particulièrement bien adapté dans le cadre de la démarche analytique entreprise.

En conséquence, la première partie de ce chapitre sera dédiée à la présentation des concepts généraux relatifs d'une part à la désorption/ionisation laser et d'autre part à la spectrométrie de masse FTICR.

La richesse des données spectrales obtenues dans ces conditions d'analyse non ciblée requiert l'application d'outils de traitement des données pour caractériser les différents types de particules issues des fumées de cigarette et permettre leur comparaison. Un certain nombre de critères ou de moyens graphiques comme le calcul du nombre d'insaturations (DBE) ou de l'indice d'aromaticité (AI) ou encore la constitution de carte de Kendrick ou de van Krevelen seront déterminés et employés. Sur la base d'un exemple, nous démontrerons l'utilité et le principe associés à ces traitements post acquisition.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre sera consacrée à la détermination des conditions expérimentales les mieux adaptées en termes notamment d'énergie laser pour obtenir des empreintes spectrales les plus représentatives possibles des composés présents au sein et à la surface de la matière particulaire des différentes fumées de cigarette.

III.2. La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions couplée à la désorption/ionisation laser (LDI-FTICRMS)

III.2.1. Introduction

De manière simple, la spectrométrie de masse par résonance cyclotronique à transformée de Fourier (FTICRMS) assure la détermination du rapport m/z des ions analysés par la mesure précise de leur fréquence de giration dans un champ magnétique intense produit typiquement par un aimant solénoïde supraconducteur. Elle combine l'analyse simultanée en mode haute résolution FWHM (Full Width at Half Maximum) de 100 000 à plus d'un million et la haute précision sur la mesure du rapport m/z . La différence entre les valeurs mesurées et les valeurs théoriques, exprimée en partie par million (ou ppm), est typiquement inférieure à 1 ppm. L'association de cette technique à une grande variété de sources d'ionisation en fait un outil puissant et sans égal dans le domaine de la spectrométrie de masse. Après avoir décrit de manière précise les principes de la désorption/ionisation laser, nous présenterons les différentes étapes qui conduisent en FTICR à l'obtention d'un spectre de masse.

III.2.2. Désorption/Ionisation laser (LDI)

L'interaction d'un faisceau laser avec une cible initie une suite de processus complexes donnant lieu, au travers de phénomènes appelés ablation ou désorption, à la formation d'un nuage gazeux plus ou moins ionisé.

La répartition des espèces au sein de ce dernier dépend étroitement des caractéristiques optiques (coefficient de réflexion R , coefficient d'absorption α , ...) et thermiques (diffusivité thermique K , ...) de l'échantillon irradié et des caractéristiques du faisceau laser (longueur d'onde λ , durée d'impulsion τ et densité d'énergie également appelée fluence F).

Afin de définir l'énergie laser E déposée à la surface S de l'échantillon, on utilise fréquemment l'irradiance I qui est la puissance (rapport de l'énergie laser E en joules sur le temps de l'impulsion laser τ en seconde) déposée par unité de surface en cm^2 . Elle s'exprime en $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ selon l'équation (7)

$$I = \frac{E}{\tau \times S} = \frac{F}{\tau} \quad (7)$$

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

L'interaction d'un faisceau laser avec un solide non métallique induit différents processus, qui conduisent à l'expulsion d'espèces neutres et ionisées dans la phase gazeuse. Haglund a proposé une description qualitative de ces processus. Cet auteur postule tout d'abord¹¹⁶ que la pulvérisation par le laser peut être décomposée en quatre phases : (i) l'absorption de l'énergie laser par un processus simple ou multi photonique (les propriétés d'absorption de l'échantillon étudié en phase solide sont par conséquent d'importance majeure) ; (ii) la conversion de l'énergie incidente par des processus radiatifs et non-radiatifs de relaxation ; (iii) l'éjection d'espèces (atomes, molécules, neutres, ions, électrons, espèces excitées) de la surface irradiée et (iv) la formation et l'expansion d'une plume plus ou moins dense de neutres et d'ions dont les mécanismes de formation peuvent être variés.

Ainsi les molécules organiques amenées en phase gazeuse sont susceptibles de perdre un électron via des processus de photo-ionisation ou au contraire d'en capter, générant ainsi respectivement des espèces radicalaires positives ou négatives. De plus, si l'énergie absorbée est suffisante, la rupture d'une liaison dans le cas d'un proton labile peut être envisagée permettant ainsi à une espèce ayant un caractère basique de capter un proton et d'observer des ions $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$. Dans la mesure où l'énergie fournie par les photons du faisceau laser est suffisante, il est possible qu'un excès d'énergie interne au sein des ions moléculaires radicalaires ou protonés conduise à la fragmentation. On parle alors de photo-fragments. Ces mêmes espèces peuvent également résulter de processus d'ionisation dissociative dans la mesure où des espèces neutres excitées sont susceptibles de conduire à des processus de dissociation hétérolytique de liaison.

Deux régimes d'interaction laser-matière doivent être considérés: la désorption (LD) et l'ablation laser (LA). On constate généralement que la LD conduit à l'émission d'ions, d'atomes et de molécules sans perturbation substantielle de la surface autour du point d'impact (sans dommages visibles). Contrairement à la LD, la LA implique une perturbation à grande échelle de la topologie de la surface permettant à Haglung¹¹⁶ de considérer la désorption laser comme un processus à l'échelle microscopique, et l'ablation comme un phénomène mésoscopique. Les autres différences importantes entre désorption et ablation laser sont la nature et les quantités d'espèces expulsées. Pour la désorption, la densité des espèces éjectées au-dessus de la surface est négligeable, en accord avec les infimes changements induits dans la structure et la composition de l'échantillon, qui sont

116 Haglund Jr., R. F. In *Laser Ablation and Desorption*, Volume 30 ed.; Haglund, J. C. M. a. R. F., Ed.; Academic Press, 1997, pp 15-138.

La LDI–FTICRMS – Principes et applications à l’analyse de fumée de cigarette

généralement trop faibles pour être observées. La majorité des espèces expulsées est associée à des neutres. La quantité d'ions est limitée et les énergies interne et cinétique des espèces «éjectées» sont basses. La LA est associée à la formation d'une plume, qui peut être fortement ionisée et qui suit les lois de la dynamique des gaz. Les ions et les neutres possédant une quantité d'énergie importante, le taux des collisions se produisant dans la phase gazeuse après irradiation laser est important et, par conséquent, des recombinaisons ou des fragmentations peuvent avoir lieu.

La LD et la LA ne doivent pas être considérées comme deux phénomènes distincts, mais comme les extrémités d'un continuum, qui s'étend de l'émission des neutres ou d'ions isolés à l'émission massive d'espèces ionisées en phase gazeuse.

Le laser utilisé dans cette étude est un laser solide de type Nd-YAG (Orion, New wave research) triplé en fréquence délivrant une longueur d'onde 355 nm sur une durée d'impulsion de 5 ns. L'énergie laser maximale est de 4 mJ. La surface d'interaction laser-matière s'élève à environ 0,05 mm². Il est possible que la zone du filtre analysé ne soit pas totalement représentative de l'ensemble de l'échantillon pour des raisons notamment de non homogénéité du dépôt à la surface du filtre. Pour pallier à cette difficulté, les spectres de masse obtenus dans le cadre de l'ensemble de cette étude correspondent à l'addition de 35 à 45 spectres réalisés à des endroits différents du filtre. Chaque spectre est constitué des ions produits au cours de 8 interactions laser– échantillon. Cette procédure, au-delà de limiter les artefacts liés à une certaine hétérogénéité de la surface de l'échantillon permet d'augmenter le rapport S/N proportionnellement à la racine carrée du nombre de spectres.

III.2.3. La spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier.

En 1929, aux Etats-Unis, Lawrence (prix Nobel en 1939) découvre le principe du cyclotron¹¹⁷. En 1949, l'équipe de Hipple détermine la fréquence de résonance cyclotronique du proton à l'aide d'un instrument appelé Omégatron¹¹⁸. Ces deux travaux sont à la base de la technique de spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions (ICRMS). C'est en 1974 que Comisarow et Marshall¹¹⁹ associent le traitement par transformée de Fourier rapide (FFT) à l'analyse des ions par ICRMS. Le premier instrument doté d'un aimant

117 Lawrence, E.O., *The evolution of cyclotron*. Nobel lecture, 1951

118 Thomas, H.A., R.L. Driscoll, and J.A. Hipple, *Measurement of the Proton Moment in Absolute Units*. Physical Review, 1949. **75**(5): p. 902

119 Comisarow, M.B. and A.G. Marshall, *Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy*. Chemical Physics Letters, 1974. **25**(2): p. 282-283

La LDI–FTICRMS – Principes et applications à l’analyse de fumée de cigarette

supraconducteur est commercialisé en 1983. Jusqu’alors, des électroaimants de 1 à 1,6 T étaient employés. Actuellement, la force du champ magnétique des appareils commerciaux est comprise entre 7 et 18 T. Un instrument doté d’un aimant de 21 T est actuellement en cours de développement au laboratoire des hauts champs magnétiques à Tallahassee en Floride sous la direction d’Alan Marshall.

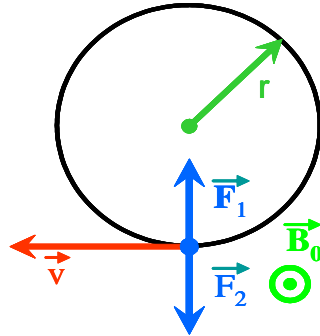


Figure III-1 : Principe du mouvement cyclotronique.

L’étude du mouvement cyclotronique (**Figure III-1**) est à l’origine de la mesure du rapport m/z d’un ion par la technique FTICRMS. Un ion de masse m et de charge q possédant une vitesse v , adopte lorsqu’il est plongé dans un champ magnétique B_0 une trajectoire circulaire uniforme de rayon r , résultant de l’action de la force de Lorentz \vec{F}_1 et de la force centrifuge \vec{F}_2 . Ces deux forces agissent simultanément et en sens opposé. Elles conduisent à l’établissement d’un mouvement stable si leur module est égal.

Expression de la force de Lorentz :

$$\vec{F}_1 = q \times \vec{v} \wedge \vec{B}_0 = qvB_0\vec{k} \quad (8)$$

Expression de la force centrifuge :

$$\vec{F}_2 = -\frac{mv^2}{r}\vec{k} \quad (9)$$

$$|\vec{F}_1| = |\vec{F}_2| \quad (10)$$

$$qvB_0 = \frac{mv^2}{r} \quad (11)$$

$$\frac{qB_0}{m} = \frac{v}{r} = \omega_c \quad (12)$$

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

Avec $q = ze$

$$\omega_c = \frac{eB_0}{m/z} \quad (13)$$

$$v_c = \frac{\omega_c}{2\pi} = \frac{1}{2\pi} \times \frac{eB_0}{m/z} \quad (14)$$

v_c est appelée fréquence cyclotronique, elle est exprimée en Hertz et dépend du champ magnétique B_0 appliqué. Elle est inversement proportionnelle au rapport m/z et indépendante de la vitesse initiale des ions présents dans la cellule d'analyse. La précision de la mesure du rapport m/z va dépendre de la qualité de la mesure de la fréquence cyclotronique. Il est nécessaire que le champ magnétique soit intense ($> 4,7$ T) et très homogène, principales raisons de l'utilisation d'aimants solénoïdes supraconducteurs (**Figure III-2**).



Figure III-2 : Spectromètre de masse FTICR Explorer QFT-9 (Varian).

III.2.4. Déroulement d'une analyse LDI-FTICR-MS

Une description de l'instrument utilisé avec sa source d'ionisation externe ProMALDI est présentée sur la **Figure III-3**. L'obtention d'un spectre de masse requiert la succession de trois étapes distinctes : 1) la production des ions par interaction laser-matière en mode ablation ou désorption/ionisation laser suivie de leur stockage dans un hexapôle ; 2) le transfert des ions de la source vers la cellule FTICR ; 3) leur détection et analyse.

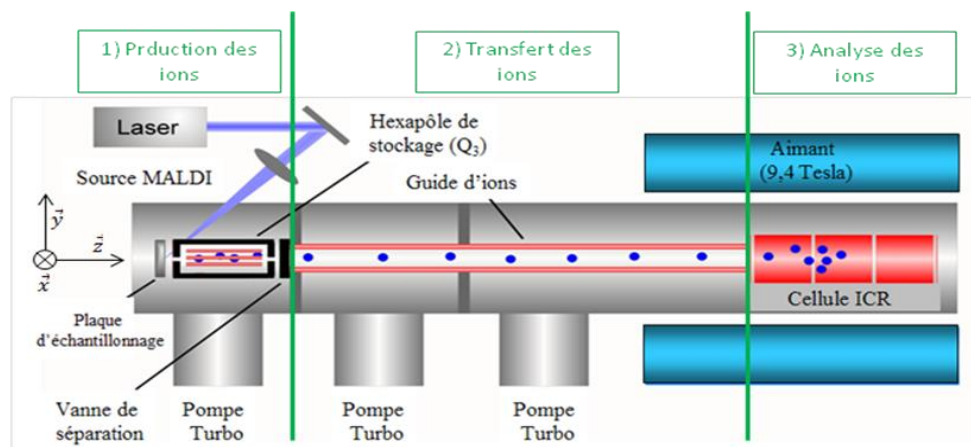


Figure III-3 : Schéma du spectromètre ProMALDI-FTICR-MS.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

L'enchaînement de ces différents événements est piloté par le logiciel Oméga. Une interface graphique permet de suivre et de modifier les paramètres instrumentaux de façon chronologique comme le montre la **Figure III-4**. Les trois étapes précédemment citées peuvent être observées sur ce schéma synoptique (événement **B**, **C** et **E**).

Au début de toute séquence d'analyse **A**, les potentiels des différentes plaques de piégeage de la cellule d'analyse sont portés à une tension de signe opposé à celui de la charge des ions à analyser. Ceci a pour effet d'éliminer tous les ions résiduels associés à l'expérience précédente.

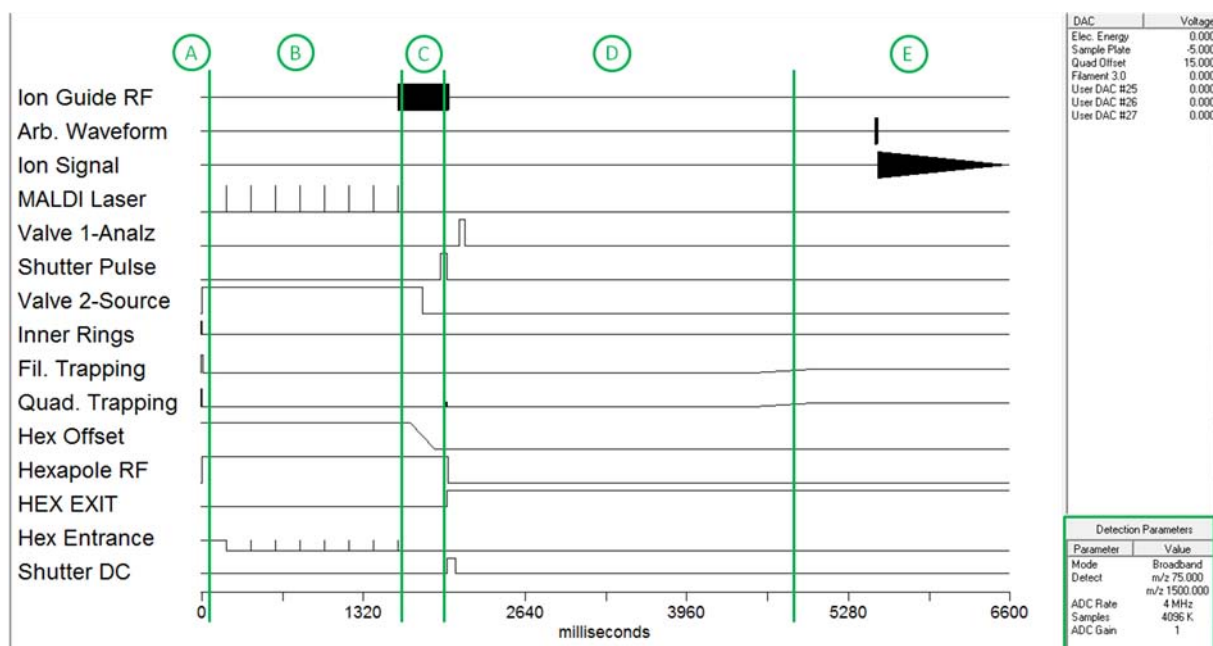


Figure III-4 : Schéma synoptique d'une séquence d'analyse FTICR-MS en utilisant le module ProMALDI.

Les paragraphes suivants vont permettre de décrire de façon détaillée les différentes séquences associées à l'obtention d'un spectre de masse.

➤ La source ProMALDI

L'échantillon à analyser est fixé sur un porte échantillon en acier inoxydable à l'aide d'un adhésif en aluminium. Celui-ci est introduit dans la source d'ionisation par un sas permettant de préserver le vide (pression de 10^{-4} Torr) de l'ensemble de la partie source du module. Le porte-échantillon est placé sur une table de déplacement équipée de deux moteurs pas-à-pas selon les axes x et y .

Au cours d'une analyse, le laser Nd:YAG délivre 8 tirs et produit des ions qui sont collectés dans un hexapole de stockage dont le potentiel sur la plaque d'entrée est mis à la

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

terre au moment de l'impulsion laser (section **B**). L'hexapole fonctionne en mode RF only. Tous les ions possédant un domaine de stabilité compatible avec les paramètres instrumentaux appliqués ou associés à cet hexapole (amplitude et fréquence de la RF, distance entre les barreaux) adoptent une trajectoire stable. Ils sont maintenus à l'intérieur de l'hexapole par l'application de potentiels continus identiques et adéquats (fonction de la polarité des ions piégés) sur les plaques d'entrée et de sortie. Afin de diminuer l'énergie cinétique et l'énergie interne des ions produits au cours de l'interaction laser-matière, ils sont thermalisés par l'injection d'azote.

➤ Le transfert des ions

Les ions piégés dans l'hexapole de stockage sont acheminés vers la cellule d'analyse à l'aide d'un guide d'ions (**Figure III-4** section **C**). De type hexapolaire, il fonctionne de manière identique à l'hexapole de stockage. L'ajustement de l'amplitude et de la fréquence de la radiofréquence permet de sélectionner la gamme de rapport m/z pour laquelle le transfert des ions se fait de manière optimale. Le transfert des ions débute par l'abaissement du potentiel continu à la sortie de l'hexapole de stockage (HEX EXIT) et l'ouverture de la séparation physique (SHUTTER DC) entre la partie source ($\sim 10^{-4}$ Torr) et la partie très basse pression de l'instrument ($\sim 10^{-10}$ Torr) associée à la cellule FTICR. Sous l'effet de la différence de potentiel entre les deux extrémités de l'hexapole de stockage, les ions sont accélérés dans l'hexapole de transfert ("guide d'ions"). Le potentiel de la plaque de piégeage de la cellule FTICR du côté "guide d'ions" est mis à la terre pendant une durée variable pour permettre l'introduction des ions dans la cellule. Une bouffée d'azote peut être alors introduite à ce niveau pour thermaliser les ions au sein de la cellule FTICR.

➤ Le piégeage :

Le champ magnétique B_0 assure le confinement des ions dans le plan perpendiculaire au champ magnétique. Pour les piéger dans la dernière direction, un puits de potentiel est créé par application d'un potentiel sur une première paire de plaques dites de piégeage.

Le signe du potentiel appliqué sur les plaques de piégeage est adapté à la polarité des ions analysés. Il doit être le plus faible possible pour limiter les oscillations de piégeage afin de limiter la perturbation du mouvement cyclotronique. A cette fin, l'instrument employé dans cette étude assure la création de deux puits de potentiel emboîtés. Le premier permet un piégeage efficace des ions à des potentiels de l'ordre ± 15 V. Après thermalisation des ions,

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

ce potentiel est abaissé typiquement à ± 1 V. Les espèces ioniques sont alors piégées par un second jeu de plaques de piégeage portées à un potentiel de $\pm 0,25$ V.

L'emploi d'une source d'ions externe et l'utilisation d'une ligne de transfert impose que le puits de potentiel s'ouvre pour laisser entrer les ions au cœur de la cellule FTICR. Cette étape est critique. Elle peut conduire à des discriminations en masse au sein de la population d'ions due à un effet temps de vol au sein du guide d'ion au moment du transfert vers la cellule ICR.

➤ La cellule ICR

Le mouvement cyclotronique des ions, induit par l'interaction de ces derniers avec le champ magnétique, prend place au sein de la cellule FTICR (piège de Penning). La pression dans cette partie de l'instrument est de l'ordre de 10^{-10} Torr. A ces pressions, le libre parcours moyen d'un ion est important (plusieurs centaines de mètres) ce qui accroît sa durée de vie. Un piège de Penning peut adopter plusieurs géométries (cubique, parallélépipédique, cylindrique). Il est systématiquement constitué par trois jeux (au moins) de deux plaques appariées. Ces trois paires de plaques permettent la succession des trois étapes nécessaires à la production d'un spectre de masse FTICR : le piégeage, l'excitation et la détection des ions.

➤ L'excitation :

Après leur introduction au sein de la cellule, les ions se trouvent sur une orbite basse. Leur rayon de giration est de l'ordre de quelques dixièmes de millimètres. Leur mouvement, de type brownien, n'est pas cohérent. L'application sur la seconde paire (plaques d'excitation) d'une radiofréquence (début de l'étape E) permet, par un phénomène de résonance, un transfert d'énergie aux différentes populations d'ions présentes dans la cellule. Le rayon de la trajectoire augmente jusqu'à être porté au voisinage des plaques de détection. Cette étape a également pour effet d'augmenter la cohérence des ions possédant un même rapport m/z . Le rayon de l'orbite ne dépend que de la tension et de la durée d'excitation. Il faut alors contrôler deux paramètres importants pour l'acquisition du spectre de masse : l'intensité d'excitation et la durée d'irradiation (typiquement quelques ms). Ici l'excitation se fait sur une gamme de masse étendue à l'aide d'un signal composite associé à toutes les fréquences des ions potentiellement présents au sein de la cellule (250000 à 900000 Hz pour une gamme de m/z de 150 à 550 sous un champ de 9,4T).

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

- La détection et l'obtention d'un spectre de masse :

Lorsqu'ils sont proches du troisième jeu de plaques, les ions induisent par leur mouvement circulaire un courant alternatif détecté par une électronique adaptée. La superposition des signaux associés à des ions de rapport m/z différents conduit à l'observation d'un signal composite appelé interférogramme (*transient* en anglais) où les sinusoïdes amorties de l'ensemble des ions présents dans la cellule se superposent et se combinent.

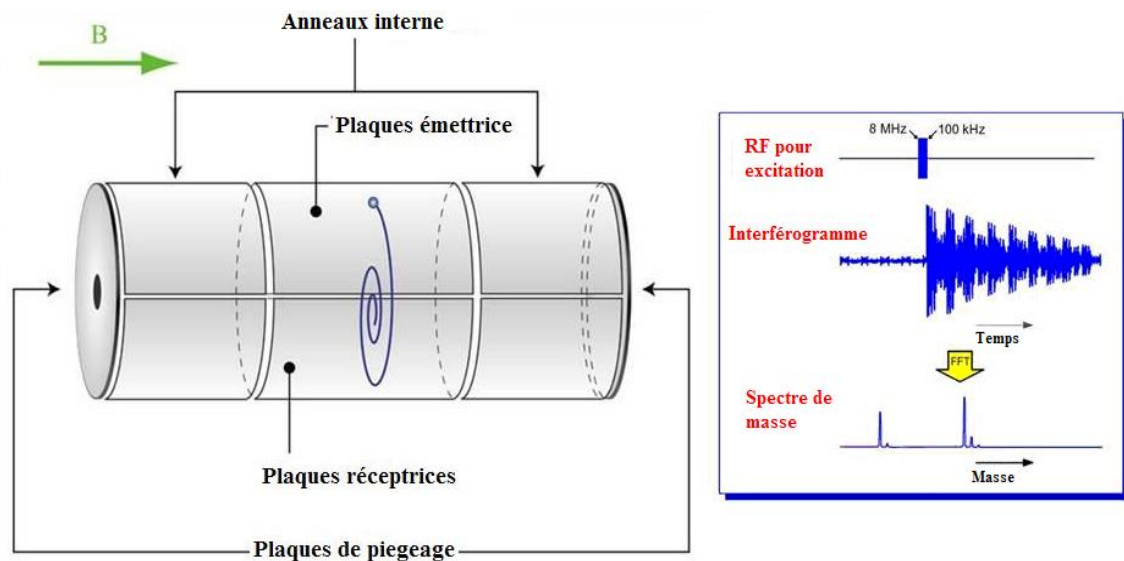


Figure III-5 : Étapes de traitement du signal pour l'obtention d'un spectre de masse à partir d'un interférogramme.

Pour extraire de ce signal complexe toutes les fréquences fondamentales qui le composent, une opération de transformée de Fourier est utilisée (FFT, Fast Fourier Transform). On obtient alors un spectre en fréquence (représentation de l'intensité du signal mesuré aux différentes fréquences). Avant le traitement par FFT, le signal détecté subit une opération d'apodisation par la fonction Blackman-Harris et un remplissage de zéro pour augmenter le nombre de points. Ces opérations améliorent la qualité du spectre obtenu. L'ensemble de ces opérations est décrit de manière schématique sur la **Figure III-5**.

- Performances et limitation de l'analyse FTICRMS

Outre une excellente exactitude sur la mesure du rapport m/z , l'analyse par FTICRMS est une technique permettant d'accéder à une analyse en très haute résolution, la résolution étant le degré de séparation des pics de masse. –la capacité de l'instrument à séparer deux masses consécutives.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

La mesure très précise de la fréquence de giration d'un ion au sein de la cellule FTICR est le principal responsable de l'obtention d'une bonne résolution et d'une bonne exactitude de la mesure de masse. Ceci est obtenu lorsqu'il est possible d'échantillonner (d'analyser) longuement le transient. Il faut donc que les ions possèdent des temps de vie longs et que le vide soit très important, typiquement de l'ordre de 10^{-9} Pa.

D'autres paramètres influencent le temps d'observation du transient et en tout premier lieu la perte de cohérence (c'est à dire de phase) du mouvement cyclotronique. Ce phénomène a lieu lorsque la quantité d'ions est trop importante dans la cellule. Des processus d'effets de charges d'espace ont lieu, et conduisent à une modification du positionnement des ions, initialement en paquets. Les répulsions électrostatiques vont conduire à un étalement en demi-lune qui va notablement diminuer l'exactitude de la mesure de la fréquence. Ce processus peut également avoir lieu si le taux de collision ion-molécule est trop important.

De même, une non-homogénéité du champ magnétique va nuire à l'observation sur un temps long du mouvement cohérent des ions. Il est bon de noter que l'augmentation du champ B_0 a pour effet d'augmenter la résolution en masse, la gamme dynamique mais surtout d'augmenter la gamme de masse accessible lors de l'analyse FTICRMS.

➤ Spectre de masse obtenu en LDI-FTICRMS

Un spectre typique en ion positif de la matière particulaire associée aux MSS de la cigarette A par LDI-FTICRMS est présenté sur la **Figure III-6**.

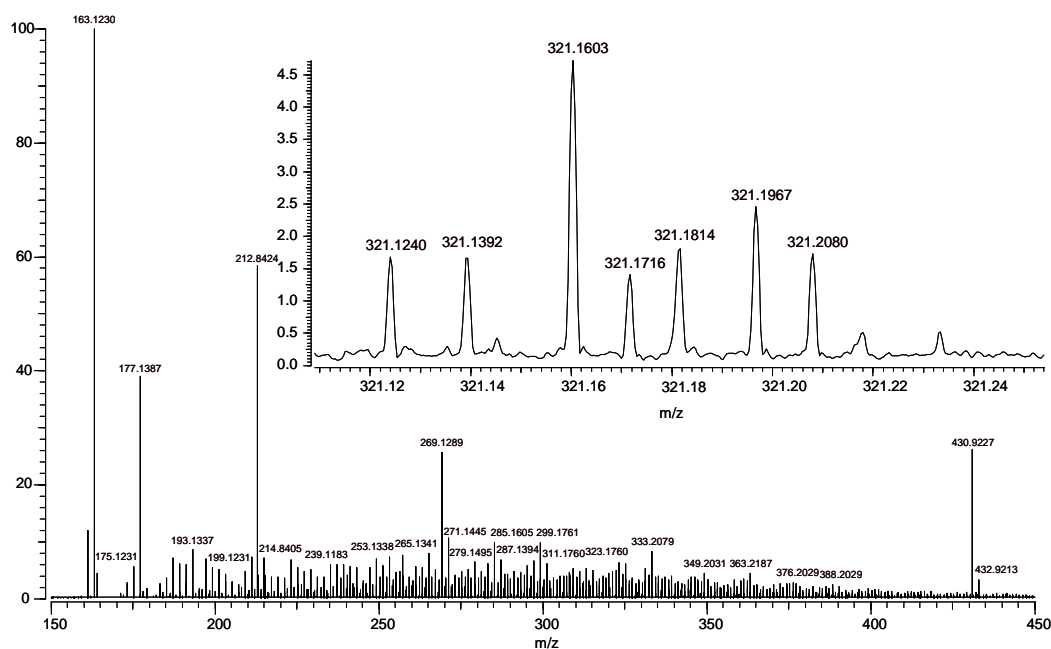


Figure III-6 : Spectre de masse LDI-FTICRMS de MSS de la cigarette A en mode positif.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

Ce spectre contient environ 800 signaux dans une gamme de rapport m/z comprise entre 150 et 500. Jusqu'à douze contributions peuvent être observées pour une masse nominale donnée. Un exemple à la masse nominale m/z 321 est donné en cartouche sur la **Figure III-6**. Devant cette complexité, il apparaît indispensable d'appliquer aux résultats obtenus par la technique FTICRMS des procédures de traitements post-acquisition qui débute par l'attribution non-ambigüe pour chaque signal d'une formule élémentaire et à l'emploi de représentations graphiques pertinentes capables de permettre une comparaison rapide et aisée des différentes fumées de cigarette étudiées.

III.3. Exploitation et traitement des spectres de masse

III.3.1. Attribution des compositions élémentaires.

L'exactitude de la mesure du rapport m/z en FTICRMS présente l'avantage de permettre l'attribution d'une composition élémentaire à chaque signal détecté. Il est nécessaire qu'au préalable une calibration de l'instrument ait été réalisée. Classiquement, les agrégats carbonés de type $C_x^{\bullet+/-}$ et/ou $HC_x^{+/-}$ produits par désorption/ionisation du graphite sont employés sur une gamme de rapport m/z comprise entre 160 et 500. On procède ainsi à une calibration dite « pseudo interne ». Les ions générés par LDI d'un échantillon de fumée de cigarette et du calibrant (graphite) physiquement séparés sur le porte-échantillon sont accumulés simultanément dans l'hexapole de stockage avant d'être analysés conjointement dans la cellule FTICRMS. Ainsi, les ions relatifs aux molécules présentes dans l'échantillon analysé et aux agrégats carbonés sont présents sur le même spectre de masse comme le montre la **Figure III-7**. On obtient ainsi une précision importante sur la mesure du rapport m/z des espèces issues de la LDI des particules de fumées de cigarette assurant une meilleure confiance à l'attribution d'une formule élémentaire.

Pour chaque signal présentant un rapport signal sur bruit (S/N) supérieur à 3, il est alors possible à l'aide du logiciel *Omega 8 Elemental composition* de proposer une formule brute. Les critères de recherche employés sont $C_{6-100}^{13}C_{0-2}H_{6-100}N_{0-20}O_{0-20}S_{0-5}K_{0-5}$. La précision sur la mesure de masse est alors meilleure que 2 ppm et typiquement en moyenne de l'ordre de 0,6 ppm. Régulièrement, au cours de la procédure d'attribution, le spectre est

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

calibré de nouveau à l'aide des signaux déjà attribués selon la procédure décrite par Masselon *et al*¹²⁰ en employant la formule (15).

$$\frac{m}{z} = \frac{a}{f} + \frac{b}{f^2} + \frac{c \times i}{f^2} \quad (15)$$

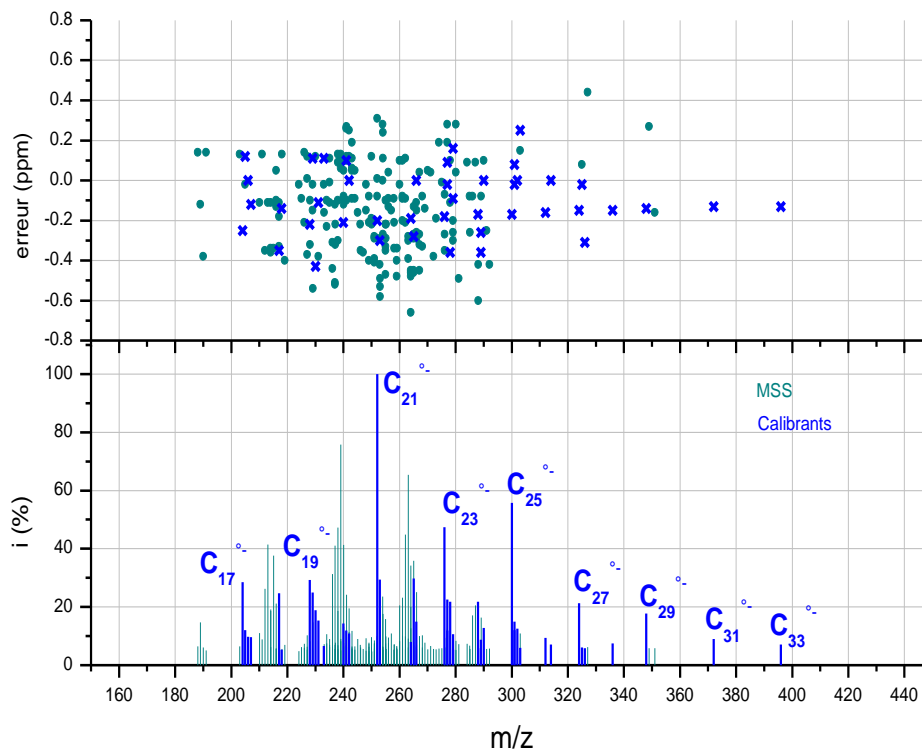


Figure III-7 : Calibration pseudo-interne à l'aide de graphite pour un spectre de MSS de la cigarette A en mode de détection négatif.

Dans cette équation, le rapport m/z est fonction de la fréquence cyclotronique f de l'ion et de l'intensité i de celui-ci.

Cette méthode permet d'établir une liste de compositions élémentaires avec une erreur absolue typiquement inférieure à 0,6 ppm.

Les ions $C_x^{\bullet+/-}$ et/ou $HC_x^{+/-}$ présentent l'avantage de générer des espèces dont le défaut de masse (écart entre la masse exacte et la masse nominale) est extrêmement faible. Ils se distinguent ainsi nettement des signaux relatifs aux espèces présentes dans les fumées de cigarette. L'abondance des ions $C_x^{\bullet+/-}$ et/ou $HC_x^{+/-}$ étant relativement importante, ils sont susceptibles de perturber la détection des ions de faible intensité produits au cours de la LDI des particules de fumées de cigarette. On observe alors une perte d'information et une diminution de la sensibilité. Il n'est donc pas possible d'utiliser cette méthode de manière

120 Masselon, C.; Tolmachev, A. V.; Anderson, G. A.; Harkewicz, R.; Smith, R. D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 99-106.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l’analyse de fumée de cigarette

systematique, mais elle permet d’attribuer avec confiance les signaux les plus intenses et donc de les employer ensuite pour assurer la calibration de chaque spectre. Par ailleurs, l’emploi de la calibration « pseudo-interne » est particulièrement intéressant dans les cas où aucun ion ne peut être identifié au préalable avec un niveau de confiance suffisant comme c’est le cas pour les analyses en mode négatif. Par contre, en mode de détection positif, l’ion protoné de la nicotine (m/z 163,123), des espèces inorganiques comme $K_3SO_4^+$ ou hybrides (organique-inorganique) ont pu être formellement identifiés par spectrométrie de masse en tandem et/ou grâce à leur distribution isotopique. Ils sont alors employés comme calibrants internes. En suivant cette méthodologie, la moyenne des erreurs obtenues sur la mesure de rapport m/z est comprise entre 0,2 et 0,7 ppm tant en mode de détection négatif (**Figure III-7**) que positif (**Figure III-8**).

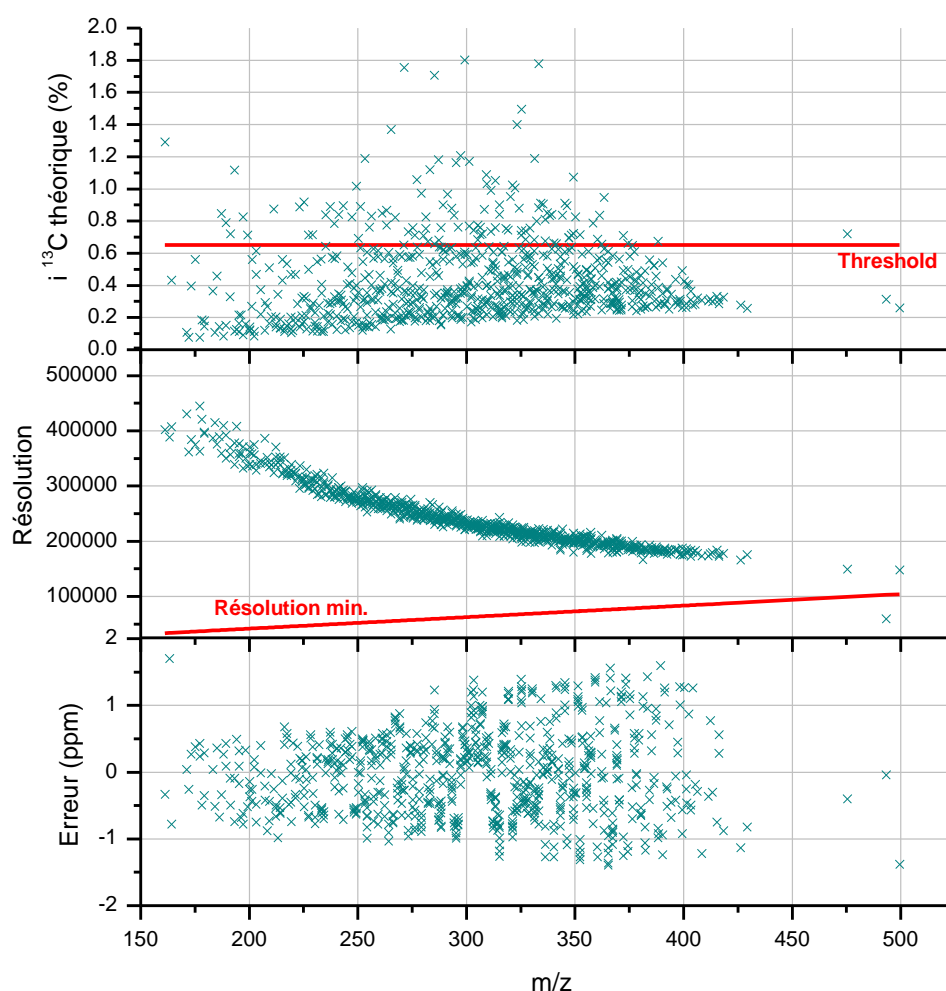


Figure III-8 : Performances obtenues en LDI-FTICRMS en mode de détection positif pour les MSS de la cigarette A. Le graphique du bas représente l’erreur en ppm sur les compositions élémentaires associées à chaque pic. La graphique du milieu est la résolution de chaque pic de masse avec la résolution minimale pour distinguer la contribution d’un ^{12}CH et celle d’un ^{13}C (ligne rouge). Le graphique supérieur reporte l’intensité théorique des ^{13}C des ions attribués et le seuil de détection ($S/N=3$) en rouge.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

Par ailleurs, il est bon de noter à ce niveau que la résolution obtenue (comprise entre 450 000 et 150 000) sur la gamme 150 – 500 m/z est toujours suffisante pour permettre la distinction entre un signal associé à la distribution en ^{13}C et l'ion mono-isotopique protoné d'un composé, la différence entre la masse du ^{13}C et celle de ^{12}CH étant de 0,00448 Da. Pour s'en convaincre, il suffit de comparer sur le graphique central de la **Figure III-8** où sont donnés la résolution théorique (ligne rouge) nécessaire à cette distinction et les points correspondant à la résolution obtenue. Il est également à noter que bon nombre de contributions en ^{13}C possèdent une abondance théorique inférieure à celle du seuil S/N = 3. En effet, le graphique supérieur de la **Figure III-8** reporte les intensités des contributions attendues en ^{13}C pour l'ensemble des ions mono-isotopiques qui ont pu être identifiés.

III.3.2. Outils d'interprétation des spectres de masse

III.3.2.A. Equivalent double liaison et indice d'aromaticité

A partir de la composition élémentaire obtenue, il est possible de calculer pour chaque contribution le nombre d'insaturations présentes soit un « équivalent en double liaison » (DBE) à partir de la formule :

$$DBE = n_C - \frac{n_H}{2} + \frac{n_N}{2} + 1 \quad (16)$$

Les valeurs n_C , n_H et n_N sont respectivement, le nombre d'atomes de carbone d'hydrogène et d'azote. La valeur de DBE présente l'avantage de donner une indication sur le type d'ion observé. Une valeur de DBE entière sera indicatrice d'un ion radicalaire alors qu'une valeur de DBE demi entière représentera une espèce protonée ou déprotonée. Dans le cas d'un spectre de masse LDI-FTICRMS de fumées de cigarette, comme par exemple celui présenté **Figure III-6**, les ions détectés sont associés à des formules du type $[\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_{0-4}\text{O}_{0-5}]^{\bullet+}$ et $[\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_{0-4}\text{O}_{0-5}]^+$ ou $x = 10-27$ et $y = 10-35$. La proportion d'ions radicalaires est très faible puisqu'elle n'est que d'environ 1%. Dans la majorité des cas, ces ions correspondent à des composés possédant une valeur de DBE très élevée et peuvent être associés à des composés aromatiques. La délocalisation de la charge sur l'ensemble du système conjugué est en effet gain de stabilité. Pour l'essentiel de ces espèces radicalaires $\text{M}^{\bullet+}$, l'espèce protonée $[\text{M}+\text{H}]^+$ est également observée.

Cet équivalent double liaison ne permet pas de refléter pleinement le degré d'aromaticité des molécules détectées. Il ne tient en effet ni compte de la taille de la molécule, ni du nombre d'hétéro-atomes qui peuvent pourtant influencer l'aromaticité du composé. Pour

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

rendre compte de la possibilité que des hétéro-atomes soient inclus dans le système aromatique, le calcul de l'indice d'aromaticité (AI) a été développé.¹²¹ Il est donné par la formule suivante :

$$AI = \frac{1 + n_C - n_O - n_S - 0,5 \times n_H}{n_C - n_O - n_S - n_N - n_P} \quad (17)$$

Les valeurs n_C , n_O , n_S , n_H , n_N et n_P sont respectivement, le nombre d'atomes de carbone, d'oxygène, de soufre, d'azote et de phosphore. Un indice d'aromaticité (AI) compris entre 0 et 0,5 est caractéristique d'une molécule aliphatique ou oléfinique. Un AI de 0 est représentatif d'une molécule purement hydrocarbonée totalement saturée, des valeurs négatives correspondent à des molécules totalement saturées présentant des hétéro-atomes. Pour des valeurs d'AI comprises entre 0,5 et 0,67 les composés sont relatifs à des systèmes conjugués. Le benzène possède un AI de 0,67. Au-delà, il s'agit d'espèces possédant des noyaux aromatiques condensés.

La **Figure III-9** présente la répartition des espèces observées en fonction de leur AI dans le cadre de l'analyse en mode de détection positif des MSS de la cigarette A.

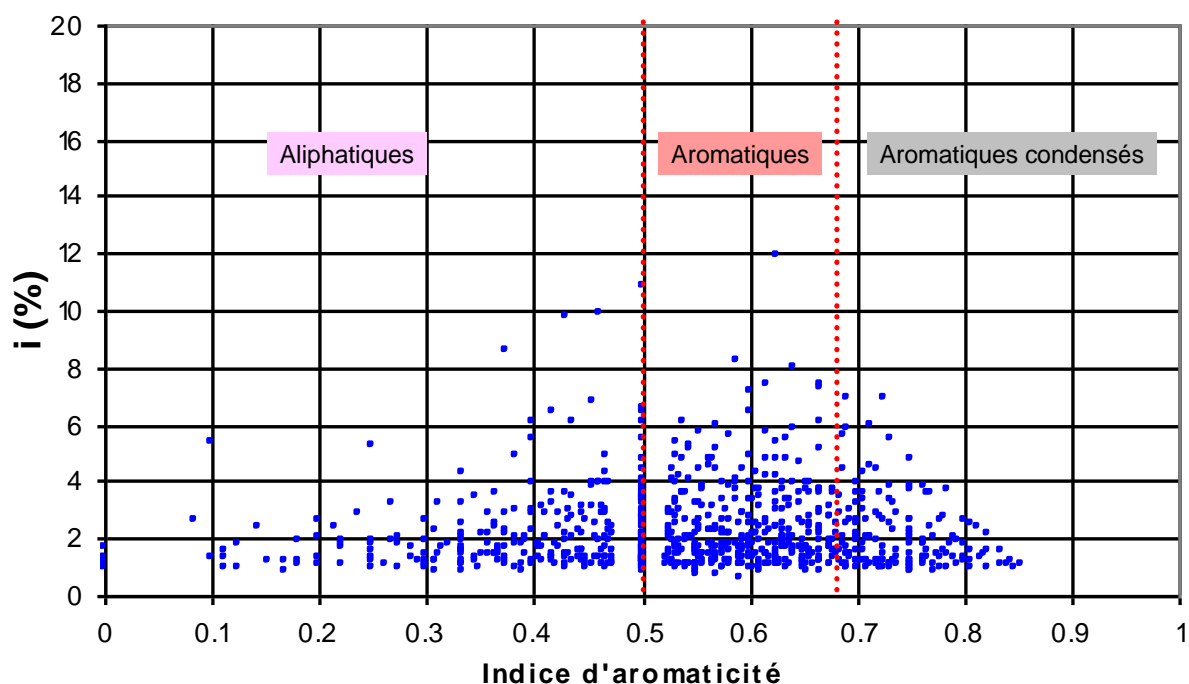


Figure III-9 : Indice d'aromaticité des composés détectés au cours de l'analyse en mode positif de MSS de la cigarette A. Le spectre de masse associé est présenté sur la Figure III-6.

¹²¹ Koch, B. P.; Dittmar, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 926-932.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

Les espèces principalement détectées au cours de cette analyse sont des espèces aromatiques plus ou moins condensées. Elles peuvent être associées soit à des noyaux benzène ou pyridine substitués par une ou des chaînes alkyles cycliques, linéaires et/ou ramifiées. Afin de se repérer, on peut préciser que la nicotine possède un AI de 0,5.

III.3.2.B. Représentation par famille chimique

Sur la base de l'attribution d'une formule chimique pour les 800 contributions observées sur la **Figure III-6**, il est possible de répartir les différentes espèces en fonction de la nature et du nombre d'hétéro-atomes (oxygène et azote) qu'elles contiennent. Pour permettre une comparaison entre différents échantillons, une étape de normalisation est requise. Typiquement pour l'ensemble des échantillons analysés, l'essentiel des composés observés est relatif à des espèces purement hydrocarbonées ou à des molécules hydrocarbonées contenant un ou plusieurs hétéro-atomes (presque exclusivement l'azote et l'oxygène). La procédure de normalisation a donc consisté à calculer le courant ionique total (TIC) des espèces $[C_xH_yN_{0-4}O_{0-5}]^{\bullet+/-}$ et $[C_xH_yN_{0-4}O_{0-5}]^{+/-}$ et à diviser l'intensité absolue de chacun de ces ions par la valeur du TIC. Les intensités normalisées des espèces contenant le même nombre et le même type d'hétéro-atomes sont alors sommées. On obtient ainsi en fonction du nombre d'atome d'azote et d'oxygène des histogrammes comme ceux présentés sur la **Figure III-10**.

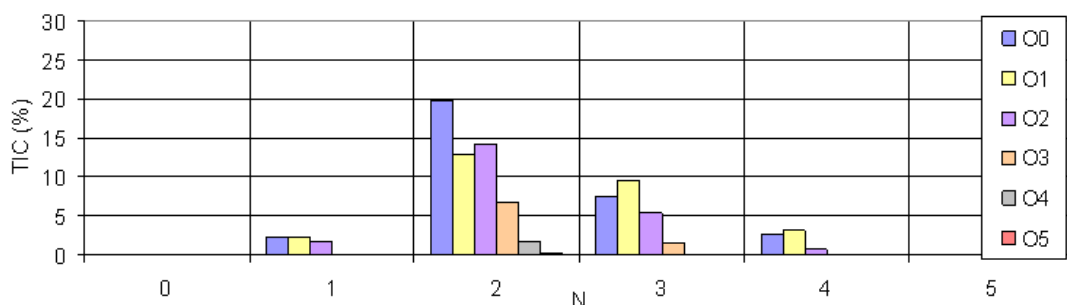


Figure III-10 : Répartition par familles des composés détectés lors de l'analyse en ions positifs par LDI-FTICRMS des MSS de la cigarette A

La **Figure III-10** montre la prédominance des espèces $[C_xH_yN_{1-4}O_{1-4}]^{\bullet+}$ qui représentent 70% du TIC et 60% du nombre de signaux détectés. Par ailleurs, la famille des composés $C_xH_yN_2O_{1-5}^{\bullet+}$ est la plus largement représentée. La forte proportion sur les spectres obtenus d'ions contenant au moins un atome d'azote permet d'expliquer le grand nombre d'espèces protonées détectées. La présence d'un doublet non liant sur l'atome d'azote

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

fait de ces composés des bases de Lewis puissantes qui par capture de proton conduisent à la formation d'ions ammonium quaternaire.

III.3.2.C. Diagramme de van Krevelen

Les diagrammes de van Krevelen sont largement utilisés dans le cadre de l'étude de milieux complexes comme les NOM¹²² ou les pétroles¹²³ pour rendre compte des résultats issus d'une analyse par FTICRMS.

Ils reportent simplement les rapports du nombre d'atomes d'hydrogène sur le nombre d'atomes carbone (H/C) en fonction du rapport du nombre d'atomes oxygène ou azote sur le nombre d'atomes de carbone (O/C ou N/C). Ils peuvent être construits en deux ou trois dimensions et permettent d'observer conjointement, pour les différents composés présents dans le milieu analysé, le taux d'insaturations et la richesse en atomes d'azote ou d'oxygène des différents composés observés.

Plusieurs informations peuvent être obtenues à l'aide de ce type de représentation. Les grandes classes de composés organiques (lipides, sucres, protéines, aromatiques) ne se répartissent pas de manière aléatoire dans de tels graphiques mais occupent des zones qui leurs sont propres comme cela est reporté sur la **Figure III-11**. Les alignements des points relatifs aux différents composés permettent également d'avoir des renseignements sur la nature des modifications chimiques entre deux composés se positionnant sur cette ligne.

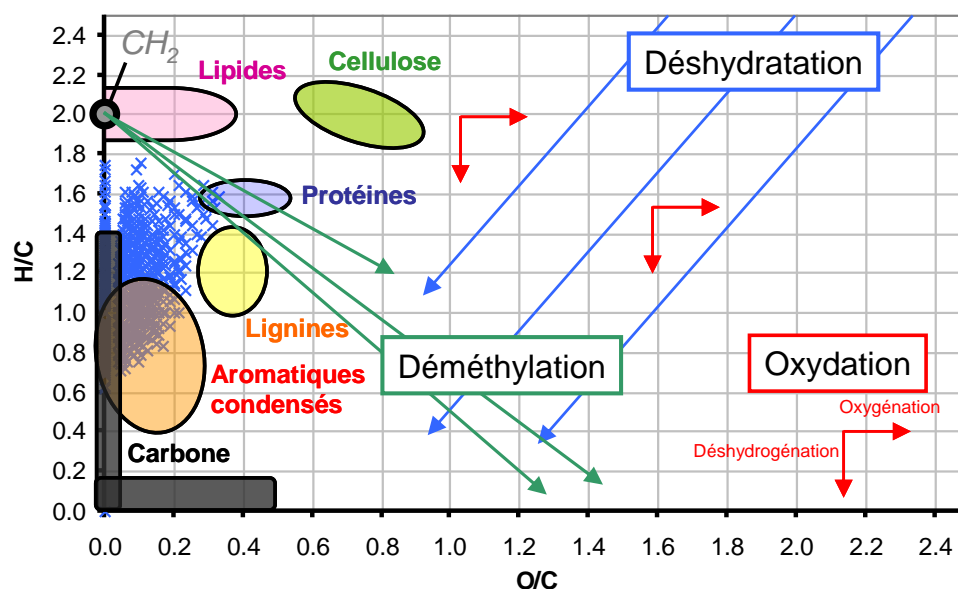


Figure III-11 : Diagramme de van Krevelen obtenu par analyse en mode positif de MSS de la cigarette A. Le spectre de masse associé est présenté sur la Figure III-6.

¹²² Kim, S.; Kramer, R. W.; Hatcher, P. G. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5336-5344.

¹²³ Rodgers, R. P.; Schaub, T. M.; Marshall, A. G. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 20 A-27 A.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

En effet, le déplacement sur une ligne horizontale ou verticale peut être associé respectivement à une oxygénation/désoxygénation ou à une hydrogénation/déshydrogénation. Ainsi, le déplacement selon une ligne oblique de pente égale à 2 est à relier à des écarts de H₂O. Les droites qui convergent vers le point H/C = 2 ; O/C = 0 (en vert sur la **Figure III-11**) sont relatives à des familles de composés pour lesquels à nombre d'hétéro-atomes constant des groupements méthylène CH₂ s'ajoutent (méthylation) ou se retranchent (déméthylation).

Pour les fumées de cigarette, les composés détectés sont relativement proches de l'axe des ordonnées (O/C < 0.4) avec un rapport H/C compris entre 0,6 et 1,8. En conséquence, ces composés seront plutôt associés à des molécules aromatiques.

Si cette représentation apparaît pertinente pour identifier la classe d'un composé, il n'en demeure pas moins que l'on perd l'information du rapport m/z et donc de la formule brute.

III.3.2.D. Cartes de Kendrick

La carte de Kendrick est un outil complémentaire au diagramme de van Krevelen. Elle est largement employée dans le cadre de l'analyse par FTICRMS de produits pétroliers ou de leurs dérivés.¹²⁴ Elle nécessite le calcul des masses de Kendrick pour chaque ion détecté. Celles-ci sont déterminées en considérant que la masse d'un groupement méthylène devient la masse de référence et est exactement égale à 14,00000 Da (CH₂) et non plus 14,01565 Da lorsque la masse de référence est celle du carbone 12 (masse IUPAC). La masse de Kendrick se calcule selon l'équation (18)

$$KM = M_{mesurée} \times \frac{14}{14,01565} \quad (18)$$

KM : masse de Kendrick
M : masse mesurée (IUPAC)

On peut ensuite calculer le défaut de masse de Kendrick (KMD) associé à la différence entre la masse nominale et la masse de Kendrick d'un composé. La carte de Kendrick reporte alors le KMD en fonction de la masse nominale. La carte obtenue à partir des analyses en mode positif des MSS de la cigarette A est présentée sur la **Figure III-12**.

Tous les composés ne se différenciant que par des unités CH₂ présentent la même valeur de KMD et s'alignent alors horizontalement sur la carte selon la périodicité 1, chaque point étant distant de son voisin par 14 unités de masse de Kendrick.

124 Marshall, A. G.; Rodgers, R. P. *Accounts Chem. Res.* **2003**, *37*, 53-59.

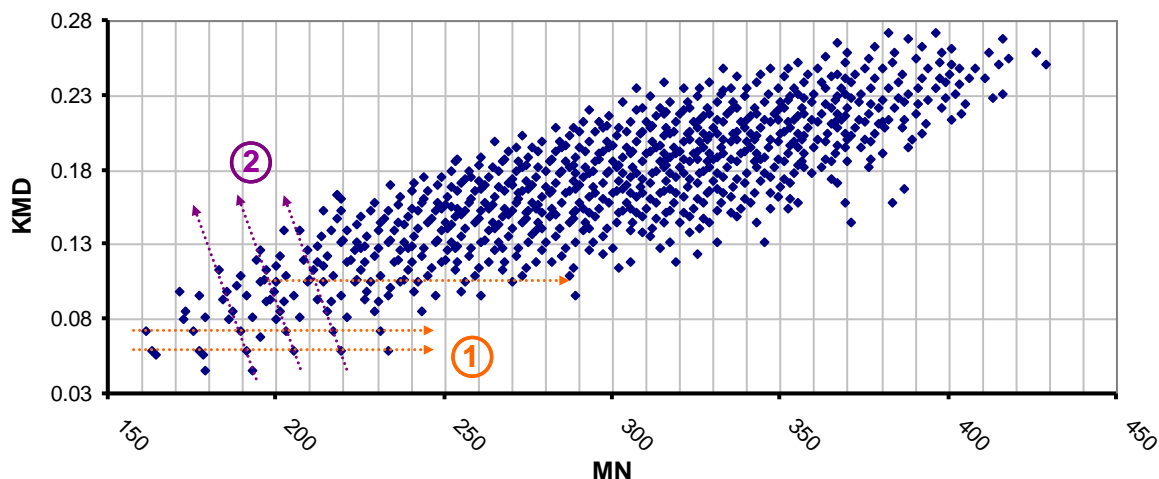


Figure III-12 : Carte de Kendrick obtenue par analyse en mode positif de MSS de la cigarette A. Le spectre de masse associé est présenté sur la Figure III-6.

Les composés possédant le même nombre d'atomes de carbone mais un nombre d'insaturations différent ne diffèrent que par le nombre de motifs H_2 , et présentent une seconde périodicité (ligne 2) sur la carte. Le point de la droite se trouvant le plus haut (valeur de KMD la plus élevée) possède la DBE la plus élevée et donc une aromaticité plus importante. Les points observés sur cette ligne 2, dont l'écart correspond à la moitié de la périodicité sont associés à des ions radicalaires. Cette représentation permet ainsi d'observer des différences d'ordre structurales entre deux nuages de points tout en conservant l'information sur le rapport m/z .

III.3.3. Choix de la gamme de masse étudiée.

L'emploi d'une source d'ionisation externe comme cela a été décrit précédemment nécessite le transfert des ions de l'hexapole de stockage vers la cellule ICR à l'aide d'un guide d'ions hexapolaire. L'application d'une radiofréquence sur ce guide d'ions conduit invariablement à des discriminations de transfert en fonction du rapport m/z des ions. En effet, les domaines de stabilité des ions étant dépendant de l'amplitude de la radiofréquence (RF) appliquée, la gamme de rapport m/z pour laquelle les ions adoptent une trajectoire stable est limitée. S'ajoute également à ces considérations un petit effet temps de vol. La **Figure III-13** présente les résultats obtenus pour deux conditions de transfert des ions différentes.

Les résultats montrent une forte dépendance vis-à-vis de la valeur de l'amplitude de la RF du guide d'ion qui est de 140V et 275 V pour l'obtention des spectres de masse en orange et bleu, respectivement. Quelque soit la valeur de la RF, aucun signal à $m/z < 100$ n'a pu être observé. La forte valeur de pression saturante pour ces composés ne permet en effet pas de les

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

maintenir à l'état condensé dans la source d'ionisation qui se trouve à pression réduite (10^{-7} mbar). Ces composés se subliment ou s'évaporent avant même que l'analyse n'ait débuté. L'optimisation des paramètres de transfert des ions pour permettre à des ions de plus haut m/z d'être acheminés vers la cellule ne conduit pas à l'apparition de nouveaux signaux (aucun composé de $m/z > 450$ n'est détecté en mode de détection positif) mais à une perte conséquente d'intensité pour les ions de bas rapport m/z .

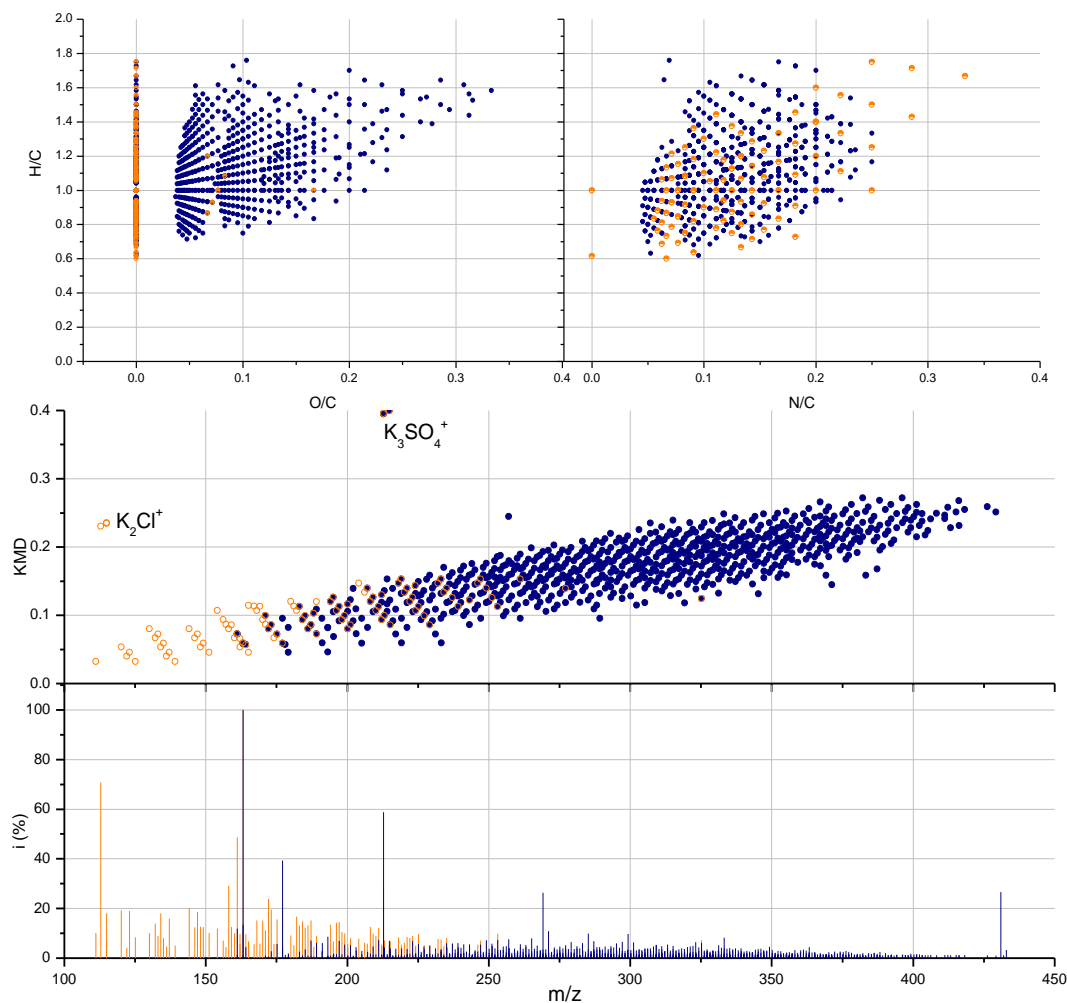


Figure III-13 : Analyse des MSS en mode de détection positif pour deux conditions de transfert des ions. En orange pour une amplitude de la RF de 140 V et en bleu pour une amplitude de 275 V.

L'emploi de cartes de Kendrick dans les deux conditions d'analyse montre non seulement que certains signaux sont communs (interpénétration des nuages orange et bleu) mais également, des prolongements des différentes classes de composés sont observés pour des valeurs de m/z plus faible (orange) ou plus importante (bleu) en fonction de la fraction ionique qui est préférentiellement transférée dans la cellule FT-ICR. Il est raisonnable ainsi de

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

penser qu'il s'agit d'espèces appartenant au même type de famille mais qui possèdent un nombre d'atomes de carbone plus ou moins important.

Cela est confirmé si l'on considère les diagrammes de van Krevelen. Les diagrammes H/C – N/C pour les deux conditions opératoires se superposent de manière importante. En revanche, le diagramme H/C – O/C montre que très peu de composés oxygénés sont présents dans le domaine des faibles rapports m/z.

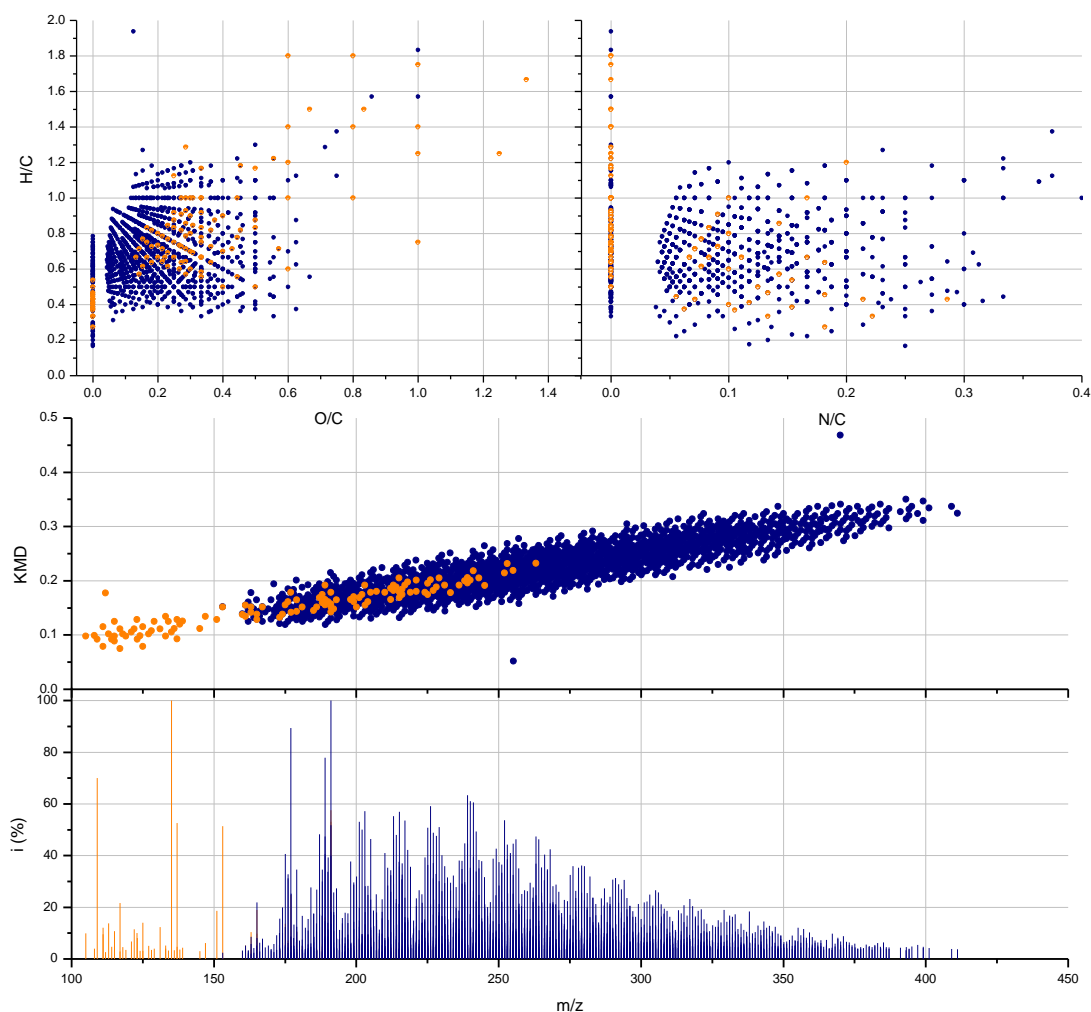


Figure III-14 : Analyse des MSS en mode de détection négatif pour deux conditions de transfert des ions. En orange pour une amplitude de la RF de 140 V et en bleu pour une amplitude de 275 V.

Une étude similaire a été mise en œuvre concernant les analyses en mode de détection négatif (**Figure III-14**). On note des tendances semblables à celles observées en mode de détection positif. En conséquence, là aussi les spectres de masse obtenus ne correspondent pas à des familles de composés différentes mais à l'extension d'un continuum de formules chimiques séparées par un ou plusieurs atomes de carbone. Le comportement en ions négatifs est cependant légèrement différent de celui décrit pour les ions positifs. En effet, il est

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

possible de modifier la gamme de rapport m/z pour laquelle des ions sont observés en augmentant notamment/par exemple l'énergie du faisceau laser. Il est par conséquent nécessaire d'examiner l'influence de ce paramètre sur la nature des informations qui peuvent être obtenues.

III.3.4. Influence de l'énergie du faisceau laser.

Moyennant la modification des paramètres de transfert des ions pour permettre la détection des ions de haut rapport m/z , l'analyse des composés présents sur la matière particulaire issue des MSS à forte fluence laser en mode négatif conduit à la détection d'espèces très fortement, voire purement carbonées (**Figure III-15**).

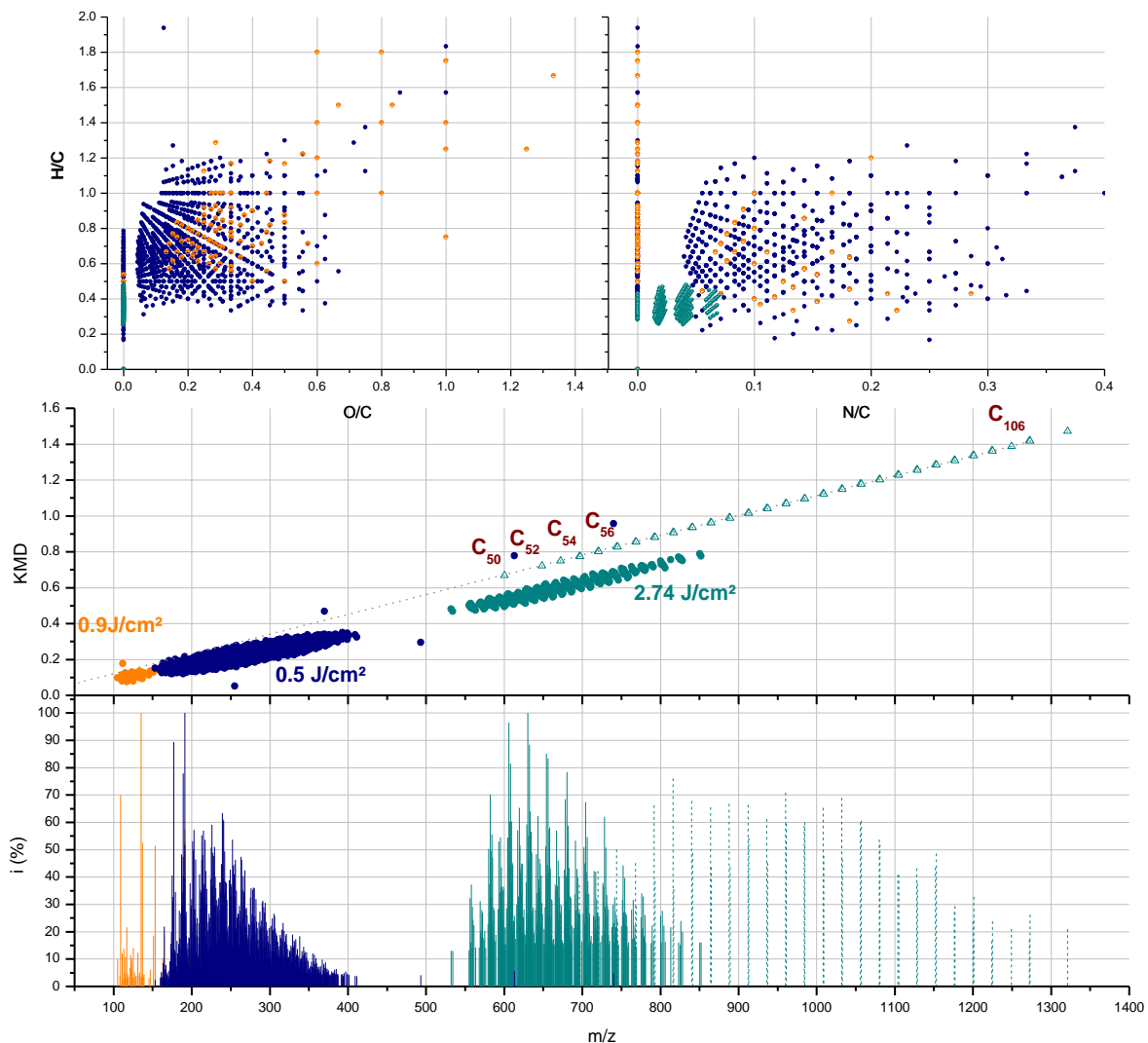


Figure III-15 : Analyse des MSS en mode de détection négatif pour trois valeurs d'énergie laser.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

Une ligne diagonale dont chaque point est séparé de 12 unités de masse est visible sur la carte de Kendrick. Elle rassemble des ions relatifs à des agrégats carbonés de type fullerène. Les espèces détectées en haute masse (points verts), comme le montre le diagramme de Van Krevelen H/C –O/C, ne contiennent pas d'atomes d'oxygène (points alignés selon une ligne de rapport O/C = 0) mais contiennent de 0 à 3 atomes d'azote (4 nuages de points verts distincts sur le diagramme H/C –N/C). Ces nuages sont globalement en dessous de ceux obtenus lorsque l'énergie laser est plus faible sur des gammes de plus petits rapports m/z. En conséquence, il s'agit d'espèces particulièrement condensées présentant un nombre limité d'atomes d'hydrogène. Ces espèces sont également facilement repérées sur la carte de Kendrick puisqu'ils se situent juste au dessous de la ligne relative aux composés de type fullerènes. Le rapport S/N de ces espèces est par ailleurs faible. La modification de l'énergie du faisceau laser conduit à penser que d'un régime de désorption/ionisation (spectre orange et bleu), on passe à un régime d'ablation (spectre vert). Dans ce cadre, la profondeur sondée est plus importante et le concours d'espèces associées au cœur de la particule est plus significatif. Principalement constituée de suies (c'est-à-dire de matériau purement carboné)¹²⁵, il n'est pas surprenant d'observer à fortes fluences des espèces fortement condensées présentant un grand nombre d'atome de carbone, peu d'atomes d'hydrogène et d'azote et aucun atome d'oxygène. Par ailleurs, le régime d'ablation se caractérise par la possibilité de conduire à d'importantes recombinaisons au cours de l'interaction laser – particule mais aussi en phase gazeuse rendant délicate l'obtention d'informations pertinentes sur la nature des espèces présentes dans l'échantillon analysé. Il apparaît finalement qu'à basse énergie laser (régime de désorption laser), seules les espèces présentes à la surface contribuent à la constitution du spectre de masse. En revanche, en régime d'ablation, la contribution du cœur des particules et de produits de recombinaison est prépondérante rendant périlleux et délicat pour ne pas dire impossible la comparaison fine de la matière particulaire associée à différentes fumées de cigarette. En conséquence, il apparaît judicieux de demeurer dans le domaine d'interaction laser-matière propre au régime de désorption sur la gamme de rapport m/z compris entre 150 et 450. Afin d'affiner la valeur de l'énergie laser la plus adaptée, nous allons approfondir notre connaissance de l'influence de l'énergie laser sur la nature et la distribution des espèces observées.

L'étude a porté sur l'évolution de la distribution des ions positifs et négatifs pour des conditions de transfert des ions données (optimales entre m/z 150 et 450) à quatre valeurs

¹²⁵ Bliefert, C.; Perraud, R. In *Chimie de l'environnement*; Wiley-VCH, Ed., 1997, pp 234-252.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

d'énergie laser entre 0,58 et 1,85 J/cm². Les résultats observés dans les deux modes de détection conduisant à des conclusions et interprétations similaires, ne seront présentés ici que les résultats obtenus pour les ions positifs. Il est à noter que les spectres présentés ici sont le résultat de la somme de 10 à 15 spectres de masse et non de 45 ce qui conduit à une diminution de la sensibilité. Bien que les diagrammes associés soient moins riches, ils permettent d'observer des différences significatives.

En effet, la **Figure III-16** présente l'évolution du spectre de masse, des cartes de Kendrick et des diagrammes de van Krevelen H/C – O/C et H/C – N/C en fonction de l'énergie laser employée pour conduire les processus de désorption/ionisation, toute autre paramètre expérimental étant fixe.

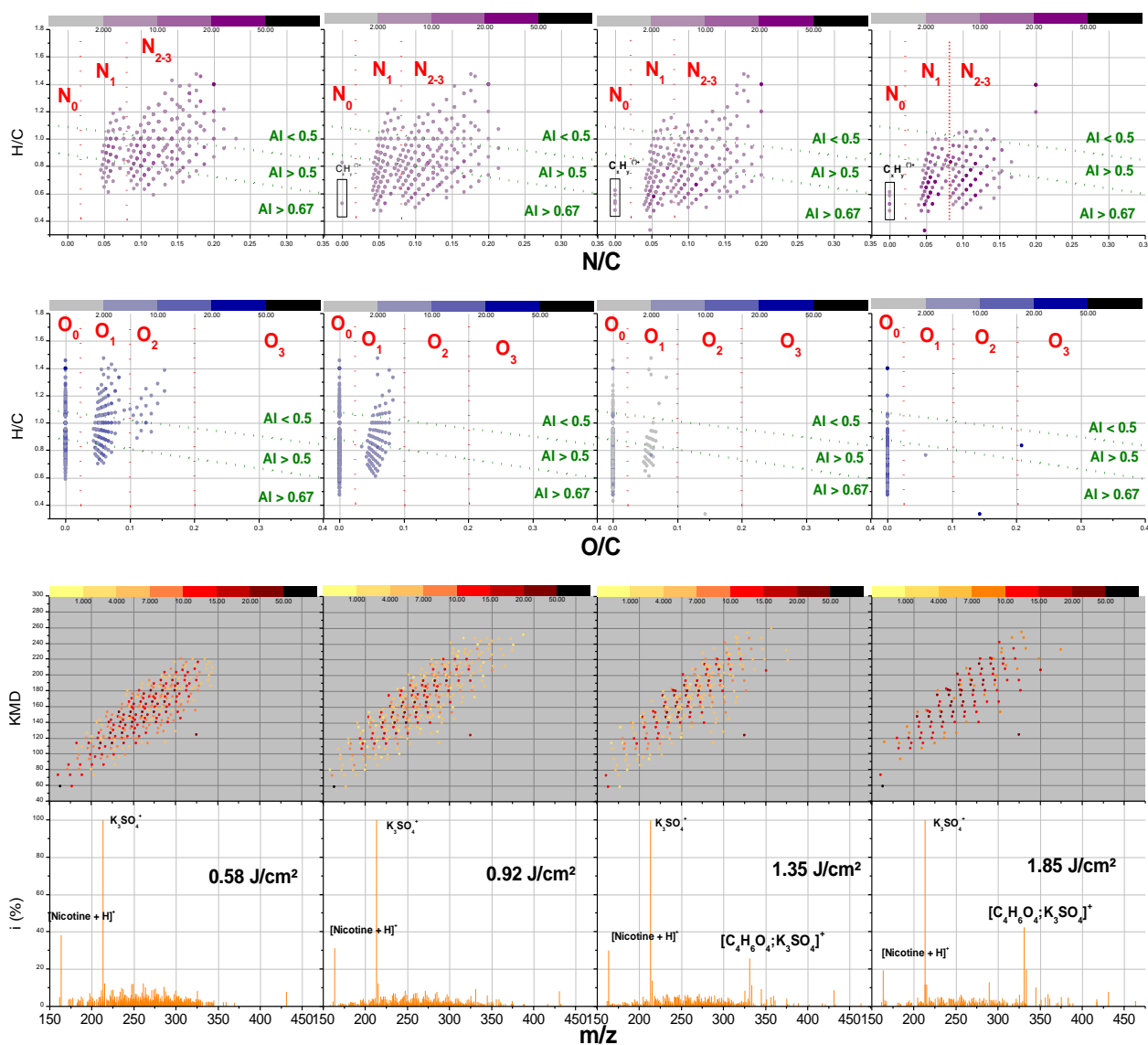


Figure III-16 : Influence de l'énergie laser lors de l'analyse des MSS en mode de détection positif sur la distribution des espèces observées.

La LDI-FTICRMS – Principes et applications à l'analyse de fumée de cigarette

De manière globale, on constate une diminution progressive de l'intensité relative de l'ion protoné de la nicotine au même titre que ce qui est observé pour les autres composés hydrocarbonés. A l'inverse, la contribution des espèces inorganiques ou hybrides augmente. Cela n'est pas surprenant si l'on garde en tête que les seuils de désorption ionisation de ces espèces sont supérieurs aux composés organiques de par l'énergie de cohésion (énergie réticulaire) plus élevée pour ces composés. Certains signaux associés à des espèces hybrides organiques-inorganiques et notamment l'ion $[C_4H_6O_4, K_3SO_4]^+$ apparaissent et voient leur intensité augmenter conjointement avec celle de l'ion $K_3SO_4^+$. On peut raisonnablement penser que ces espèces sont liées et que la formation des hybrides pourrait résulter de processus de type ionisation chimique. L'ionisation a alors lieu par association avec $K_3SO_4^+$. Les profils globaux des cartes de Kendrick ne varient que très peu, ce qui confirme qu'en mode de détection positif, la gamme de masse accessible ne dépend que faiblement de l'énergie laser. Cependant un léger décalage vers les valeurs de KMD élevées apparaît lorsque la fluence laser augmente, l'augmentation du nombre d'insaturations peut sans doute être associée à un taux plus important de processus de fragmentation et plus spécifiquement à l'élimination de molécules d'hydrogène. On note ainsi une augmentation sur les cartes de van Krevelen des espèces à fortes valeurs d'AI. Une diminution significative et progressive des espèces les moins intenses (généralement associées aux espèces les plus oxygénées) est également révélatrice de processus d'élimination de molécules oxygénées (eau, monoxyde de carbone, dioxyde de carbone) lorsque la fluence laser augmente et donc de processus de photo-fragmentation. A haute énergie, les espèces purement oxygénées ont complètement disparues. Au contraire, des ions radicalaires purement hydrocarbonés ayant un rapport H/C compris entre 0,5 et 0,7 apparaissent lorsque l'énergie augmente. On peut à nouveau invoquer des processus de fragmentation pour expliquer ce phénomène.

Afin d'obtenir des informations aussi pertinentes que possible, il apparaît désormais essentiel qu'il faille employer une énergie laser suffisamment faible afin de s'affranchir des processus de recombinaison et de fragmentation et de limiter les contributions relatives aux espèces inorganiques et au cœur de la particule de suie. Il faut néanmoins que les processus de désorption/ionisation soient efficaces. En conséquence, le choix a été d'acquérir les spectres de masse à une énergie laser maximale de $0,92 \text{ J/cm}^2$.

III.4. Conclusion

Après avoir présenté les concepts généraux associés à une analyse par LDI-FTICRMS, ce chapitre a permis de mettre en évidence toute la pertinence des outils de traitements des données post-acquisition qui ont été retenus dans le cadre de l'analyse d'un exemple de MSS. L'examen de l'influence de certains paramètres expérimentaux, et tout particulièrement les conditions de transfert des ions et de désorption/ionisation (fluence du faisceau laser) ont permis de définir les conditions opératoires optimales qui vont permettre dans le chapitre suivant de comparer différents type de fumées de cigarette.

Chapitre IV.

**Analyse des fumées
de cigarette associées
au tabagisme actif et
passif**

IV.1. Introduction	IV-117
IV.2. Etude des MSS de cigarettes différentes.....	IV-117
IV.2.1. Introduction.....	IV-117
IV.2.2. Etude des traceurs (benzène et toluène).....	IV-118
IV.2.3. Analyses des spectres de masse.....	IV-120
IV.2.3.A. Approche globale.....	IV-120
IV.2.3.B. Analyse détaillée.....	IV-123
IV.3. Etude des fumées inspirées et expirées	IV-125
IV.3.1. Introduction	IV-125
IV.3.2. Etude de la masse de particules expirées et comparaison avec les MSS.....	IV-126
IV.3.3. Analyse du spectre de masse des EXS et comparaison avec les MSS.....	IV-127
IV.3.4. Comparaison des EXS produites par deux fumeurs différents	IV-133
IV.4. Analyse des SSS et comparaison avec les MSS.....	IV-136
IV.4.1. Introduction	IV-136
IV.4.2. Approche globale	IV-136
IV.4.3. Analyse par familles	IV-140
IV.5. Conclusions	IV-143

IV.1. Introduction

L'objectif de ce chapitre est de mettre à profit la désorption/ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse FTICR pour détailler et comparer la composition chimique des fumées inhalées par le fumeur et celles émises dans l'atmosphère (ETS), c'est-à-dire les fumées auxquelles sont exposés les fumeurs passifs. Les fumées étudiées seront dans un premier temps celles relatives aux MSS provenant de deux types de cigarettes fortement différentes du point de vue de la provenance géographique (cigarette A : Europe et cigarette B : Asie), de la marque et du type (cigarette A : « light », cigarette B : normale). Pour avoir une idée plus précise des composés retenus dans le système respiratoire d'un fumeur, et donc des conséquences du tabagisme actif, les fumées expirées (EXS) d'un premier fumeur vont être analysées et comparées aux MSS. La répétition de cette étude avec un second fumeur permettra de confirmer et compléter les observations faites avec le premier. Le second intérêt de l'étude des EXS est qu'elles font partie intégrante des ETS et donc associées au tabagisme passif. Pour accéder à une vision globale des composés présents au sein de la phase particulaire des ETS, l'analyse des SSS sera également réalisée conjointement à celle des MSS.

IV.2. Etude des MSS de cigarettes différentes

IV.2.1. Introduction.

La démarche adoptée pour prélever et analyser les différents échantillons de fumées de cigarette sera systématique. Dans un premier temps, on s'intéressera lorsque cela est possible, à l'analyse quantitative de certains traceurs (benzène et toluène). On s'attachera notamment à mettre en évidence et à expliquer les différences observées. Dans un second temps, une description de l'allure générale de chaque spectre de masse obtenu par LDI-FTICRMS et plus particulièrement de la distribution relative des signaux sur l'ensemble de la gamme de masse, puis pour une masse nominale donnée, sera réalisée. L'utilisation des différents modes de représentation décrits dans le chapitre précédent cernera ensuite plus finement les ressemblances et différences entre les spectres de masse. Pour finir, une étude plus détaillée des compositions élémentaires attribuées pour chaque échantillon de particules sera réalisée.

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

IV.2.2. Etude des traceurs (benzène et toluène).

L'étude quantitative de traceurs a été réalisée par GC-FID. Les quantités moyennes de benzène et de toluène émises lors du fumage d'une cigarette B sont de 37,470 µg et 65,118 µg, respectivement. Elles sont de 26,214 µg et 36,118 µg, respectivement pour la cigarette A. Pour mémoire, les coefficients de variation sur ces traceurs sont de l'ordre de 15 % pour ces deux composés. La différence observée est par conséquent, significative et peut être la conséquence de différents facteurs.

Le premier est relatif à une aération différente au niveau du filtre de la cigarette. En effet, contrairement à la cigarette B, la cigarette A est une cigarette « light ». Le filtre est donc percé de trous sur sa circonférence ce qui augmente sa perméabilité et engendre une dilution des fumées. Si l'on prend pour hypothèse que les deux cigarettes ne diffèrent que par la ventilation du filtre, on peut « assimiler » la cigarette A au niveau dilué (+) et la cigarette B non dilué (-) du plan d'expériences réalisé au chapitre II. La moyenne des deux niveaux étant le point central C_{moy} , il est possible de recalculer l'effet de la dilution (facteur 3) pour une espèce X ainsi que la variation par rapport à C_{moy} (ΔX) qui lui est associée à l'aide des formules suivantes :

$$\Delta X(\%) = Dilution \times \frac{1}{C_{moy}} \times 100 \quad (19)$$

$$\Delta X(\%) = \frac{C(X)_+ - C(X)_-}{2} \times \frac{2}{(C(X)_+ + C(X)_-)} \times 100 \quad (20)$$

$$\Delta X(\%) = \frac{C(X)_+ - C(X)_-}{C(X)_+ + C(X)_-} \times 100 \quad (21)$$

Le pourcentage de variation entre la phase gazeuse des MSS des cigarettes B et A s'élève donc à - 17 % pour le benzène et à - 28 % pour le toluène. L'effet de la dilution a montré au chapitre II, une variation de - 30% par rapport à la masse moyenne des niveaux dilués et non dilués du benzène et du toluène (**Tableau II-10** page **II-85**). Il est important de noter que cette comparaison est possible uniquement car le volume prélevé au cours du fumage est identique pour les deux cigarettes (même procédure de prélèvement). Le pourcentage de variation de la masse de benzène ou de toluène est donc identique à celui de leur concentration dans la phase gazeuse des MSS.

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

Au regard des résultats obtenus pour le toluène pour lequel les variations observées entre les cigarettes A et B et entre les deux niveaux de ventilation de la cigarette A sont très proches, l'hypothèse d'une simple variation due aux modifications de ventilation semble valable. Les résultats obtenus pour le benzène tempèrent quelque peu cette conclusion. Le taux de variation est en effet près de deux fois plus important entre les deux niveaux de ventilation (voir chapitre II) qu'entre la cigarette « light » A et la cigarette « normale » B. En conséquence, d'autres paramètres doivent être invoqués pour rendre compte des différences observées entre ces deux types de cigarette. Un premier élément concerne le filtre lui-même. Le second chapitre (**paragraphe II.2.1** page **II-53**) a permis de définir que les filtres des cigarettes B sont à la fois moins longs et moins denses. Il est donc envisageable que les fibres de la cigarette A soient plus resserrées ce qui rend la filtration et l'adsorption d'autant plus efficace. Par ailleurs, la nature du papier est sans nul doute différente et sa perméabilité différente de celui de la cigarette A. L'ensemble de ces paramètres concourent à ce que le niveau de ventilation et donc de dilution des fumées de la cigarette B puisse être considérée comme intermédiaire entre celui de la cigarette A et celui de la cigarette A étanchéifiée. Des essais complémentaires visant à déterminer la perméabilité d'un filtre de cigarette A « normale » et la quantité de benzène et de toluène générée à partir d'une cigarette B, dont le filtre a été étanchéifié, pourraient permettre de confirmer ces interprétations et préciser les résultats obtenus. Il demeure néanmoins que les comportements adoptés par les deux traceurs retenus diffèrent significativement d'une cigarette à l'autre. Une explication rationnelle peut permettre d'apporter une réponse appropriée (elle peut d'ailleurs à elle seule expliquer les différences observées entre cigarette A et B). Il est important à ce niveau de rappeler que le tabac présent dans une cigarette est un assemblage de différents tabac (Burley, Virginie, Oriental, Maryland, tabac de remplissage ou expansé). Adam *et al*^{126,127} ont clairement démontré que le fumage de différents tabacs conduit à la production de quantités significativement différentes de toluène et de benzène. Les tabacs Virginie et Oriental ont en effet la particularité de produire près de 25 à 30 % de plus de ces deux composés que les tabacs Burley et Maryland. Par ailleurs, les quantités de particules produites par ces quatre types de tabac sont également significativement différentes.

126 Adam, T.; Mitschke, S.; Baker, R. R. *Investigation of Tobacco Pyrolysis Gases and Puff-by-puff Resolved Cigarette Smoke by Single Photon Ionisation (SPI) - Time-of-flight Mass Spectrometry (TOFMS)*; Verband der Cigarettenindustrie: Bonn, ALLEMAGNE, 2009.

127 Adam, T.; Mitschke, S.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R. *Anal. Chimica Acta* **2006**, 572, 219-229.

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

IV.2.3. Analyses des spectres de masse

IV.2.3.A. Approche globale

Les spectres de masse obtenus dans l'étude des cigarettes A et B en mode de détection positif sont présentés sur la **Figure IV-1**. Des espèces sont observées sur une gamme de rapport m/z comprise entre 150 et 450.

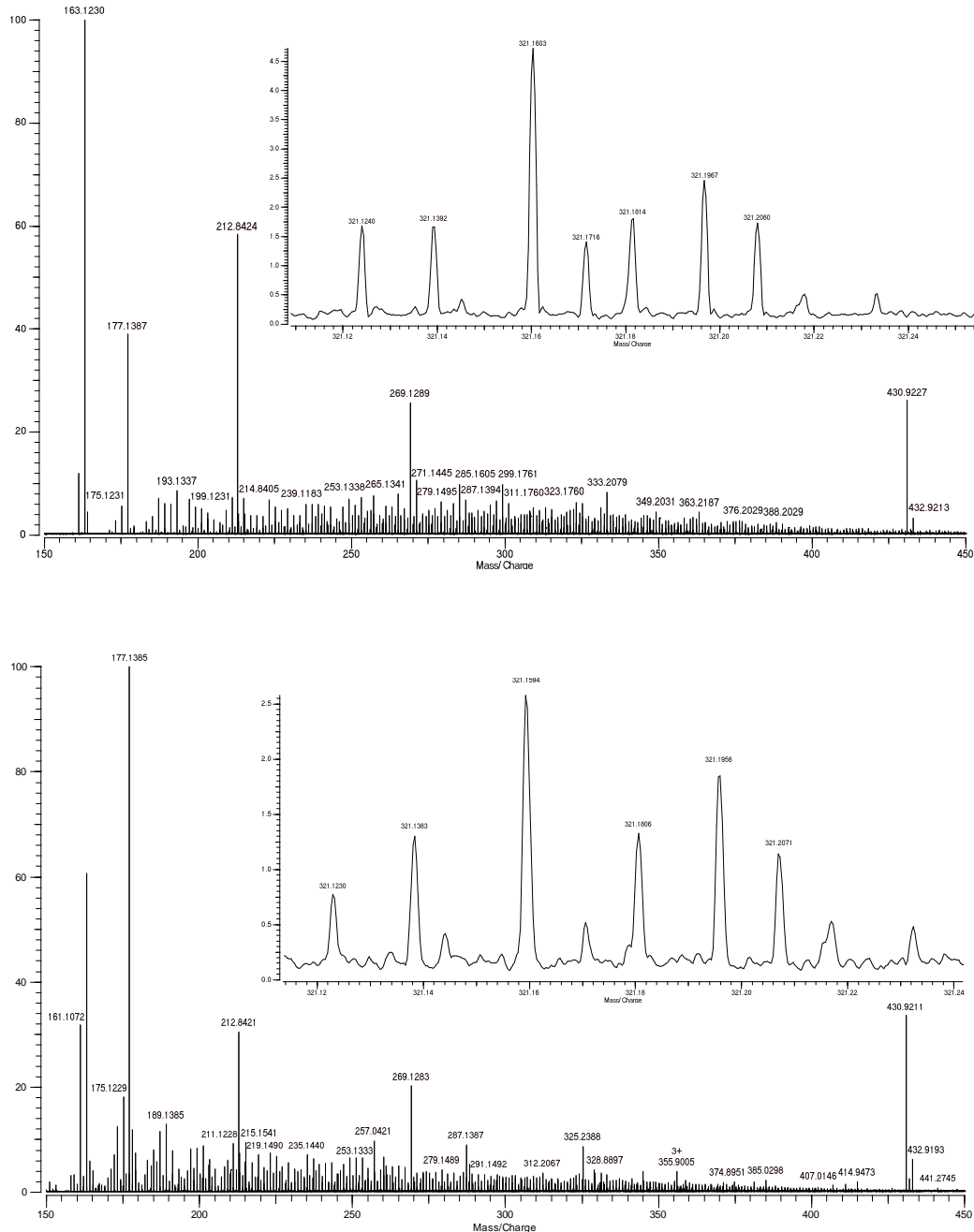


Figure IV-1 : Spectre de masse des MSS de la cigarette A (haut) et B (bas) en mode de détection positif.

L'allure générale des deux spectres obtenus est très similaire. En effet, les espèces majoritaires observées ici sont identiques à celles des MSS de la cigarette A. Il s'agit de l'ion

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

protoné de la nicotine (m/z 163,1229), de l'ion $C_{11}H_{17}N_2^+$ qui peut être relatif à un dérivé méthylé de la nicotine, d'espèces associées au sulfate de potassium comme $K_3SO_4^+$ à m/z 212,8423 ou l'espèce hybride organique/inorganique $[K_3SO_4, C_9H_{14}O_6]^+$ à m/z 430,92134. S'ajoute à ces espèces l'ion $C_{16}H_{17}N_2O_2^+$ à m/z 269,12845. Les autres signaux possèdent une intensité relative inférieure à 20 %. Un agrandissement du spectre de masse de la cigarette B pour la masse nominale 321 est donné en cartouche et montre que la distribution des espèces pour une masse nominale donnée est très proche de celle observée pour la cigarette A. De la même manière, une distribution continue des signaux est observée en mode de détection négatif pour les deux spectres entre m/z 150 et 450. Deux signaux émergents sur le spectre de masse obtenu pour les deux types de cigarette étudiés à 177,0193 et 191,0352 qui correspondent respectivement aux espèces $C_9H_5O_4^-$ et $C_{10}H_7O_4^-$.

La **Figure IV-2** révèle qu'une grande partie des compositions élémentaires assignées en mode de détection positif sont présentes dans les deux types de fumées. Les ions spécifiques à la cigarette B ont une DBE moyenne s'élevant à 7,24 contre 12,94 pour les spécifiques à la cigarette A.

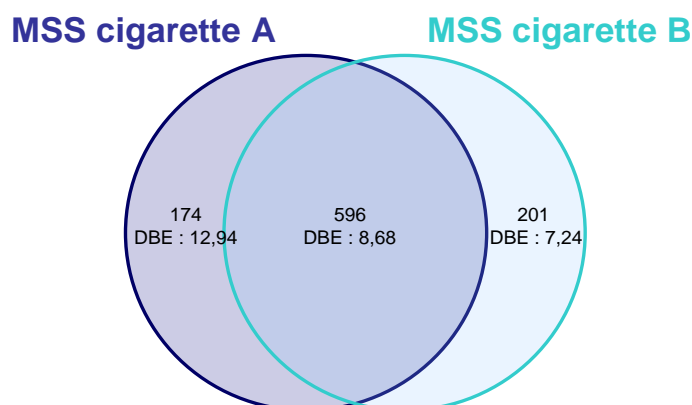


Figure IV-2 : Diagramme de Venn du nombre d'ions positifs communs et spécifiques pour les cigarettes A et B ainsi que les DBE moyennes de chaque zone (hors contribution ^{13}C).

La **Figure IV-3** reporte de manière simultanée, pour les cigarettes A et B, dans les deux modes de détection du bas vers le haut, les spectres de masse, les cartes de Kendrick, ainsi que les indices d'aromaticité des composés observés et les cartes de Van Krevelen O/C–H/C et N/C–H/C. De manière très générale, on peut d'ores et déjà noter une intensité relative plus importante sur les spectres des MSS de la cigarette A, tout particulièrement en mode de détection négatif.

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

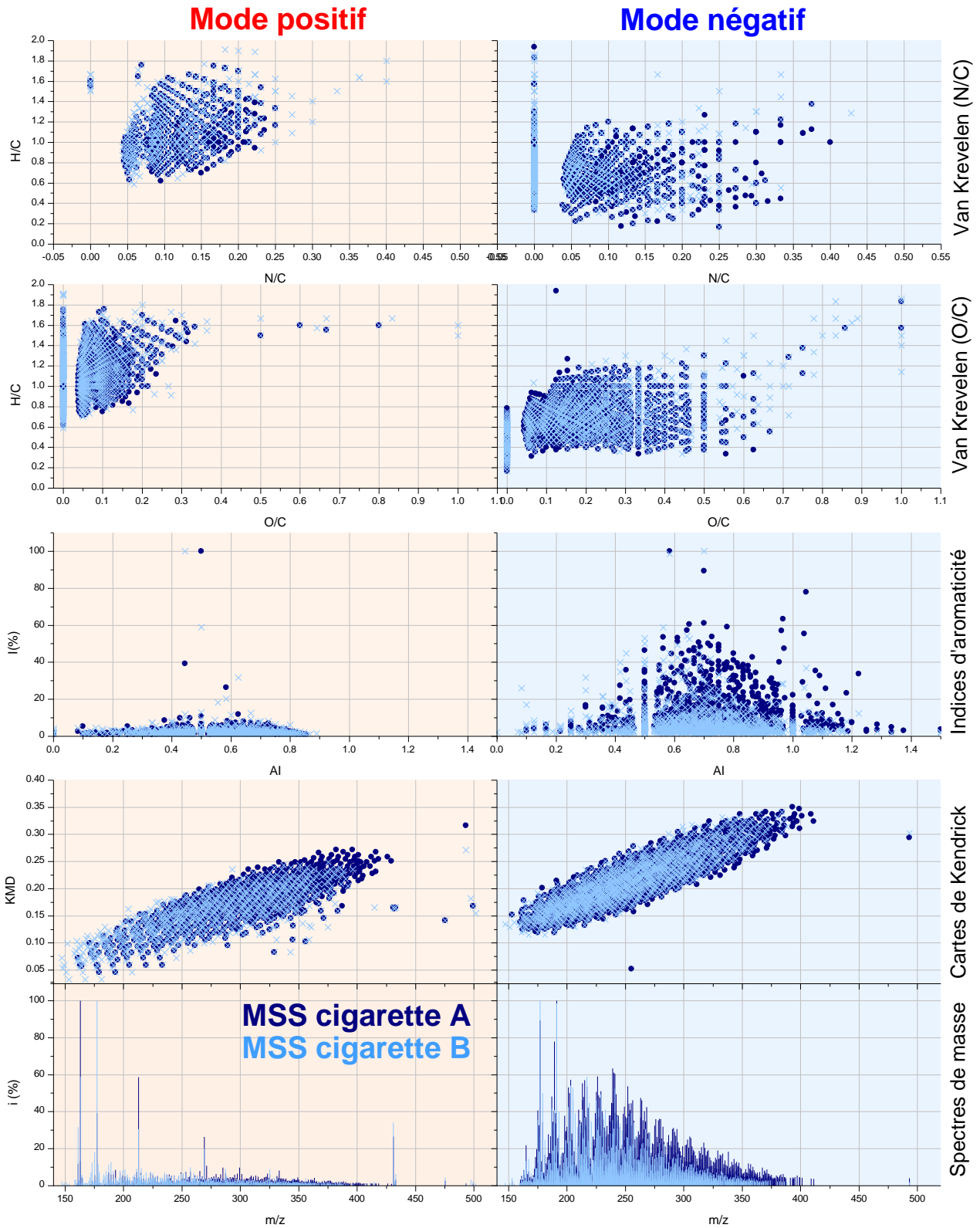


Figure IV-3 : Analyse des spectres de masse de MSS pour la cigarette A (bleu foncé) et B (bleu clair)

Qu'il s'agisse des spectres de masse obtenus en mode de détection positif ou négatif, de légères différences apparaissent pour des ions à des rapports m/z de l'ordre de 400 sur les

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

cartes de Kendrick. Pour les MSS de la cigarette A, des composés « lourds » sont en effet observés dans cette région du spectre de masse. Cependant, pour les deux types de MSS, les valeurs de défaut à la masse de Kendrick ou KMD sont sensiblement identiques et s'étendent de 0,02 à 0,27 en mode positif et de 0,13 à 0,35 en mode négatif. Par conséquent, les composés présents dans les MSS de ces deux types de cigarettes sont comparables du point de vue du nombre d'insaturations et d'hétéroatomes qu'ils contiennent. Ceci est confirmé par la lecture des diagrammes d'indice d'aromaticité (AI). En mode positif, la répartition des AI pour les cigarettes A et B est globalement identique. La distribution obtenue pour les espèces détectées sur les MSS des deux cigarettes est, en effet centrée sur un AI de 0,55. Ils montrent néanmoins que les espèces associées aux composés aromatiques condensés observés en mode de détection négatif sont légèrement plus intenses pour la cigarette A. Dans ce cas, 63 % des ions attribués ont un AI supérieur à 0,67, alors que cette proportion tombe à 53 % pour la cigarette B. De manière conjointe, 14 % des signaux sont attribués à des molécules aliphatiques ou oléfiniques pour la cigarette B en ion négatif contre 7 % pour la cigarette A.

Les diagrammes de Van Krevelen présentent quelque soit leur nature (H/C–O/C ou H/C–N/C) ou le mode de détection, une large superposition des nuages de points relatifs aux différents composés présents dans les différents échantillons étudiés. Il est ainsi raisonnable de penser que les espèces présentes sont chimiquement très proches pour une valeur donnée de DBE.

IV.2.3.B. Analyse détaillée

Une analyse plus détaillée des compositions élémentaires attribuées va tenter dans la mesure du possible d'affiner l'analyse et la comparaison effectuée dans les paragraphes précédents des deux types de MSS. Pour cela, l'examen des spectres de masse va reposer sur l'étude de l'importance relative d'une famille de composés hydrocarbonés déterminée, ces composés possédant dans leur structure, un même nombre d'atomes d'oxygène et d'azote. La **Figure IV-4** présente l'intensité normalisée au courant d'ion total (ou TIC), de chaque famille de composés en fonction du nombre d'atomes d'azote et d'oxygène.

De manière globale, les résultats obtenus présentent un grand nombre de similarités. Tant en positif qu'en négatif, les familles de composés observées sont identiques, de type $C_xH_yN_{1-4}O_{0-4}$ pour le mode positif et $C_xH_yN_{0-5}O_{0-5}$ en mode négatif. Cependant certaines différences apparaissent nettement notamment du point de vue des intensités relatives de certaines familles. En premier lieu, les composés de type $C_xH_yN_2O_z^+$ sont plus oxygénés dans

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

les MSS de la cigarette A. Pour s'en convaincre, on peut par exemple considérer le rapport des intensités des familles $C_xH_yN_2^+$ et $C_xH_yN_2O_2^+$. Pour la cigarette A, ce rapport s'élève à 1,4 alors qu'il est de 2,3 pour la cigarette B. De manière générale, le courant d'ions mesuré pour les familles oxygénées est, en mode de détection positif, de l'ordre de 60 % pour les MSS de la cigarette A alors qu'il n'atteint que 50 % pour la cigarette B. Par ailleurs, une différence remarquable entre les deux types de MSS est la plus grande abondance d'espèces moins azotées pour les MSS de la cigarette B. On peut s'attacher à ce niveau à comparer, par exemple pour les ions positifs, les composés possédant un ou deux atomes d'azote et pour les négatifs ceux qui en sont dépourvus à ceux qui en contiennent au moins un.

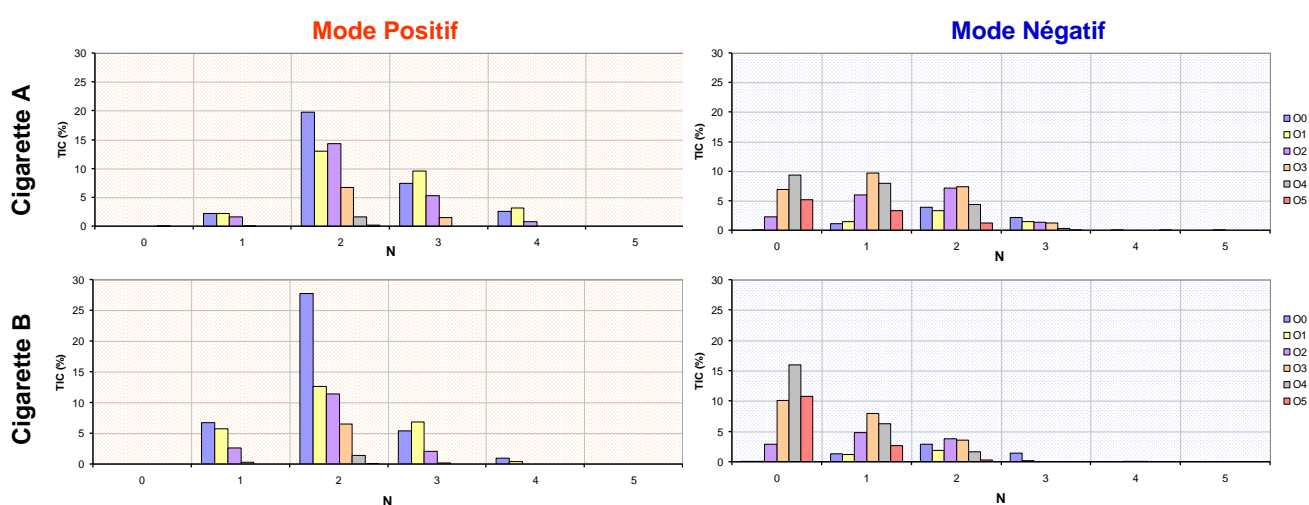


Figure IV-4 : Intensité normalisée des différentes classe de composés observés dans l'étude de la matière particulaire des MSS des cigarettes A et B.

Une autre différence observée est relative à la DBE moyenne pondérée des intensités des ions détectés. Celle-ci est plus faible pour la cigarette B : 8,1 et 10 pour le mode de détection positif et négatif, respectivement, que pour la cigarette A : 9,4 et 10,6. La plus grande abondance de composés possédant des systèmes conjugués plus étendus dans les MSS dans le cas de la cigarette européenne (cigarette A) est en mesure d'expliquer ces différences. L'examen de la distribution relative des AI de la **Figure IV-3**, principalement en mode de détection négatif, tend à confirmer ces résultats et cette analyse.

Toutes ces observations permettent de considérer que le fumage de la cigarette B conduit à la production de composés à la fois moins insaturés, moins oxygénés et, dans une certaine mesure, moins azotés sur la surface particulaire que dans le cadre de la cigarette A.

Outre la différence de composition de l'assemblage de tabac des deux cigarettes, les propriétés morphologiques de la cigarette peuvent rendre compte, d'une partie tout au moins,

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

des différences observées. La ventilation ou l'effet de dilution relatif à la perforation du filtre de la cigarette « light A » ainsi que la plus forte densité du filtre (chapitre II) sont à même d'expliquer qu'une plus grande perte de charge a lieu lors des bouffées effectuées au cours de la procédure de fumage/prélèvement de la cigarette A. La quantité d'oxygène disponible au niveau du foyer de combustion est par conséquent plus forte pour la cigarette B. La combustion du tabac peut donc être considérée comme « plus complète » dans ce cas et se fait donc à plus haute température. La production de composés de grandes tailles présents sur les particules des MSS est donc limitée au profit des espèces gazeuses (oxydes de carbone ou d'azote, composés organiques volatils,...).

A ce stade de l'étude, il a été possible d'observer des dissemblances entre les composés présents dans les MSS de deux cigarettes de nature différentes. Celles-ci ont pu être reliées à la fois au type de cigarette, à la composition du tabac, ou encore à la morphologie de la cigarette. Cependant, leur mise en évidence a nécessité de réaliser une analyse particulièrement poussée des résultats obtenus. Une grande partie des ions détectés sont communs aux deux cigarettes (596 ions identiques, pour ~750 à 800 détectés par spectre, **Figure IV-2**)

Après avoir examiné le premier type de fumées de cigarette que sont les MSS, nous allons poursuivre l'étude en examinant les fumées expirées ou EXS. La comparaison des MSS et EXS sera en mesure de renseigner, s'il y a lieu, sur la nature des composés qui sont retenus dans le système respiratoire des fumeurs actifs mais aussi de déterminer quels sont les composés présents au sein des fumées exhalées. Ces dernières, il est nécessaire de le rappeler ici, sont parties prenantes des fumées inhalées par fumeur passif.

IV.3. Etude des fumées inspirées et expirées

IV.3.1. Introduction

Dans le cadre de ce travail, s'attachant à caractériser les particules auxquelles les fumeurs passifs et actifs sont exposés, l'étude de la fumée expirée par un fumeur lors du fumage d'une cigarette, ainsi que sa comparaison à celle des fumées inhalées, ont été menées. La démarche analytique entreprise ici est identique à celle employée au paragraphe précédent. Elle permet de décrire les fumées après leur passage dans le système respiratoire et ainsi d'évaluer les différences entre EXS et MSS pour avancer quelques hypothèses quant à la

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

réention préférentielle de certains composés. Cette étude permet également d'appréhender la part des fumées expirées dans la composition de la fumée environnementale (ETS) à laquelle les fumeurs passifs sont exposés. Dans un premier temps, la composition des EXS et sa comparaison aux MSS seront présentées. Afin de confirmer les résultats obtenus dans l'analyse des EXS et d'étudier la variabilité associée au facteur « individu » de la phase particulière de ces fumées, on comparera les EXS produites par deux fumeurs (fumeur F et fumeur V) consommant le même type de cigarette.

IV.3.2. Etude de la masse de particules expirées et comparaison avec les MSS

La production des EXS est effectuée par le fumeur F en consommant une cigarette Européenne de type « light » (cigarette A). La mesure de la masse de particules de MSS et d'EXS est réalisée à l'aide de la procédure décrite dans le chapitre II. La masse obtenue est ensuite amenée au même volume de fumée ou à une cigarette afin de pouvoir comparer les résultats. Ainsi, la concentration en matière particulaire dans les fumées inspirées s'élève à 22,5 mg/L (5,52 mg/cig) et celle des fumées expirées est de 0,17 mg/L (1,35 mg/cig) ce qui montre une nette perte de masse.

Deux explications peuvent être à l'origine de cette différence. La plus évidente et la plus importante est la déposition d'une partie des particules au sein de l'appareil respiratoire du fumeur. Il a en effet été rappelé dans le premier chapitre que près de la moitié des particules inhalées se déposent. Une seconde explication est directement associée au comportement du fumeur. Il faut rappeler ici que la procédure de fumage employée (Norme ISO 4387) avec la machine à fumer est un cas idéal et ne reproduit que partiellement la réalité. Les conditions d'aspiration d'un fumeur (débit, volume inspiré...) étant en effet plus variables et relativement différentes de celles de la machine à fumer, la quantité de MSS générée par le fumeur F peut en être différente. Il est reconnu que le débit d'aspiration d'un fumeur est plus élevé (~2,2 L/min)¹²⁸ que le débit imposé par la norme de prélèvement (1,050 L/min). Cette plus forte aspiration du fumeur amène plus d'oxygène au niveau du foyer incandescent et favorise les processus de combustion au détriment des processus pyrolytiques qui sont à l'origine de la formation des suies, cœur des particules de fumée de cigarette. Par ailleurs, un débit plus faible ainsi qu'une quantité de matière particulaire plus importante (conditions de production des MSS avec la machine à fumer) sont favorables aux processus

128 Zhang, Z.; Kleinstreuer, C.; Hyun, S. *J. Aerosol Sci.* **2012**, *46*, 34-52.

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

de croissance des particules par coagulation ou adsorption. Etant plus grosses, l'efficacité de leur rétention sur le filtre de la cigarette est plus importante que pour celles produites par le fumeur. Cependant, cette évolution ne peut avoir qu'un effet mineur sur la masse de particules collectées, la fraction massique des particules les plus petites est en effet le plus souvent négligeable.

Finalement la différence entre la masse de particules « théoriquement » inhalées (mesurée à l'aide de la machine à fumée) et celle exhalée est principalement relative à une déposition des MSS dans le système respiratoire et dans une moindre mesure à une modification de la production de MSS dans les conditions réelles de fumage.

IV.3.3. Analyse du spectre de masse des EXS et comparaison avec les MSS.

La **Figure IV-5** présente le spectre de masse obtenu dans l'étude par LDI-FTICRMS des particules d'EXS du fumeur F en mode de détection positif.

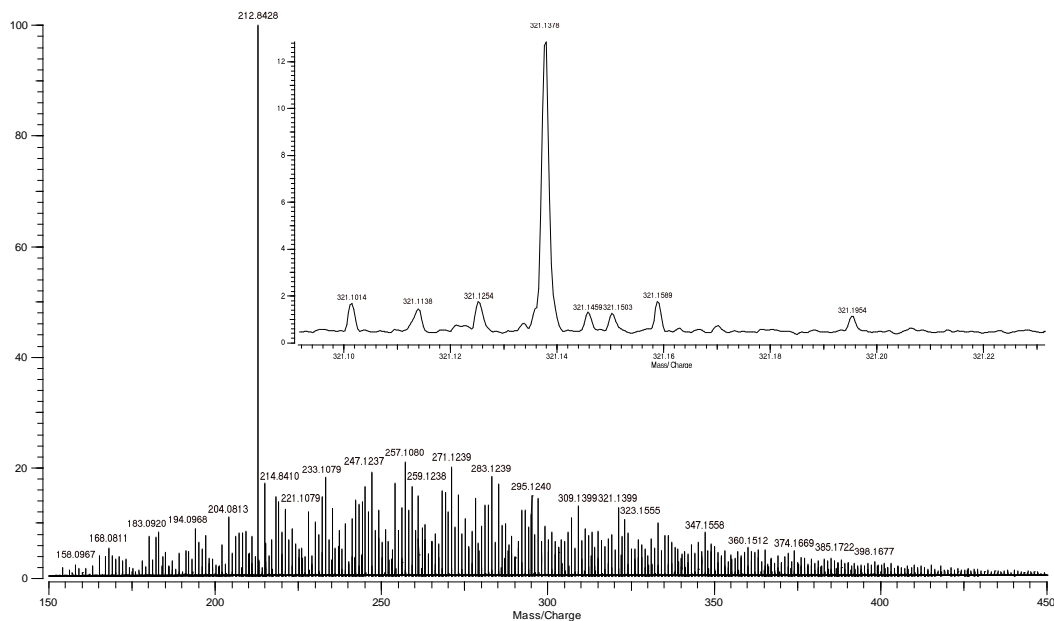


Figure IV-5 : Spectre de masse des EXS du fumeur F en mode positif

Une caractéristique peut déjà être observée à ce stade. L'ion $K_3SO_4^+$ associé au sulfate de potassium est l'ion majoritaire. A la différence des MSS, les ions $C_xH_yN_zO_w^+$ sont plus intenses et se répartissent de manière régulière sur l'ensemble de la gamme de rapport m/z considérée. Il est également remarquable de noter la faible intensité de l'ion protoné de la nicotine qui ne possède plus qu'une abondance relative de 2,3 % alors qu'il s'agissait de la principale contribution au niveau des MSS. On peut ainsi raisonnablement penser qu'une

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

fraction importante de ce composé est retenue par l'organisme. L'examen des espèces possédant une masse nominale de 321 montre également des différences significatives avec ce qui a pu être observé pour les MSS. Majoritaire pour les MSS, l'ion $C_{20}H_{21}N_2O_2^+$ à m/z 321,1594 ($I_r = 4,7\%$; $DBE = 11,5$) ne présente plus qu'une intensité relative de 1,8 % pour les EXS dont le spectre est désormais dominé par l'ion $C_{23}H_{17}N_2^+$ à m/z 321,1385 ($I_r = 13,4\%$; $DBE = 16,5$). L'intensité relative de cette espèce n'est que de 1,7 % pour les MSS. Ces modifications apparaissent de manière quasi systématique pour chaque masse nominale avec une prévalence des composés à plus forte valeur de DBE pour les EXS. Il apparaît ainsi que globalement la composition moyenne des particules a été profondément modifiée au cours de leur séjour dans l'organisme. Il est raisonnable de penser à cette étape de l'analyse qu'une partie des molécules ait pu être sélectivement retenues par le milieu physiologique.

La **Figure IV-6** montre dans ce cas une très forte spécificité des EXS. En effet, la comparaison des signaux attribuée montre que 901 signaux sont attribués à des ions propres aux EXS en mode de détection positif. La DBE moyenne calculé pour ces ions s'élève à 16,04 suggérant ainsi une forte aromaticité des EXS. La zone commune contient 410 pics avec une DBE moyenne plus faible alors que les MSS ont 360 pics spécifiques possédant une DBE moyenne encore inférieure.

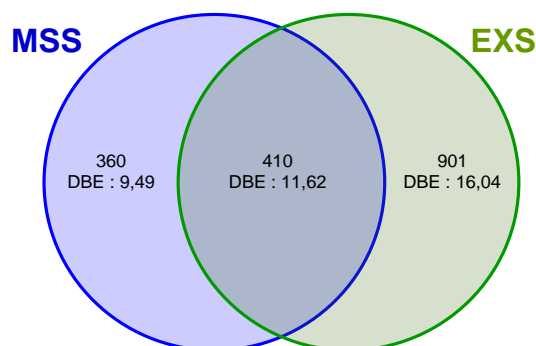


Figure IV-6 : Diagramme de Venn du nombre d'ions positifs communs et spécifiques pour les MSS et EXS ainsi que des DBE moyennes de chaque zone (hors contribution ^{13}C).

Afin d'affiner cette analyse, la **Figure IV-7** présente pour les MSS et les EXS de la cigarette A, dans les deux modes de détection, du bas vers le haut, les spectres de masse, les cartes de Kendrick, ainsi que les indices d'aromaticité des composés observés et les cartes de Van Krevelen $H/C-O/C$ et $H/C-N/C$. Dans les deux modes de détection, les spectres de masse des EXS présente une importante périodicité. Des massifs de pics séparés par un incrément de masse de 12 ou 14 Da sont clairement observables. Seul le mode de détection négatif pour les MSS montre ce type de périodicité. Cependant pour les EXS en mode de détection négatif, on

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

observe un effet « pair/impair ». Aux cotés des périodicités déjà mises en évidence en apparaissent des secondes pour lesquelles l'incrément de masse est de 24 ou 26 (motif C_2 ou C_2H_2). Cela conduit à ce que les espèces possédant un nombre impair d'atomes de carbone voient leurs intensités relatives largement supérieures à celles des espèces qui les entourent et qui présentent un nombre pair d'atomes de carbone.

La comparaison des cartes de Kendrick obtenues pour les EXS et les MSS, indique un comportement qui est fonction du mode de détection employé. En mode de détection négatif, très peu de différences apparaissent nettement. Les valeurs de défauts de masse de Kendrick (KMD) sont, pour une gamme de rapport m/z donnée, très similaires. On observe néanmoins pour les EXS des composés plus lourds. Au-delà de ce comportement qui est également observé en mode de détection positif, des différences significatives sont observés entre les cartes de Kendrick des MSS et des EXS dans ce mode de détection. Des ions positifs possédant des KMD plus important pour une gamme de masse donnée sont en effet observés pour les EXS. Ce comportement est à rapprocher de l'évolution des signaux à la masse nominale 321 sur la **Figure IV-5**. La valeur de KMD est proportionnelle à la valeur de DBE. Le comportement observé met ainsi clairement en évidence la présence de composés plus insaturés dans les EXS.

Les diagrammes d'indices d'aromaticité confirment cette analyse, cette fois dans les deux modes de détection. Pour les EXS, les espèces les plus intenses sont relatives à des composés plus aromatiques et plus condensés. Les indices moyens pondérés par les intensités relatives sont en effet de 0,69 (ions +) et 0,82 (ions -) pour les EXS et de 0,55 (ions +) et 0,72 (ions -) pour les MSS. Pour affiner cette analyse, on peut considérer par exemple le mode de détection positif. Pour les EXS, 60% des ions ont un indice d'aromaticité supérieur à 0,67 (composés aromatiques condensés) alors qu'ils ne représentent que 21% des espèces présentes dans les MSS.

L'examen des cartes de Van Krevelen confirme également cette plus forte contribution des composés insaturés dans les EXS vis-à-vis des MSS. Pour les deux modes de détection et pour les deux types de carte, il est remarquable que les points relatifs aux composés des MSS possèdent des rapports H/C plus important que ce qui a pu être observé pour les EXS. Ces cartes apportent également un certain nombre d'informations supplémentaires. La comparaison des cartes H/C-O/C dans les deux modes de détection laisse à penser que les espèces sont globalement moins oxygénées pour les EXS que pour les MSS. Pour ces dernières, des composés présentant des valeurs élevées O/C sont mis en évidence, ils

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

possèdent classiquement des rapports H/C élevés et sont donc plutôt de type aliphatiques, oléfiniques et/ou cycliques. L'analyse des cartes H/C–N/C est plus délicate. En mode de détection négatif peu de différences existent. Par contre en mode de détection positif, le barycentre des points se trouve à des valeurs H/C et N/C plus faibles pour les EXS que pour les MSS. On peut ainsi considérer que les ions positifs observés sont plus condensés et moins azotés pour les EXS. L'analyse par famille va permettre d'affiner ces premières conclusions.

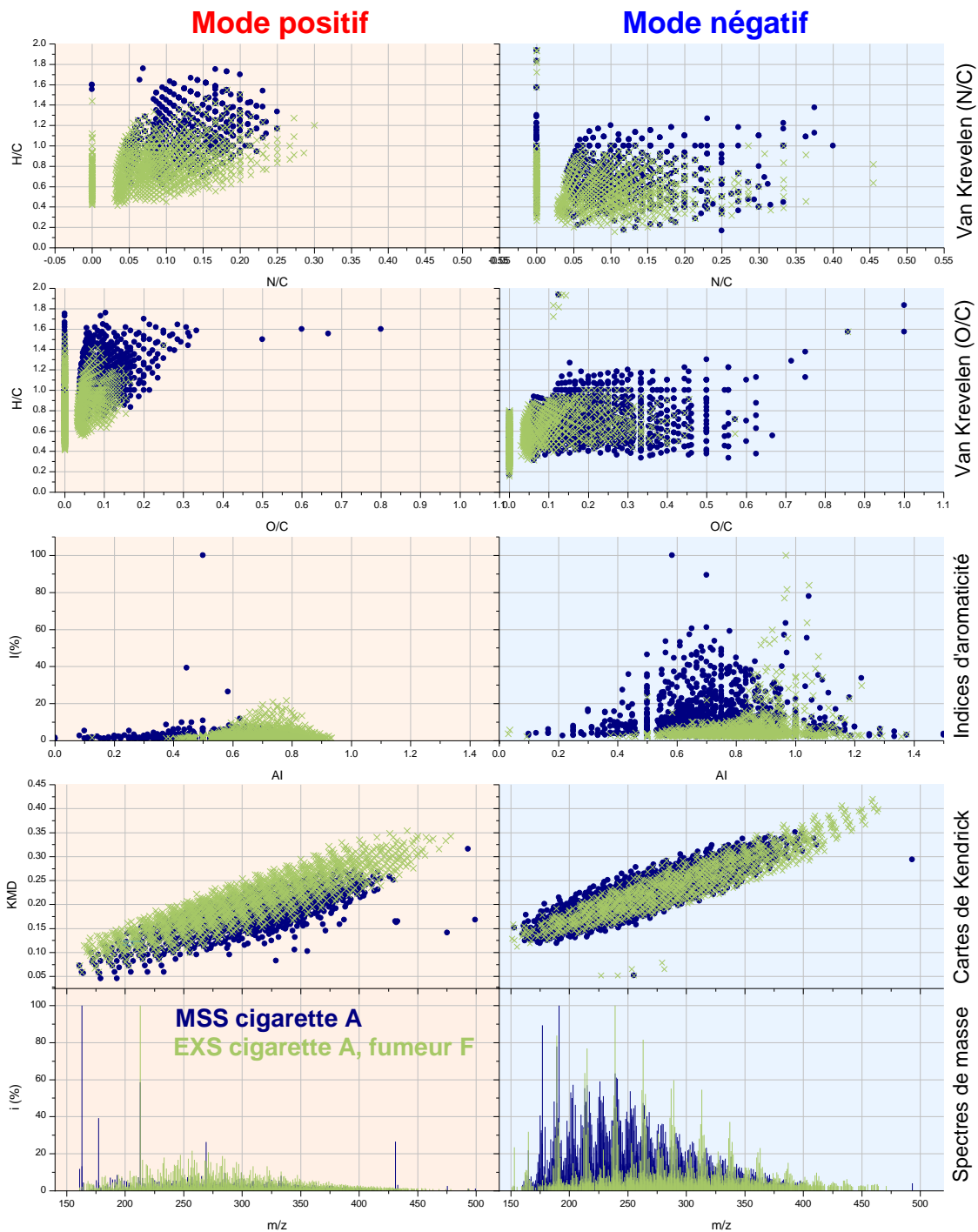


Figure IV-7 : Analyse globale des spectres de masse de MSS (bleu) EXS (vert)

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

A ce titre la **Figure IV-8** présente la distribution relative des différentes familles de composés en fonction du nombre d'atomes d'azote et d'oxygène. Une plus faible teneur des espèces oxygénées associées aux EXS est nettement visible dans les deux modes de détection. En mode de détection positif par exemple, seules 37 % des molécules détectées pour les EXS contiennent au moins un atome d'oxygène. Cela est près de deux fois plus faible que ce qui a pu être observé pour les MSS de la cigarette A. A l'inverse, les composés purement azotés voient leur intensité relative presque doublée, passant de 28% pour les MSS à 51% pour les EXS.

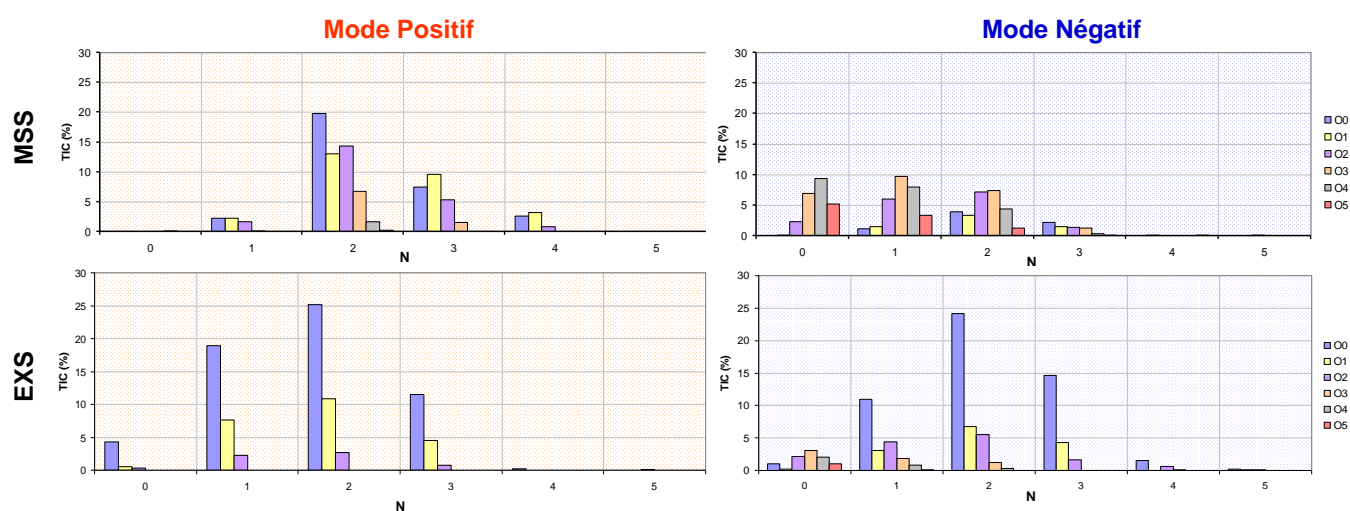


Figure IV-8 : Intensité normalisée des différentes classes de composés observés dans l'étude de la matière particulaire des MSS et des EXS

Finalement la combinaison de ces analyses tend à prouver que les composés présents dans les MSS sont globalement plus saturés et contiennent plus d'hétéroatomes notamment d'atomes d'oxygène que les fumées expirées. Les composés présents peuvent dans ce cadre être associés à des espèces plus polaires que celles que l'on trouve au sein des EXS. Par conséquent, le passage des particules de fumées de cigarette dans l'organisme a pour conséquence de modifier significativement leur composition globale. Plutôt polaires sur les MSS, les composés sont majoritairement peu polaires ou apolaires sur les EXS.

La **Figure IV-8** illustre bien ce propos. Alors qu'aucun composé de type C_xH_y n'est observé sur le spectre de masse en ion positif des MSS, leur contribution atteint près de 5 % sur les EXS du fumeur F. Ces composés sont aisément attribués à des HAP ou à des alkyls HAP. En effet, ils présentent la particularité de conduire à la formation majoritaire de radical cation et de posséder des AI relativement élevés. Ces composés, rappelons-le, possèdent un caractère polaire faible. Le milieu physiologique est par nature un milieu très polaire. Il est

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

associé en particulier à des fluides corporels de nature aqueuse (sang, mucus, lymphe,...), à des sels dissous (sulfates, phosphates, chlorures, ...), qui permettent de tamponner le pH de ce milieu mais aussi à des protéines, des peptides, des sucres, etc... Les interactions possibles entre les composés polaires des MSS et le milieu physiologique sont donc nombreuses et importantes. Par conséquent, à la déposition d'une partie des particules des MSS dans le système respiratoire peut s'ajouter des phénomènes de transfert et/ou de désorption d'espèces présentes sur les particules. Ces phénomènes engagent principalement les composés les plus polaires des MSS et peuvent être favorisés par des effets mécaniques due aux turbulences du flux de fumées lors de leur passage dans l'organisme (changement de direction) et par la température du milieu physiologique. Ainsi, la phase particulaire se voit amputée de la fraction la plus polaire des composés qui la constituent. Ces résultats sont appuyés par l'étude de Moldoveanu S. C. *et al.* qui montre que le pourcentage de rétention de certains HAPs augmente avec la diminution du coefficient de partage octanol/eau¹²⁹. En d'autres termes, les HAPs les plus solubles dans l'eau sont retenus préférentiellement.

Il est à noter que ces différences de compositions des particules induisent une modification des processus chimiques et physico-chimiques lors de leur analyse par LDI-FTICRMS. La réduction de la concentration des composés les plus polaires permet de limiter les compétitions à l'ionisation principalement associés à des phénomènes de protonation. Polarité et affinité protonique en phase gazeuse sont fortement liées, la diminution de la teneur en composés possédant une forte affinité protonique comme la nicotine (AP = 963 kJ/mol) permet à des composés moins polaires d'être plus efficacement ionisés comme par exemple la pyridine (AP = 936 kJ/mol). La forte proportion d'espèces déprotonées en mode de détection négatif pour les EXS (94,7 %) est indicatrice d'importantes quantités de protons disponibles pour concourir à l'ionisation en mode de détection positif. Par ailleurs, la désorption des espèces polaires présentes sans doute essentiellement en surface des particules conduit à modifier de façon notable les propriétés d'absorption des particules en permettant notamment aux photons d'interagir et donc d'ioniser des espèces moins polaires plus proche du cœur des particules.

Pour finir, les sites d'adsorption libérés par la désorption de certaines espèces dans le milieu physiologique peuvent être considérés comme libres et disponibles. Dans la phase gazeuse, un grand nombre de composés sont présents et notamment des composés

129 Moldoveanu, S. C.; Coleman, W.; Wilkins, J. M. *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Exhaled Cigarette Smoke*; Verband der Cigarettenindustrie: Bonn, ALLEMAGNE, 2008.

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

aromatiques. Apolaires ou peu polaires, ils présentent très peu d'interactions avec le milieu physiologique mais présentent de fortes affinités avec le cœur apolaire des particules (suies). La surface des particules se trouve alors appauvrie en composés polaires et enrichie en composés peu polaires (composés aromatiques et hétéro-aromatique).

Après avoir identifié et expliqué ces différences de composition entre les MSS et la fumée exhalée par un fumeur, il est important d'étudier dans quelle mesure la composition des EXS est en mesure de varier d'un fumeur à l'autre.

IV.3.4. Comparaison des EXS produites par deux fumeurs différents

Afin de valider les conclusions établies au paragraphe précédent, il est important que soit évaluée la variabilité de la composition des EXS entre fumeurs. Pour cela, un second volontaire, le fumeur V a été mis à contribution. La procédure de prélèvement des EXS ainsi que la nature de la cigarette fumée (cigarette Européenne « light ») sont identiques.

Une légère différence peut être observée quant à la masse de particules par litre de fumée expirée ou par cigarette entre les deux fumeurs. Les EXS du fumeur F contiennent 0,17 mg/L (1,35 mg/cig) de particules alors que celle du fumeur V présente des teneurs de l'ordre de 0.35 mg/L (2.73 mg/cig). Une explication possible peut correspondre à une différence morphologique entre les deux fumeurs, ce qui peut entraîner des différences de rétention au sein de l'organisme. Par ailleurs, le comportement du fumeur, et notamment la dilution des fumées par le nez, peut être à l'origine de la différence de quantité de matière particulaire expirée. En revanche, le débit des bouffées et leur durée n'ont qu'une d'influence limitée sur la teneur des particules en différents traceurs (chapitre II). L'extrapolation raisonnable de cette conclusion à la composition chimique de la matière particulaire des EXS des fumeurs F et V permet d'aboutir à un niveau satisfaisant de confiance dans la comparaison qui va être menée.

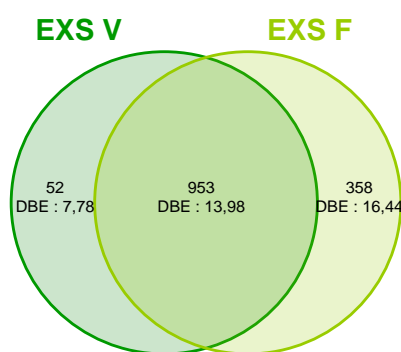


Figure IV-9 : Diagramme de Venn des ions positifs communs et spécifiques aux EXS de deux fumeurs différents (hors contributions ^{13}C)

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

Parmi les 1120 signaux (1490 pour le fumeur F) observés en mode de détection positif et les 990 ions négatifs (1300 pour le fumeur F) détectés dans l'analyse des EXS du fumeur V, 95 % (ion +) et 75 % (ion -) l'on déjà été dans les EXS du fumeur F. En effet, 953 compositions élémentaires attribuées en mode de détection positif sont communes aux EXS V et F (hors contributions ^{13}C) comme le montre la **Figure IV-9**.

Une différence importante est également relative au courant d'ion total obtenu, près de 2 à 3 fois plus important dans l'analyse des EXS du volontaire F. Les histogrammes de la **Figure IV-10** reportent l'intensité normalisée au TIC des différentes familles de composés en fonction du nombre d'atomes d'azote et d'oxygène. Les différences observées sont très limitées dans les deux modes de détection. Cette analyse est par ailleurs confirmée sur la **Figure IV-11** qui reporte les espèces spécifiques à chaque fumeur dans les deux modes de détection ainsi que les cartes de Van Krevelen H/C – O/C. Il apparaît clairement que les ions spécifiques au fumeur F sont principalement de faibles intensités (<2% en positif et <5% en négatif). Il apparaît cependant à la vue de ces différentes figures, qu'une partie des composés spécifiques au fumeur V sont plus oxygénés et plus saturés que ceux observés dans l'examen des EXS du fumeur F en mode de détection positif. Une explication plausible de la présence plus importante de ces composés, qui peuvent être attribués à des composés relativement polaires, peut être liée au comportement spécifique de chacun des deux fumeurs. Le temps de résidence dans leurs systèmes respiratoires est probablement différent. Par conséquent, l'avancement des processus de désorption des molécules les plus polaires comme cela a pu être établi dans le paragraphe précédent, est sans aucun doute différent. La présence d'espèces spécifiques plus polaires dans les EXS du fumeur V semble indiquer un temps de résidence plus court des fumées de cigarette dans ses poumons.

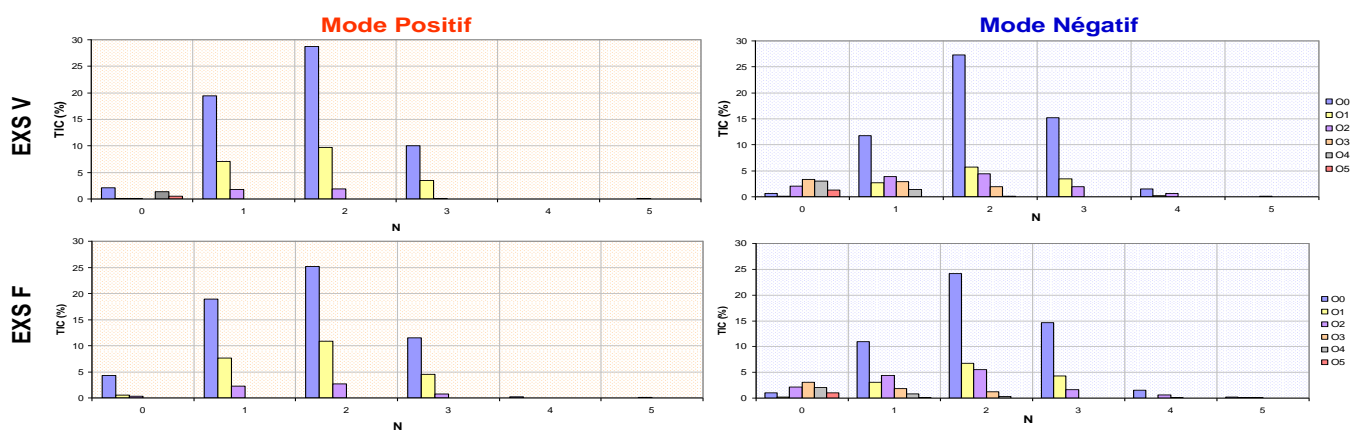


Figure IV-10 : Classification des familles chimiques pour les EXS V et F

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

Cette analyse est confortée par l'analyse plus fine de la répartition des composés en fonction d'une part du nombre d'hétéroatomes et d'autre part de leur DBE. Les abondances relatives des différentes familles chimiques $C_{6-34}H_{7-28}N_{0-4}O_{0-5}^{(\bullet)+}$ et $C_{7-36}H_{3-33}N_{0-6}O_{0-6}^{(\bullet)-}$ montrent une très forte similitude pour les deux fumeurs dans les deux modes de détection. Par conséquent, une part importante des différences observées est relative à l'extension des mêmes familles chimiques vers les hautes ou basses valeurs de rapport m/z. Pour s'en convaincre, on peut par exemple comparer pour les deux fumeurs, la famille $C_xH_yN_{0-4}O_{0-3}^{(\bullet)+}$. Pour le fumeur V, ces familles possèdent des valeurs de DBE comprises entre 2,5 et 24, et entre 6 et 32 atomes de carbone, alors que pour le fumeur F, la valeur de x varie entre 10 et 34 et celle de la DBE entre 6,5 à 26,5. Plus spécifiquement, les composés $C_xH_yN_2^{(\bullet)+}$ présentent des valeurs de DBE et du nombre d'atomes de carbone dans des gammes de 2,5 à 24,5 et de 10 à 32, respectivement pour le fumeur V et de 4,5 à 26,5 et de 10 à 34, respectivement pour le fumeur F. Les valeurs de DBE classiquement plus faibles pour les composés des EXS du fumeur V confirment la présence d'espèces plus polaires au sein de ces particules et liée sans doute à un temps plus court entre l'inspiration et l'expiration de la bouffée de cigarette.

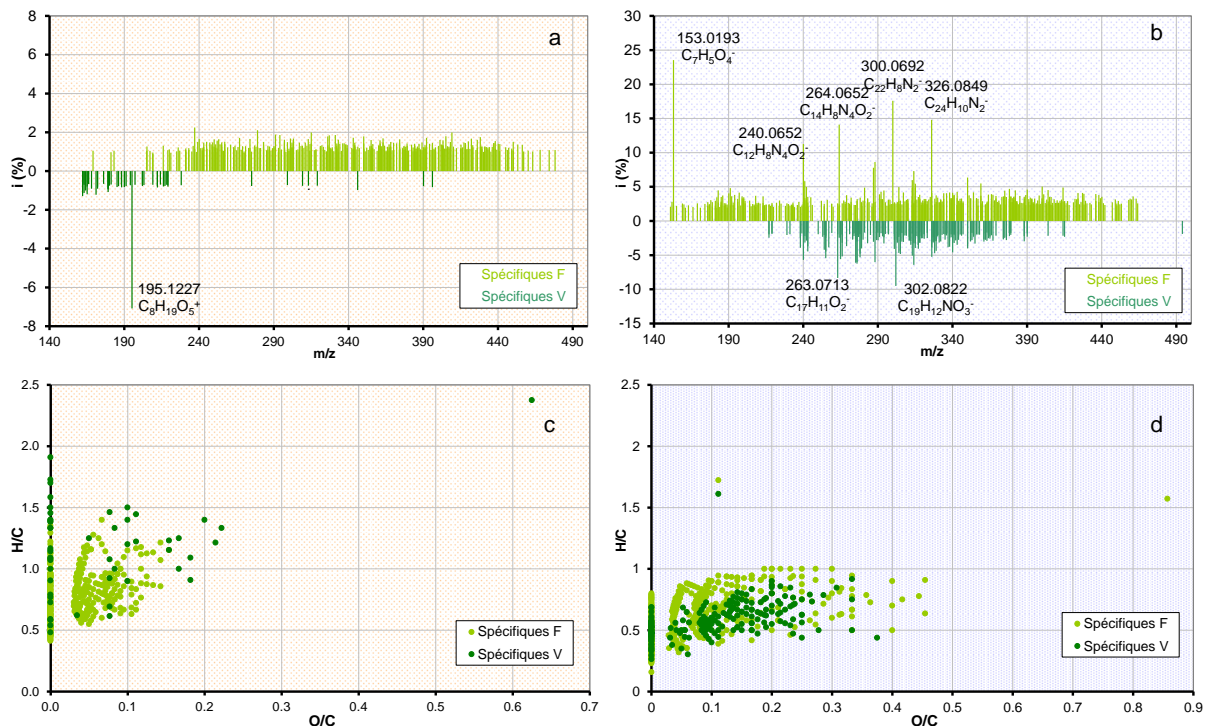


Figure IV-11 : Représentation des espèces spécifiques aux fumées expirées de chaque fumeur dans les deux modes de détection.

Au terme de cette section, des différences significatives entre les fumées inspirées et expirées ont été mises en évidence alors même que la variabilité de la composition des MSS

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

issus de deux cigarettes différentes ou des EXS issus de deux fumeurs différents apparaît faible. Les différences notables entre MSS et EXS laissent à penser que la rétention dans le système respiratoire d'une partie des MSS peut être sélective. L'analyse des EXS issues d'un second fumeur révèlent quelques différences, mais restent néanmoins mineures devant les différences de composition chimique observées entre EXS/MSS. Ces EXS concourent aux ETS et donc aux fumées inhalées par tabagisme passif. Il apparaît nettement que le fumeur actif et le fumeur passif ne sont pas exposés majoritairement aux mêmes fractions de composés et donc qu'une exposition différente aux toxiques présents dans les fumées entre un fumeur passif et actif a lieu. Les EXS ne sont pas seules impliquées dans le tabagisme passif, il est désormais nécessaire pour compléter la description des ETS, d'examiner la composition des SSS.

IV.4. Analyse des SSS et comparaison avec les MSS

IV.4.1. Introduction

L'examen des SSS va permettre de compléter la description engagée dans la partie précédente des ETS et d'avoir ainsi une vision exhaustive des composés auxquels une personne est soumise dans le cadre du tabagisme passif.

A la différence des MSS, pour lesquelles la procédure normalisée permet de collecter l'intégralité des particules émises, le dispositif qui a été mis en place dans le cadre de cette étude ne peut capter l'ensemble des SSS. En effet, le débit utilisé pour le prélèvement est seulement de 2 L/min. Il est trop faible pour collecter toute les SSS mais le choix a été de ne pas l'augmenter de manière à limiter son effet sur la combustion de la cigarette et donc sur la nature et la collecte des MSS. Par conséquent, aucune valeur de quantité de particules collectée ne sera donnée. L'analyse et la comparaison avec les MSS ne portera que sur la nature et la distribution des espèces moléculaires observées par spectrométrie de masse.

IV.4.2. Approche globale

La **Figure IV-12** présente le spectre de masse obtenu en mode de détection positif dans l'analyse des SSS par LDI-FTICRMS à 355nm. Dans la gamme de rapport m/z considérée, le nombre de signaux relatifs à des espèces organiques est de l'ordre de 720 (770

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

pour les MSS) et le courant d'ions total de l'ordre de 1200 u.a. (2100 u.a. pour les MSS). Les espèces qui conduisent aux contributions les plus importantes sur le spectre de masse sont là aussi très proches entre les SSS et les MSS. Leurs intensités relatives sont cependant fonction de la nature de la fumée analysée. Ces espèces apparaissent aux rapports m/z 163,12305 ; 177,13862 ; 212,84278 ; 269,12855 et 430,92154 en mode positif. Le signal associé à $K_3SO_4^+$ (m/z 212,84278) est le pic de base pour les SSS. Pour les MSS, l'ion protoné de la nicotine à m/z 163,12305 est rappelons le, l'espèce ionique la plus abondante. Cette différence s'explique facilement par la contribution significative des processus de distillation relatifs au passage du courant chaud au travers du tabac non consommé qui concoure fortement à augmenter la quantité de nicotine dans les MSS. Dans le cas des SSS, cette vaporisation ne peut se faire qu'à proximité de la zone de pyrolyse, où la température est suffisamment élevée pour permettre sa vaporisation, sans l'être trop pour ne pas la dégrader par pyrolyse.

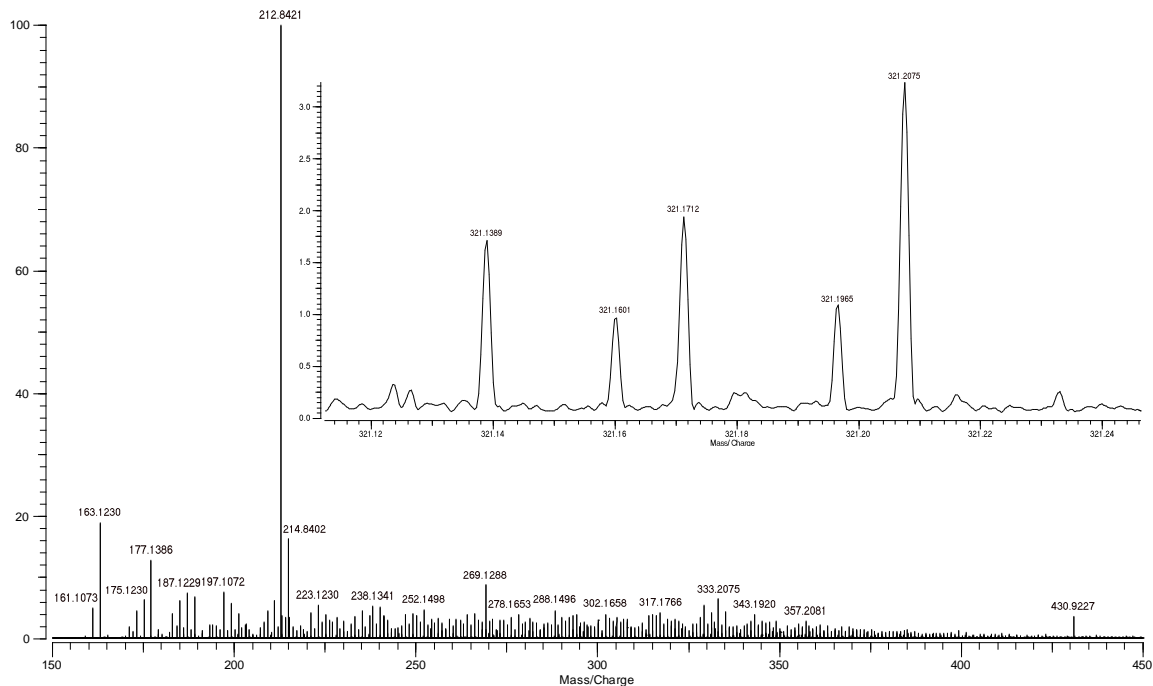


Figure IV-12 : Spectre de masse des SSS de la cigarette A en mode positif.

A la masse nominale 321, cinq ions sont observés à m/z 321,1369 ; 321,1601 ; 321,1712 ; 321,1961 et 321,2075. Les MSS présentaient outre ces contributions d'autres ions à la masse nominale 321. Par ailleurs, les distributions relatives de ces cinq espèces sont significativement différentes entre MSS et SSS. Les différences sont cependant moins prononcées que ce qui a pu être mis en évidence entre MSS et EXS. En effet, la **Figure IV-13** met en évidence 525 ions communs aux MSS et SSS en mode positif. Les DBE moyennes de

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

chaque zone révèlent néanmoins une aromaticité plus prononcée dans le cas des molécules des SSS (DBE =12,35 pour les spécifiques SSS et 9,73 pour les spécifiques MSS)

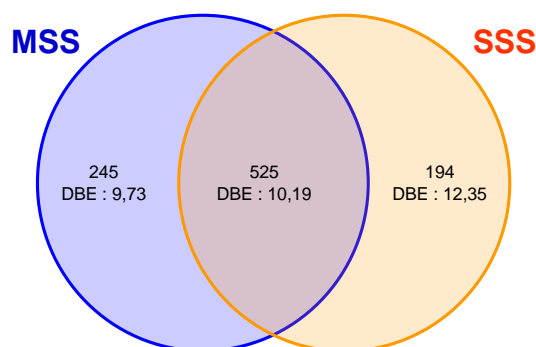


Figure IV-13 : Diagramme de Venn des ions positifs communs et spécifiques aux MSS et SSS (hors contributions ^{13}C)

Comme pour les EXS, un aspect remarquable du spectre de masse en mode de détection négatif présenté sur la **Figure IV-14**, est relatif à la distribution particulière des différents massifs d'ions associés aux pics principaux. En effet, les molécules ayant un nombre pair de carbone du type $\text{C}_{12,14,16,18,20,22,24}\text{H}_{5,7,9}\text{N}_2$ sont bien moins abondants que les pics $\text{C}_{11,13,15,17,19,21,23,25}\text{H}_{5,7,9}\text{N}_2$. Les écarts de masse mesurés entre les pics les plus intenses sont systématiquement égaux à 24 ou 26, c'est-à-dire à des écarts de C_2 ou C_2H_2 . La distribution des ions négatifs MSS présente des massifs séparés typiquement d'un incrément de 12, 13 ou 14 m/z (motifs C, CH ou CH_2).

Les cartes de Kendrick obtenues pour les SSS dans les deux modes de détection indiquent que les composés observés sont semblables à ceux détectés au cours de l'analyse des MSS. Cela confirme et étend les résultats obtenus au cours de l'examen des espèces possédant en mode de détection positif une masse nominale de 321. Ces similitudes portent à la fois sur la gamme de rapport m/z et sur les valeurs de KMD. L'examen de la distribution des indices d'aromaticités permet d'affiner l'analyse en ajoutant une dimension semi-quantitative aux observations réalisées. Si la nature des composés observés dans les SSS et les MSS est en partie identique, leur distribution est cependant différente. De manière globale, le nombre et l'intensité relative des composés possédant une importante valeur d'AI sont nettement supérieurs pour les SSS quelque soit le mode de détection utilisé. Les composés présents dans les SSS possèdent donc principalement des indices d'aromaticité de molécules aromatiques ou aromatiques condensées. Ainsi en mode de détection positif pour les SSS, le nombre de molécules avec un AI supérieur à 0,5 est plus important (551 contributions et 65% du TIC) que pour les MSS (494 pics et 50% du TIC).

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

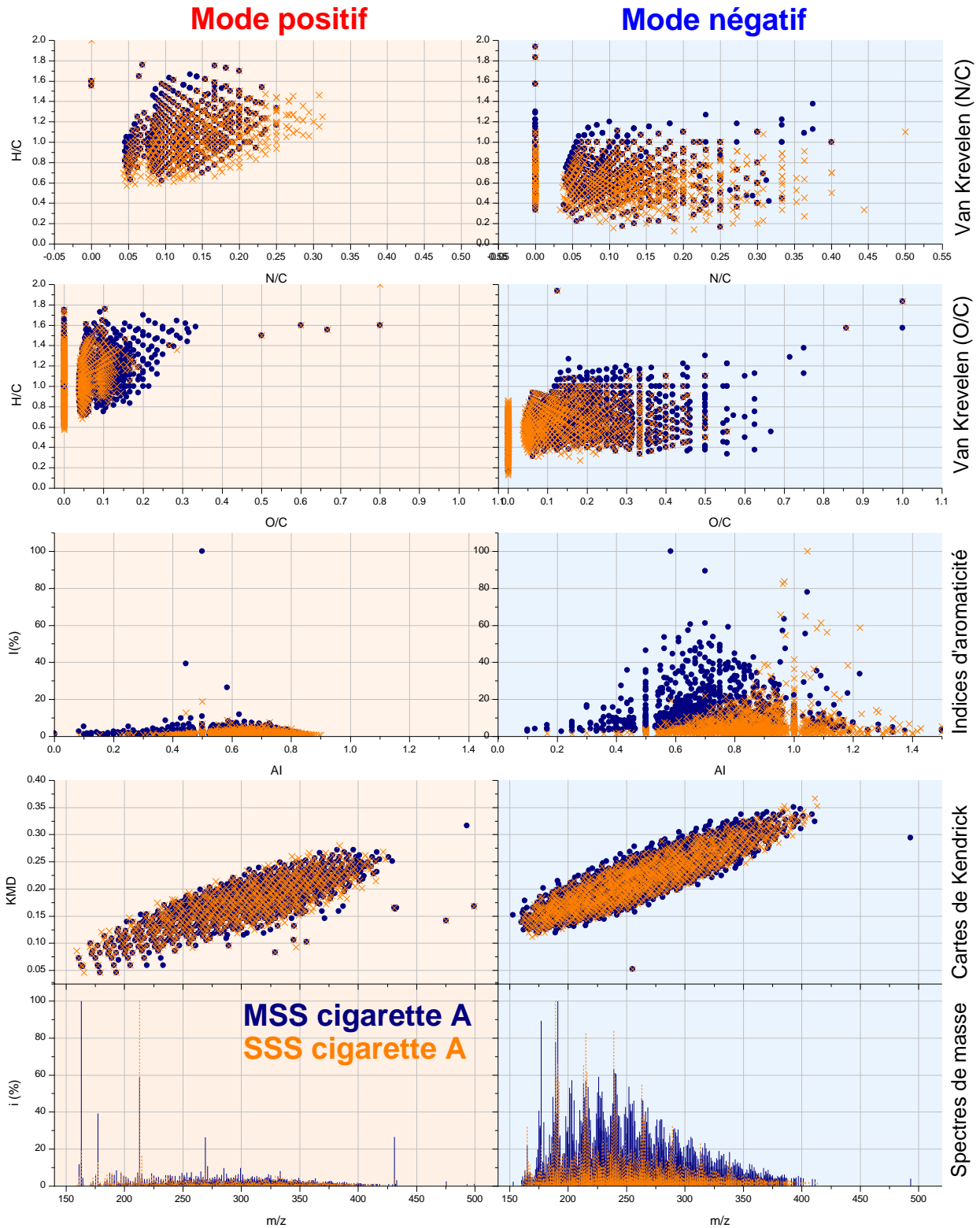


Figure IV-14 : Analyse globale des spectres de masse de MSS (bleu) SSS (orange).

Les diagrammes de Van Krevelen confirment la présence de composés moins saturés dans les SSS par la présence de nombreux composés avec des valeurs H/C faibles. Deux spécificités par rapport aux diagrammes Van Krevelen des MSS, et cela dans les deux modes

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

de détection, sont remarquables. Il apparaît que les SSS sont à la fois moins oxygénées mais plus azotées que les MSS. Cette plus grande présence d'atomes d'azote semble également liée, comme on peut le voir en mode de détection négatif sur le diagramme de Van Krevelen N/C, à des composés fortement insaturés (rapport H/C < 1). L'examen de la distribution des ions au sein des différentes familles va permettre de confirmer cette analyse.

IV.4.3. Analyse par familles

La **Figure IV-15** présente dans les deux modes de détection la distribution relative des espèces hydrocarbonées en fonction du nombre d'atomes d'azote et d'oxygène pour les MSS et les SSS. Les différences mises en évidence dans l'étude des cartes de Van Krevelen sont ici très nettement observables. Quelque soit le mode de détection, on observe clairement pour les MSS, une abondance relative plus importante des composés les plus oxygénés pour une classe de composés donnés (composés contenant le même nombre d'atomes d'azote). Par ailleurs, les composés observés en mode de détection positif contenant au moins trois atomes d'azote et, en mode de détection négatif possédant au moins deux atomes d'azote sont nettement plus abondants au sein des SSS que des MSS. De manière plus semi-quantitative pour les MSS, les familles à la fois azotées et oxygénées correspondent à 70% du nombre d'espèces détectées et 60% du TIC en mode positif alors que les espèces hydrocarbonées purement azotées ne représentent que 30% du TIC et du nombre d'espèces détectés. Pour les SSS, ces proportions sont presque inversées.

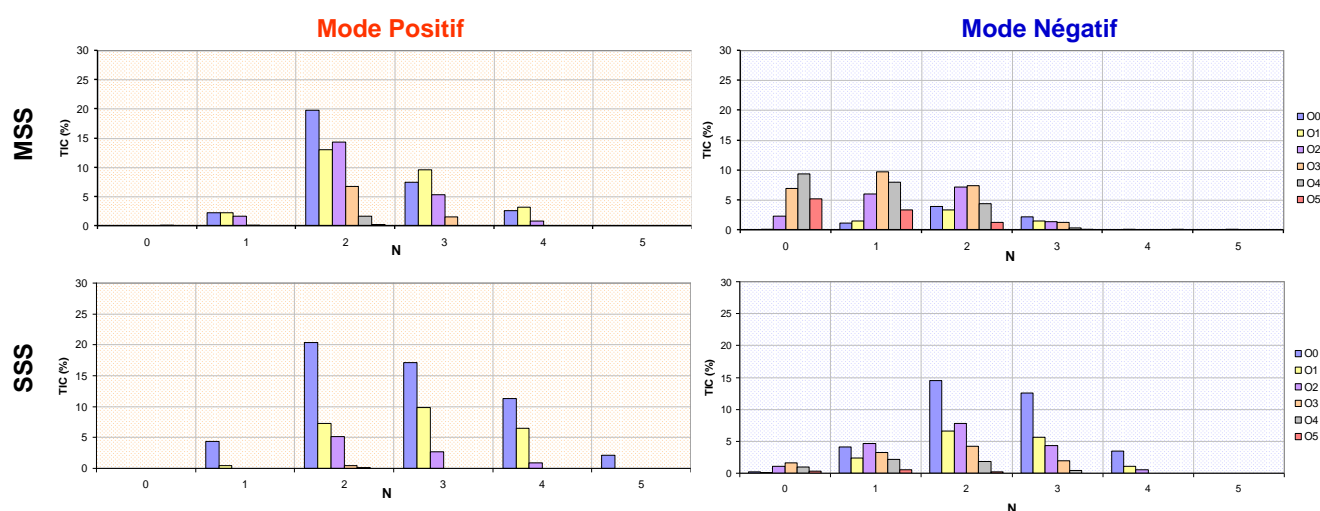


Figure IV-15 : Classification des familles chimiques pour les EXS V et F

La **Figure IV-16** indique la distribution des ions $C_xH_yN_2O_{0-5}^+$ en fonction de leur DBE pour les MSS et les SSS. Une nouvelle fois la présence de molécules plus oxygénées pour les

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

MSS est démontrée. Par exemple, la famille de composés de type $C_xH_yN_2O_{0.5}^+$ pour les MSS représente un TIC trois fois plus élevé et un nombre d'espèces détectées deux fois plus élevé à celles des SSS. Ce qui est également remarquable ici, c'est la valeur typiquement similaire de la DBE pour ces différentes familles de composés pour les MSS et les SSS. Cette valeur de DBE est fortement liée à l'indice d'aromaticité des composés. Il a été démontré précédemment que les composés relatifs aux SSS sont plus insaturés que ceux des MSS. Par conséquent, les variations d'indices d'aromaticité observés entre SSS et MSS ne peuvent que très partiellement être liées à la distribution et à la nature des espèces $C_xH_yN_{0.5}O_{0.5}^{+/-}$ mais doivent trouver leurs sources dans celles des espèces $C_xH_yN_{0.5}^{+/-}$. La présence d'aromatiques condensés et d'aromatique contenant un ou plusieurs atomes d'azote est à même d'expliquer les différences observées entre SSS et MSS.

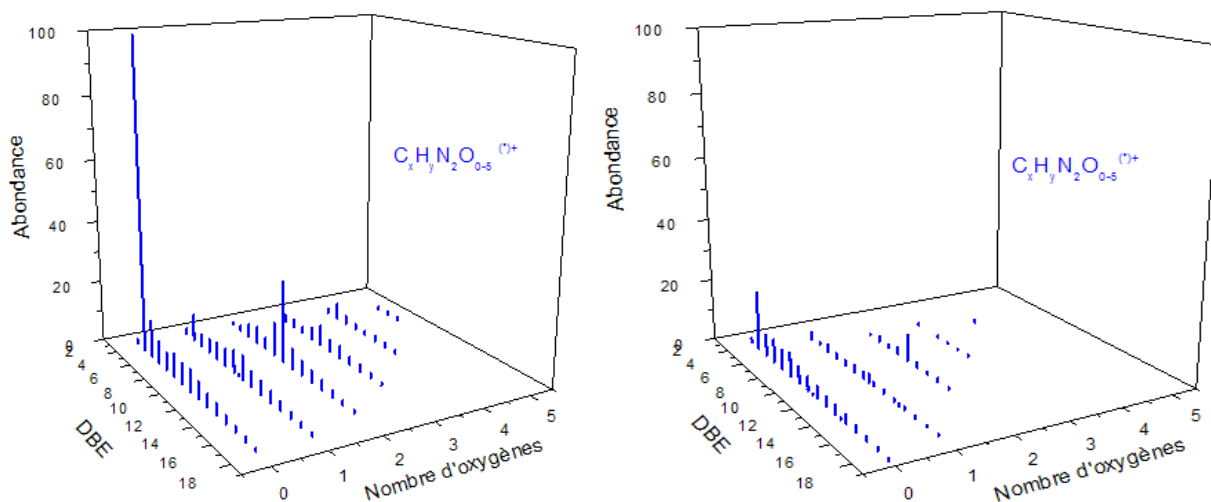


Figure IV-16 : Etude des composés de type $C_xH_yN_2O_{0.5}^{(+)}$ dans les MSS (gauche) et les SSS (droite)

L'ensemble des différences de compositions mises en évidence peut trouver bon nombre d'explications rationnelles si on considère les différents processus qui prennent place durant la combustion « non-forcée » de la cigarette.

Au cours du prélèvement des SSS, la teneur en oxygène au foyer de combustion est faible, les phénomènes de pyrolyse sont majoritaires. Ces processus sont bien connus pour conduire, quel que soit la nature de la matière organique, à du carbone sous forme condensée (appelé noir de carbone ou suie), par la formation d'espèces C_2 et par des phénomènes de déshydratation et de déshydrogénation (chapitre I). Par conséquent, pour les SSS, la forte présence d'espèces aromatiques condensées et les effets d'alternance pair/impair observés sur le spectre de masse négatif (écarts de C_2 et C_2H_2) sont indicateurs de processus pyrolytiques. Outre l'effet d'augmenter le nombre de doubles liaisons, les processus de déshydratation

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

conduisent à réduire le nombre d'atomes d'oxygènes présents dans les molécules de SSS, ce qui explique notamment le plus faible rapport O/C observé sur les diagrammes de Van Krevelen des SSS. Le plus fort rapport N/C dans les SSS peut également être lié aux phénomènes de pyrolyse. En effet, la faible teneur en oxygène et la plus basse température (caractéristiques principales des conditions pyrolytiques) va rendre la formation de NO ou NO₂ à partir des composés azotés beaucoup plus difficile. Ces composés vont alors conduire plus facilement par pyrolyse à des composés fortement condensés. Par ailleurs, les MSS passent au travers du filtre de la cigarette et du tabac non consommé et interagissent avec les molécules qui les constituent. Cela induit à la fois la distillation des composés volatils du tabac et leur adsorption sur la phase particulaire. Ces espèces n'ayant pas subi de processus de combustion ou de pyrolyse sont, en toute vraisemblance, plus saturées. La fumée de cigarette est également un milieu très réactif en accord avec sa température et sa composition (espèces radicalaires). Des phénomènes d'oxydation peuvent ainsi prendre place avec les espèces réactives de l'oxygène (ozone, radical hydroxyl, radical peroxy) et modifier la nature des espèces initiales en favorisant leur oxydation.

IV.5. Conclusions

La LDI-FTICRMS à 355 nm a montré ses capacités pour comparer la matière particulaire relative à différents types de fumées de cigarette. L'objectif d'identifier de potentielles différences entre les fumées associées au tabagisme actif et passif a été rempli. La comparaison des MSS (fumée inhalée par le fumeur actif) provenant de deux cigarettes fortement différentes a révélé de très grandes similitudes dans les composés détectés avec néanmoins quelques différences d'un point de vue des intensités des différentes familles. L'analyse des fumées expirées (EXS) par un fumeur réel et leur comparaison aux fumées inhalées ont ensuite été réalisées. Les différences observées entre les deux types de fumées sont notables tant au niveau de la composition chimique (familles de composés), qu'au niveau de leur aromaticité et de leur abondance relative. L'analyse des EXS d'un second fumeur a quant à elle montré une extrême ressemblance avec celles du premier fumeur. Il a ainsi pu être observé que la rétention de certains composés des MSS par l'appareil respiratoire du fumeur est notamment fonction de leur polarité. Une première différence entre tabagisme actif (inhalation des MSS) et tabagisme passif (inhalation des EXS) a pu être mise en évidence.

Pour finir, l'analyse des SSS, fumées qui s'échappent de la cigarette entre deux bouffées et qui constituent la seconde part des fumées inhalées par tabagisme passif a également été entreprise. Les résultats ont été comparés à l'étude des MSS. Qualitativement, les espèces observées sont similaires, mais d'importantes différences sont observées dans leur distribution relative. Celles-ci sont à relier à des processus différents (pyrolyse, combustion) au cours de la production des MSS et des SSS.

Les particules issues des fumées de cigarette qu'inhalent un fumeur passif, qui correspondent à la fois aux SSS et aux EXS, et que l'on nomme généralement ETS, possèdent une composition chimique notoirement différente de celles inhalées par le fumeur actif (MSS), comme on peut l'observer sur la **Figure IV-17**. 176 molécules ont été observées uniquement dans les MSS, 102 uniquement dans les SSS et 809 uniquement dans les EXS. Bien qu'elles représentent une masse de particules beaucoup plus faibles que les SSS, les EXS apportent une grosse spécificité chimique dans la composition des ETS. Une différence significative entre MSS et ETS concernant l'aromaticité des molécules a été observée. En effet, la DBE moyenne des composés spécifiques aux MSS est inférieure (9,12) à celles

Analyse des fumées de cigarette associées au tabagisme actif et passif

observées à la fois dans les SSS et EXS (11,03 et 16,18 respectivement). Le fumeur passif est donc exposé à des molécules plus aromatiques que le fumeur actif.

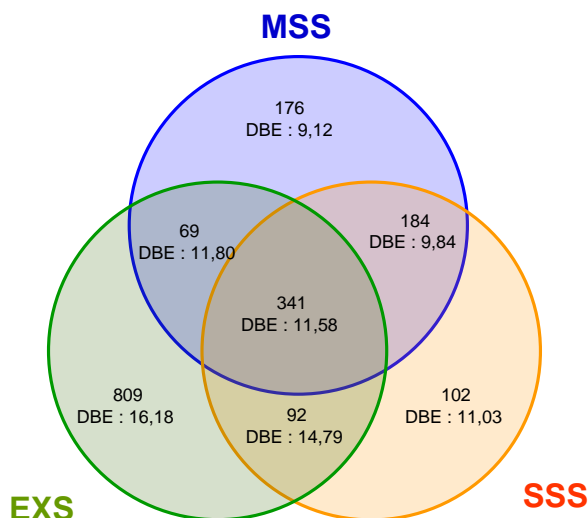


Figure IV-17 : Diagramme de Venn des espèces communes et spécifiques aux MSS, SSS et EXS en mode de détection positif.

De plus, il a été montré que les MSS contiennent des molécules fortement oxygénées, contrairement aux SSS et EXS, où le taux d'oxygène est plus faible au profit des molécules azotées.

En conséquence, les toxiques auxquels sont soumis fumeurs actifs et fumeurs passifs sont fortement différents en termes de nature et d'abondance et sont par conséquent susceptibles de produire des effets toxicologiques différents.

Chapitre V.

**Analyses
complémentaires des
fumées de cigarettes
par FTICRMS et RMN**

V.1. Introduction	V-145
V.2. Analyse des fumées de cigarette par LDI-FTICRMS à 266 nm	V-147
V.2.1. Introduction	V-147
V.2.2. Protocole expérimental	
.....	V-147
V.2.3. Analyse des MSS par LDI-MS à 266 nm et comparaison à l'analyse par LDI-MS à 355nm	
.....	V-148
V.3. Analyse des fumées de cigarette par ESI-FTICRMS	V-151
V.3.1. Introduction	V-151
V.3.2. L'ionisation par électronébulisation	V-152
V.3.2.A. Principe de la technique	V-152
V.3.2.B. Protocole expérimental	V-153
V.3.2.C. Analyse en mode de détection positif	V-154
V.3.2.D. Analyse en mode de détection négatif	V-156
V.3.3. Conclusion.....	V-158
V.4. Analyse par résonance magnétique nucléaire des MSS et SSS.	V-159
V.4.1. Introduction	V-159
V.4.2. Principes généraux de la RMN	V-160
V.4.2.A. Obtention du signal RMN.....	V-160
V.4.2.A. Le déplacement chimique	V-162
V.4.3. Etude des MSS	V-163
V.4.3.A. Analyse en RMN du proton	V-163
V.4.3.B. RMN hétéro-nucléaire, proton-carbone 13 (HSQC)	V-165
V.4.3.C. RMN COSY et TOCSY	V-167
V.4.3.C.a. La zone des aliphatiques et des insaturés non conjugués	V-168
V.4.3.C.b. La zone des aromatiques.	V-169
V.4.3.D. Conclusion	V-170
V.4.4. Comparaisons des MSS et SSS	V-171
V.5. Conclusion	V-175

V.1. Introduction

Les résultats reportés dans les chapitres précédents ont clairement montré les capacités de la spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser à la longueur d'onde de 355 nm dans le cadre de l'analyse et de la comparaison de la fraction particulaire de différents types de fumées de cigarette. En dépit de leurs présences avérées dans les MSS, certaines classes de composés comme les HAPs n'ont pu être détectées. Plusieurs explications peuvent être données. Elles reposent principalement sur un manque de sensibilité de la technique employée qui peut être relatif soit à de trop faibles concentrations, soit à une ionisation inefficace de ces composés. Lodici *et al.* ont déterminé que la teneur totale en HAPs pour 14 types de cigarettes différentes est d'un ordre de grandeur supérieur pour les SSS par rapport aux MSS¹³⁰, elle est en effet comprise entre 118 et 374 ng/cig dans les MSS et entre 2,3 et 3,9 µg/cig dans les SSS. Par ailleurs Moldoveanu *et al.* ont mesuré une concentration totale en HAP dans les EXS de 10 fumeurs comprises entre 62 et 181 ng/cig.¹³¹ Si la faible concentration en HAP peut être une explication rationnelle à la non observation de ceux-ci dans les SSS et les MSS, il est important de noter que l'analyse des EXS des fumeurs F et V par LDI-FTICRMS à 355 nm a permis de les détecter alors même que ce sont ces fumées qui en contiennent le moins. En conséquence, le manque de sensibilité de la détection des HAP n'est en aucune mesure lié à de trop faibles concentrations mais à une inefficacité à les ioniser dans les conditions opératoires retenues jusqu'alors. L'efficacité du processus de désorption/ionisation laser atteint est maximale pour les molécules qui absorbent fortement à la longueur d'onde du faisceau laser. Elles sont alors amenées en phase gazeuse et ionisées sous forme de radical cation $M^{+\bullet}$. De manière générale, les composés purement hydrocarbonés aliphatiques, oléfiniques, aromatiques ou polyaromatiques ainsi que les composés hétéro-atomiques saturés ou faiblement insaturés (alcools, éthers, amine, etc...) n'absorbent pas ou faiblement à 355 nm. L'efficacité de leur ionisation par interaction directe avec les photons du faisceau laser est donc faible. Par ailleurs, la détection d'espèces principalement protonées ou déprotonées dans l'étude par LDI-FTICRMS des MSS, SSS et EXS permet de considérer que des voies alternatives d'ionisation (transfert de protons) sont à l'origine de la production des espèces détectées par spectrométrie de masse. Dans ce contexte, seules les espèces plus ou moins insaturées présentant des hétéroatomes oxygène et principalement azote sont en mesure d'être

130 Lodovici, M.; Akpan, V.; Evangelisti, C.; Dolara, P. *J. Appl. Toxicol.* **2004**, *24*, 277-281.

131 Moldoveanu, S. C.; Coleman, W.; Wilkins, J. M. *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Exhaled Cigarette Smoke*; Verband der Cigarettenindustrie: Bonn, ALLEMAGNE, 2008.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

efficacement ionisées et donc détectées sous leur forme protonée en mode de détection positif et/ou déprotonée en mode de détection négatif.

Afin d'accroître notre connaissance de la nature des espèces présentes dans les MSS et les SSS principalement, il est nécessaire d'employer d'autres méthodes d'ionisation qui permettent de détecter de manière efficace et sensible les composés hydrocarbonés aromatiques et les espèces hydrocarbonées hétéro-atomiques fortement saturées. La diminution de la longueur d'onde du faisceau laser à 266 nm permet d'accroître au cours d'une analyse par LDI-FTICRMS la sensibilité pour les espèces aromatiques et polyaromatiques. Ces molécules présentent en effet une forte absorption à cette longueur d'onde ce qui accroît l'efficacité de leur désorption, mais elles sont également susceptibles d'être plus facilement ionisées à cette longueur d'onde.

La présence d'hétéroatomes dans une chaîne hydrocarbonée est à même d'accroître de manière sensible la polarité d'une espèce. Une méthode d'ionisation particulièrement efficace des composés polaires est l'ionisation par électro-nébulisation ou ESI. A ce titre, il apparaît opportun d'employer cette technique couplée à la spectrométrie de masse FTICRMS pour obtenir des informations plus importantes sur cette fraction de composés au sein de la fumée de cigarette. Rappelons en effet, la faible participation au courant d'ion total au sein des MSS et des SSS des composés possédant une faible valeur de DBE. L'ESI nécessite que les échantillons analysés soient en solution, ainsi une étape d'extraction est requise. Pour limiter les compétitions à l'ionisation, l'extraction par trois solvants de polarités différentes (hexane, dichlorométhane et méthanol) a été entreprise. Dans les deux premiers cas, l'extrait devra être amené à sec puis dissous à nouveau dans le méthanol qui sera le solvant d'analyse.

La première partie de ce dernier chapitre présentera donc les résultats obtenus ainsi que leur comparaison à ceux reportés dans le cadre de l'analyse par désorption/ionisation laser à 355 nm. Il sera plus particulièrement montré l'apport de ces méthodes quant à la détection sensible de nouvelles classes de composés.

Aucune des méthodologies de spectrométrie de masse proposées n'est en mesure d'apporter avec une forte sensibilité, d'information pertinente sur les composés peu polaires non-aromatiques. Une approche complémentaire a été envisagée, elle porte sur l'emploi de la spectroscopie RMN du ^1H et du ^{13}C et fait l'objet de la dernière partie de ce chapitre. Au-delà d'apporter des informations supplémentaires sur des classes de composés peu ou non détectés par les différentes méthodes de spectrométrie de masse, elle permettra aussi dans le cadre de l'examen global et de la comparaison des MSS et des SSS d'apporter des résultats qui seront

comparés à ceux obtenus par spectrométrie de masse et ainsi d'affiner encore notre description de ces deux types de fumées de cigarette.

V.2. Analyse des fumées de cigarette par LDI-FTICRMS à 266 nm

V.2.1. Introduction

Le but principal de l'examen des fumées de cigarette à la longueur d'onde de 266 nm est d'accroître la sensibilité de la détection des composés organiques aromatiques et polyaromatiques. Deux effets spécifiques de l'interaction laser-matière à cette longueur d'onde pour de telles espèces sont en effet en mesure d'exalter à 266 nm leur détection. En premier lieu, ces composés absorbent de manière importante dans ce domaine de rayonnement, cela a pour effet d'accroître le rendement de désorption si on le compare à celui obtenu à 355 nm. D'autre part, l'énergie transportée par chaque photon est plus importante à 266 (4,66 eV) qu'à 355 nm (3,49 eV). L'énergie de première ionisation des hydrocarbures aromatiques mono ou polycycliques est classiquement comprise entre 7 et 9,5 eV. Pour ioniser un tel composé en phase gazeuse, l'absorption de trois photons est nécessaire dans la plupart des cas à 355 nm alors que seuls deux sont requis à 266 nm. Dans ce cas, le premier photon assure le passage de la molécule de son niveau fondamental (S_0) vers un état excité (S_2) de durée de vie suffisante pour permettre à un second photon d'apporter l'énergie qui assurera l'ionisation par éjection d'un électron de l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie. La nécessité d'avoir recours à un second niveau excité intermédiaire à 355 nm diminue très fortement l'efficacité de l'ionisation. De nombreux exemples de gain en sensibilité pour de tels composés existent dans la littérature. On peut par exemple citer les travaux menés au laboratoire dans l'analyse de différents contaminants ou de métabolites de la vigne.¹³²

V.2.2. Protocole expérimental

La méthode de prélèvement et d'analyse des MSS par LDI-FTICRMS à 266 nm est en tout point identique à celle mise en place au chapitre III. La désorption/ionisation est réalisée à l'aide d'un laser Nd:YAG quadruplé en fréquence qui délivre des photons sur des temps

132 Hamm, G.; Carré, V.; Poutaraud, A.; Maunit, B.; Frache, G.; Merdinoglu, D.; Muller, J.-F. o. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 335-342.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

d'impulsion de 5 ns. La fluence employée dans le cadre de ces analyses est de $\sim 1,1 \text{ J/cm}^2$. Cette valeur est proche de celle utilisée dans les études réalisées à 355 nm. Pour limiter l'effet des hétérogénéités de dépôt à la surface du filtre et améliorer le rapport signal sur bruit, 45 spectres de masse sont moyennés. La méthode d'attribution des compositions élémentaires est identique à celle décrite précédemment.

V.2.3. Analyse des MSS par LDI-MS à 266 nm et comparaison à l'analyse par LDI-MS à 355 nm

Les spectres de masse obtenus dans les deux modes de détection pour les deux longueurs d'onde utilisées ainsi que les cartes de Kendrick associées sont présentés en **Figure V-1**. A la différence de ce qui avait pu être observé à 355 nm, quel que soit le mode de détection, des ions de forte intensité sont observés sur l'ensemble de la gamme de rapport m/z comprise entre 150 et 450 à 266 nm. La différence est à ce niveau, très nette pour le mode de détection positif. De manière remarquable à 266 nm, les ions positifs dans la gamme 220 – 350 m/z présente une périodicité relative à un atome de carbone ou à un motif CH. En mode négatif, une périodicité correspondant à des incréments C_2 et/ou C_2H_2 est très nettement observée entre massifs de pics intenses. En mode de détection positif, le nombre d'espèces de type radical cation correspond globalement à un quart des ions observés sur le spectre de masse et contribue pour près de 25 % au courant d'ion total. Ces espèces sont extrêmement peu abondantes lorsque l'analyse par LDI-FTICRMS est conduite à 355 nm. Même si ce comportement est moins marqué en mode de détection négatif, il conduit à une augmentation de la contribution des espèces radicalaires. La formation de radicaux-cations par LDI à 266 nm est spécifique aux composés condensés par des processus de photo-ionisation comme cela a pu être décrit au paragraphe précédent. Cela est confirmé par l'examen de la carte de Kendrick qui leur est associée. Les espèces détectées à 266 nm présentent en effet des défauts par rapport à la masse de Kendrick et donc un niveau d'insaturation bien plus important que celles observées à 355 nm. Ce comportement n'est pas observé en mode de détection négatif. Les processus d'ionisation qui conduisent à la formation des anions peuvent donc être, pour une grande part, considérés comme non dépendants, dans cette gamme de longueur d'onde, de l'énergie apportée par chaque photon. Pour les deux modes de détection, on observe une augmentation significative du signal, des espèces à des rapports m/z proches de 500 sont également observées. Une augmentation de l'efficacité des phénomènes de désorption laser à 266 nm est à même de rendre compte de ce comportement.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

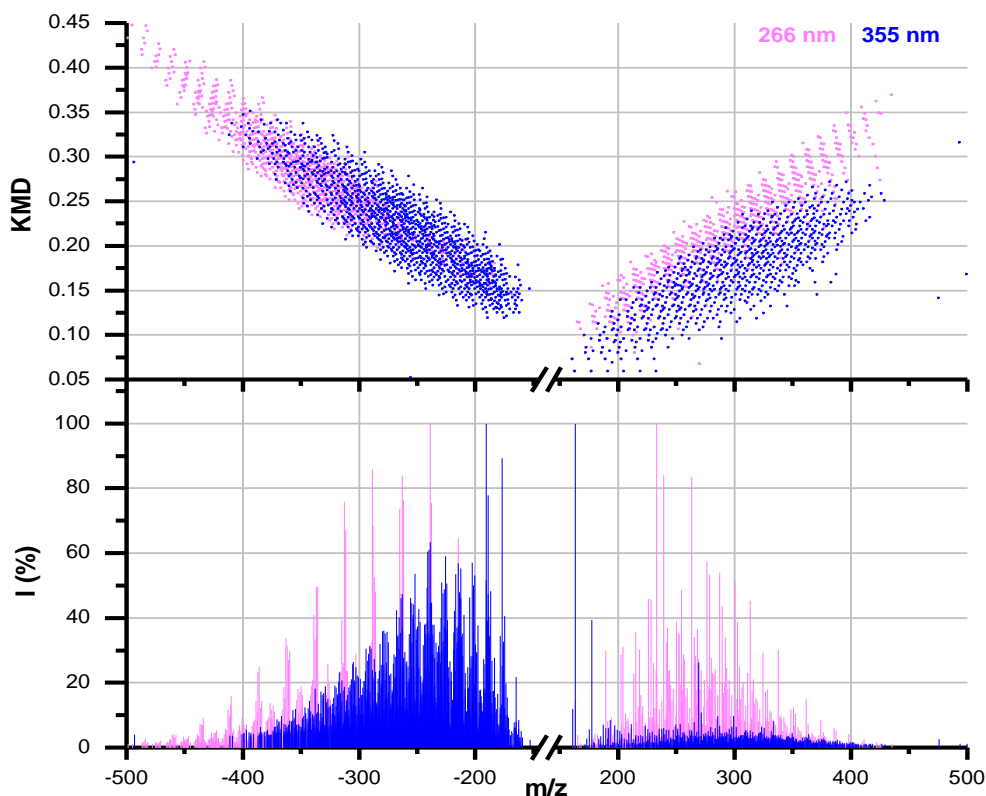


Figure V-1 : Spectres de masse et cartes de Kendrick en LDI-FTICRMS en mode négatif (gauche) et positif (droite) des MSS à 266 nm (rose) et 355 nm (bleu).

Les espèces observées à 266 nm sont principalement des composés organiques présentant jusqu'à trois (ions positifs) ou quatre (ions négatifs) atomes d'azote (**Figure V-2**). Peu d'espèces oxygénées sont observées à 266 nm, notamment en mode de détection positif. Pour les composés oxygénés de manière générale, la présence des doublets non-liants de l'oxygène associés éventuellement à un système conjugué, conduit à un maximum d'absorbance dans la gamme des UVB voire des UVA. Leur désorption est donc moins efficace à 266 nm.

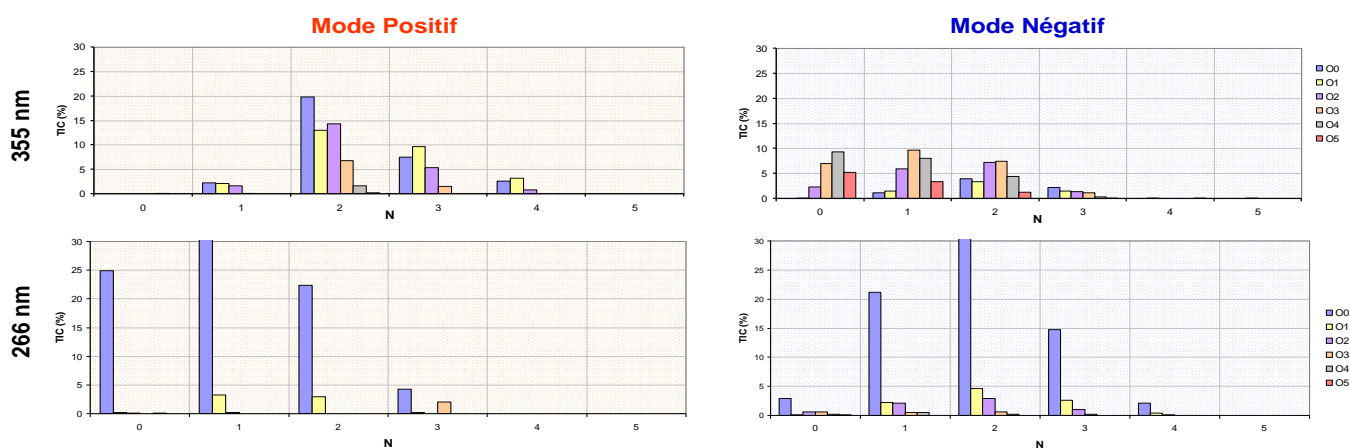


Figure V-2 : Répartition en différentes familles des composés détectés à 355 et 266 nm.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

Les cartes de Van Krevelen H/C – N/C présentées sur la **Figure V-3** permettent d'affiner la comparaison des deux jeux de données.

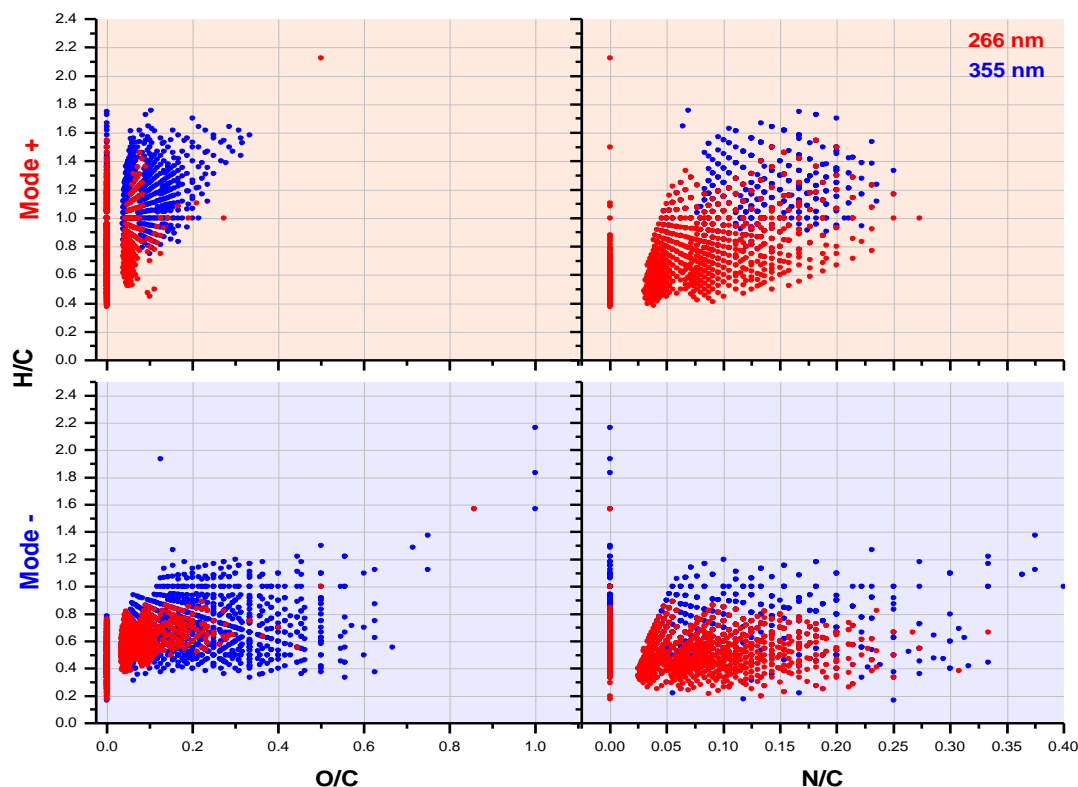


Figure V-3 : Diagrammes de Van Krevelen des espèces détectées dans l'analyse des MSS par LDI-FTICRMS à 266 nm (rouge) et 355 nm (bleu) en mode positif et négatif.

A 266 nm, les espèces azotées observées sont plus insaturées et plus fortement condensées. La plupart des composés présentent en effet des rapports H/C < 1. De manière raisonnable, ces espèces peuvent être associées à des composés condensés hétéro-aromatiques azotés de type azaarènes comme les acridines, benzoacridines et dibenzoacridines. Cette hypothèse est confortée par l'évolution de l'indice d'aromaticité. A 266 nm de 75 % (ions positifs) à 95 % (ions négatifs) des composés observés possèdent un AI > 0,67 alors qu'ils n'étaient que 28 % (ions positifs) à 63 % (ions négatifs) à 355 nm. Ces fortes variations, notamment en mode de détection positif sont également associées à une autre classe importante de composés qui voit sa contribution fortement augmentée. Il s'agit des HAPs. Principalement détectés sous forme de radical-cations, l'augmentation de la sensibilité traduit une plus grande efficacité de désorption liée à une plus forte absorption (le chrysène par exemple, possède un maximum d'absorption à 267 nm) et un meilleur rendement d'ionisation. L'absorption successive de deux photons à 266 nm possédant une énergie de 4,66 eV est largement suffisante pour ioniser par exemple, le chrysène qui possède une énergie

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

d'ionisation de 7,6 eV. Ainsi, le signal à m/z 228 qui peut lui être associé (ou à l'un de ses isomères) possède une intensité relative de 6%. Il est absent du spectre obtenu 355 nm. De la même manière, l'ion $C_{20}H_{12}^{\bullet+}$ à m/z 252 (benzo(a)pyrène et/ou isomères), non détecté à 355 nm, présente une intensité relative de 35 %. Plus globalement, les composés purement hydrocarbonés représentent 25% du TIC et correspondent à des molécules hautement insaturées.

L'analyse des MSS à 266nm assure donc l'obtention d'informations complémentaires aux résultats obtenus par LDI-FTICRMS à 355 nm. Comme l'indique la **Figure V-4**, 557 ions sont spécifiques à l'ionisation à 266 nm et ne sont donc pas présent à 355nm. Cette longueur d'onde permet la détection sensible de composés aromatiques fortement condensés (DBE moyenne de 16,57 pour les composés spécifiques à 266 nm) qu'ils soient purement hydrocarbonés (HAPs) ou hétéro-aromatiques (azaarènes).

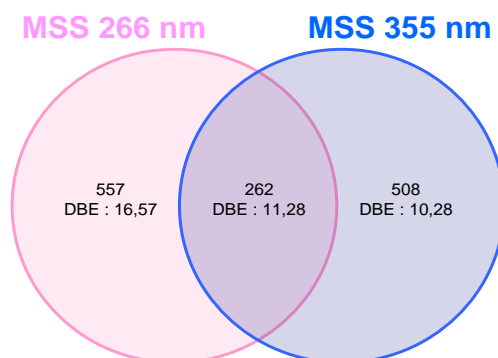


Figure V-4 : Diagrammes de Venn des ions positifs spécifiques et communs à l'analyse par LDI-FTICRMS des MSS à 266 et 355 nm. Pour chaque domaine, le nombre de composés et la valeur moyenne de DBE est donnée.

V.3. Analyse des fumées de cigarette par ESI-FTICRMS

V.3.1. Introduction

L'électronébulisation assure pour les composés polaires la production efficace d'espèces ionisées. L'emploi de cette méthode d'ionisation peut permettre d'avoir accès à des classes de composés autres que celles déjà observées par LDI-FTICRMS à 266 ou 355 nm et donc d'accroître encore notre connaissance de la composition chimique des fumées de cigarette de type MSS et SSS. La nécessité de recourir à la mise en solution de l'échantillon a conduit à mettre en place une méthode d'extraction des composés présents dans la phase particulaire des fumées de cigarette dans trois solvants de polarité différentes : l'hexane, le

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

dichlorométhane et le méthanol. Ce protocole a été employé pour limiter les phénomènes d'extinction de signal important en ESI pour des composés présentant des différences significatives de polarité. La nécessité que le solvant possède une forte constante diélectrique pour permettre la formation efficace des ions impose que le méthanol soit systématiquement utilisé comme solvant d'infusion. Ainsi, l'extraction au Soxhlet par l'hexane, le dichlorométhane et le méthanol a été suivie dans les deux premiers cas, d'une étape supplémentaire de préparation de l'échantillon. A l'aide d'un évaporateur Réactitherm®, l'extrait est amené à sec avant d'être repris dans du méthanol.

V.3.2. L'ionisation par électronébulisation

V.3.2.A. Principe de la technique

Le principe de fonctionnement d'une source électrospray est décrit sur la **Figure V-5**. L'échantillon initialement contenu dans une seringue connectée à un tube capillaire en acier inoxydable est introduit (infusé) au sein de la source électrospray. Un débit contrôlé (<10 $\mu\text{L}/\text{min}$) à l'aide d'un dispositif de pousse-seringue automatique est utilisé pour assurer un bon contrôle de l'introduction des échantillons dans la source d'ionisation. Le processus électrospray peut être décomposé en 3 étapes :

- i. formation de gouttelettes,
- ii. explosion de ces gouttelettes en de plus petites,
- iii. formation d'ions en phase gazeuse.

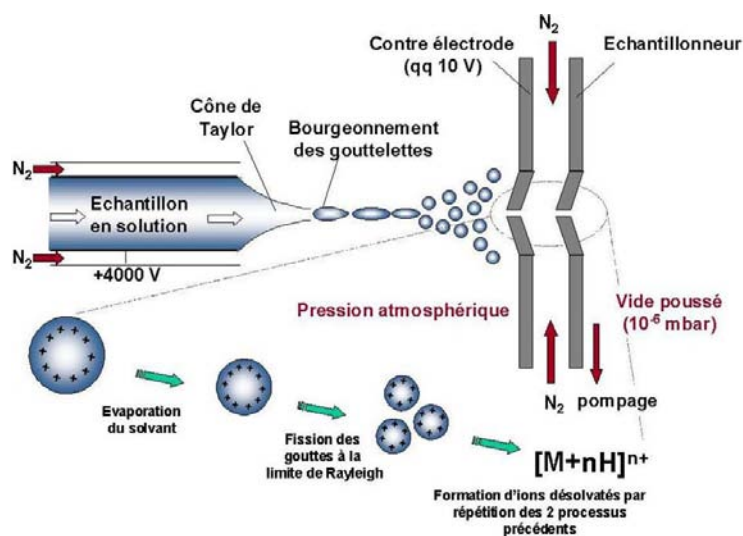


Figure V-5 : Principe de l'ionisation par électronébulisation (ESI)

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

Afin de produire des ions, un potentiel d'en général plusieurs kilovolts est appliqué au capillaire d'infusion. Par ailleurs, l'extraction et l'accélération des ions vers le guide d'ions et l'analyseur sont assurées par une différence de potentiel appliquée entre le cône d'extraction d'une contre-électrode et le cône d'une électrode dite échantillonneuse. Lorsque la solution quitte le capillaire, elle est polarisée par le champ électrique généré par la différence de potentiel entre le capillaire d'introduction et la contre-électrode (entrée du spectromètre de masse). Le diamètre du flux d'écoulement diminue et conduit à la formation d'un cône dit « cône de Taylor ». Lorsque le champ électrostatique est suffisamment intense, le cône s'étire et conduit à la formation de gouttelettes chargées à leur surface positivement ou négativement. Afin d'assister ce processus, un flux d'azote est appliqué parallèlement à l'axe du capillaire d'infusion. Les gouttelettes chargées traversent alors simultanément un gradient de potentiel et un gradient de pression dans la direction du spectromètre de masse. Le diamètre des gouttes est de l'ordre du micromètre. Celui-ci dépend du champ électrique, du débit de la solution, et de la nature du solvant et de la température qui est appliquée dans la source d'ionisation électrospray (température proche de la température de vaporisation du solvant classiquement). Au cours de la progression de l'aérosol, l'évaporation du solvant provoque la diminution de la taille des gouttelettes. Lorsque le rapport charge/surface de la gouttelette devient trop élevé (limite de Raleigh), les répulsions électrostatiques deviennent supérieures aux forces de cohésion de la gouttelette. Elle éclate pour conduire à des gouttelettes plus petites. Par évaporation du solvant et explosions « coulombiennes » successives, le diamètre des gouttelettes diminue fortement. Lorsque leur taille est trop faible, la densité de charge à leur surface devient telle que le champ électrique local, très intense, conduit à la désorption des ions par effet de champ. Une des caractéristiques remarquable de la technique d'électronébulisation consiste en la production d'ions multichargés de type $[M + nH]^{n+}$ en mode d'ionisation positif ou $[M-nH]^{n-}$ en mode d'ionisation négatif pour bon nombre de molécules. Dans notre cas cependant, la nature des espèces ne permettra pas de développer plus d'une charge.

V.3.2.B. Protocole expérimental

L'échantillon est injecté en solution dans le méthanol à l'aide d'un dispositif pousse-seringue à un débit de 2 à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans un capillaire en PEEK de 50 μm de diamètre. L'échantillon arrive ensuite à une aiguille chauffée à 110°C portée à un potentiel de 3800 V. L'ensemble du bloc source est porté typiquement à une température de 85°C. Aucun gaz de

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

désolvatation ni de nébulisation n'est employé. La différence de potentiel entre le cône d'extraction et le cône d'entrée du spectromètre de masse est de 35 V. Ce paramètre est suffisamment faible pour éviter des dissociations « in source ». Les ions produits pendant 4 secondes sont accumulés dans un hexapôle de stockage avant d'être transférés dans la cellule ICR pour y être analysés. Le protocole d'attribution et de traitement des données est identique à celui décrit dans le cadre des études LDI-FTICRMS.

Les ions observés sont de type $[M - H]^-$ ou $[M+H]^+$. De manière alternative, des espèces de faible abondance ont pu être observées sous forme d'adduits sodiques ou potassiques en mode de détection positif et d'adduits chlorures en mode de détection négatif.

V.3.2.C. Analyse en mode de détection positif

Les spectres de masse, cartes de Kendrick et de Van Krevelen sont présentés sur la **Figure V-6** pour les trois extraits. Les spectres de masse résultent de la moyenne de 50 spectres individuels.

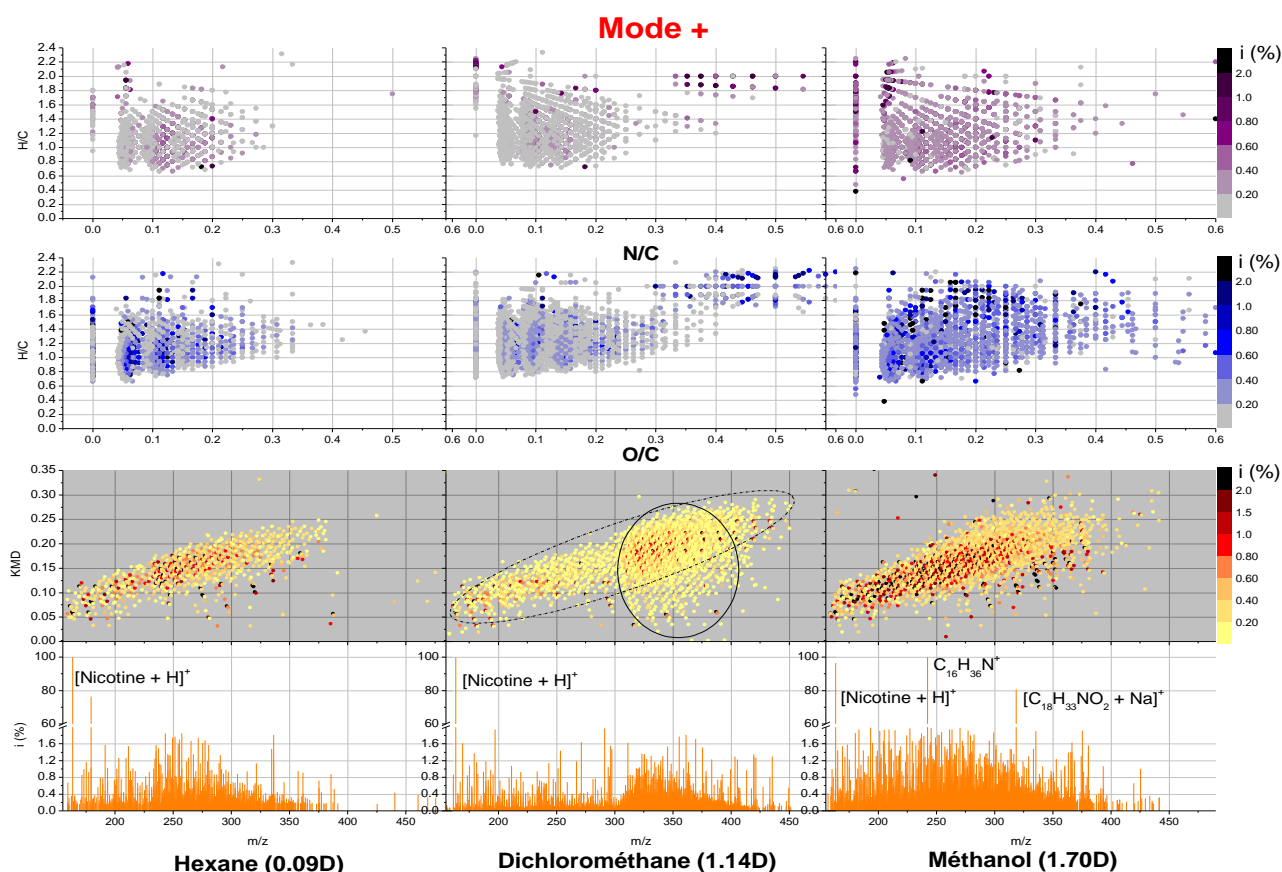


Figure V-6 : Analyses ESI-FTICRMS des extraits hexane, dichlorométhane et méthanol des MSS en mode positif. L'échelle de couleur est proportionnelle à l'abondance relative des ions observés.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

Aux côtés du pic protoné de la nicotine qui est typiquement la principale contribution au TIC, on observe pour les trois solvants employés une grande variété de signaux sur la gamme de rapport m/z comprise entre 150 et 450. Classiquement, l'intensité relative de ces ions n'est pas supérieure à 2 % à l'exception de l'ion $[C_{11}H_{16}N_2+H]^+$ pour l'extrait hexane et de deux signaux attribués à $[C_{16}H_{35}N+H]^+$ et $[C_{18}H_{33}NO_2+Na]^+$ pour l'extrait méthanol.

Pour les trois extraits, des espèces contenant un plus grand nombre d'atomes d'azote mais surtout d'oxygène et un taux d'insaturation plus faible sont observées en ESI par rapport aux résultats obtenus par LDI-FTICRMS à 355 nm. Cela est d'autant plus marqué pour les deux fractions qui sont obtenues avec les solvants les plus polaires (dichlorométhane et méthanol). Ces différences révèlent donc la présence de nouvelles molécules voire de nouvelles classes de molécules. A ce titre, on peut noter l'ion $[C_{16}H_{35}N+H]^+$, qui est indicateur d'une amine totalement saturée. De façon plus générale, la plus forte proportion d'atomes d'azote et d'oxygène et le plus faible taux d'insaturation permettent de penser que les composés mis en évidence de manière spécifique en ESI possèdent une polarité élevée. Il existe cependant des différences sensibles entre les différents extraits.

L'hexane permet de mettre en évidence des molécules à la fois moins azotées et moins oxygénées que les deux autres solvants employés, comme le montre les diagrammes de Van Krevelen de la **Figure V-6**. Le méthanol assure l'extraction de molécules contenant à la fois un grand nombre d'atomes d'oxygène et d'azote. Le comportement de l'extrait dichlorométhane est intermédiaire à ceux obtenus avec l'hexane et le méthanol. Dichlorométhane et méthanol permettent également d'extraire des composés de haut poids moléculaire d'une part mais également plus insaturés que ceux obtenus avec l'hexane. En effet, les valeurs maximales de KMD pour les espèces observées dans les extraits méthanol et dichlorométhane sont systématiquement plus importantes que pour l'hexane. Une partie significative des espèces extraites par le méthanol et le dichlorométhane doit donc être associée à des composés polaires aromatiques voire poly-aromatiques. Une différence significative de ces extraits par rapport à ceux de l'hexane est mise en évidence sur les diagrammes de Van Krevelen. Pour les deux solvants les plus polaires, un nombre important de composés possèdent un rapport H/C proche ou égal à deux voire légèrement supérieur. Cela est d'autant plus significatif que le rapport O/C ou N/C augmente. Ces contributions sont révélatrices de composés très peu insaturés fortement oxygénés et/ou azotés. Il peut par conséquent s'agir de polyols ou de polyamines principalement aliphatiques ou oléfiniques.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

Dans le cadre des polyols, il est raisonnable de penser que ceux-ci trouvent leur origine dans la pyrolyse et/ou combustion de la partie cellulosique du tabac et du papier de la cigarette.

L'extrait dichlorométhane présente également une grande particularité. On observe en effet sur la carte de Kendrick deux distributions distinctes. La première qui s'étend de m/z 150 à 500 pour laquelle les valeurs de KMD augmentent avec la valeur de m/z est comparable à ce qui est observée dans les extraits hexane et méthanol. La seconde distribution est quant à elle spécifique de CH_2Cl_2 . Elle se trouve dans une gamme de rapport m/z comprise entre 300 et 400. Les valeurs de KMD sont comprises entre 0,027 et 0,28. Il s'agit donc de composés appartenant à des familles de structures voisines (ligne horizontale traduisant une périodicité d'un motif CH_2) qui ne diffèrent entre elles que par leur nombre d'insaturation. Cela explique l'augmentation progressive de la valeur de KMD. Les premières familles (valeur faible de KMD) contiennent des composés très fortement aliphatiques alors que les suivantes voient progressivement leur taux d'insaturation augmenter.

V.3.2.D. Analyse en mode de détection négatif

Les spectres de masse, cartes de Kendrick et de Van Krevelen sont présentés sur la **Figure V-7** pour les trois extraits.

Les spectres de masse obtenus pour les trois extraits sont très similaires. Ils apparaissent dominés par trois principales contributions contenant systématiquement deux atomes d'oxygène : $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2 - \text{H}]^-$, $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_2 - \text{H}]^-$ et $[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2 - \text{H}]^-$. Si deux de ces signaux peuvent être attribués aux acides palmitique ($\text{C}_{16} : 0$) et stéarique ($\text{C}_{18} : 0$) ou à leurs isomères, l'ion $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_2 - \text{H}]^-$ est plus délicat à interpréter. Il se doit d'être relatif à un composé fortement polaire au regard de la méthode d'ionisation employée et à sa forte abondance. Il serait envisageable de l'attribuer à un dérivé aromatique de l'acide benzoïque voire un composé phénolique. Les autres signaux observés sont assez intenses et contiennent principalement deux ou trois atomes d'oxygène. Ils sont clairement mis en évidence sur les différentes cartes de van Krevelen $\text{H/C} - \text{O/C}$. Pour l'extrait hexane, les composés contenant deux atomes d'oxygène représentent 64 % du TIC et ceux associant trois atomes d'oxygène, 24%. Un certain nombre d'éléments caractérisent ces composés. Ils présentent de faible taux d'insaturation. En effet sur les cartes de Kendrick, leur valeur KMD est faible (compris entre 0,05 et 0,15) même pour des valeurs de m/z élevées. Cela est confirmé par des valeurs de rapports H/C comprises entre 1,5 et 2. Par ailleurs de très fortes périodicités sont observées. Sur les diagrammes de Kendrick, jusqu'à 12 signaux s'alignent nettement sur des droites

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

parallèles à l'horizontale et révèlent des espèces ne différant que par le nombre de motifs CH_2 . Cette régularité dans la distribution des composés observés dans les différents extraits est également visible sur les cartes de van Krevelen H/C – O/C. Les droites noires, indexées 1 sur lesquelles s'alignent bon nombre de points convergeant vers le point d'abscisse 0 et d'ordonnée 2 sont elles aussi révélatrices de composés issus d'une même famille mais différant par la longueur de la chaîne hydrocarbonée.

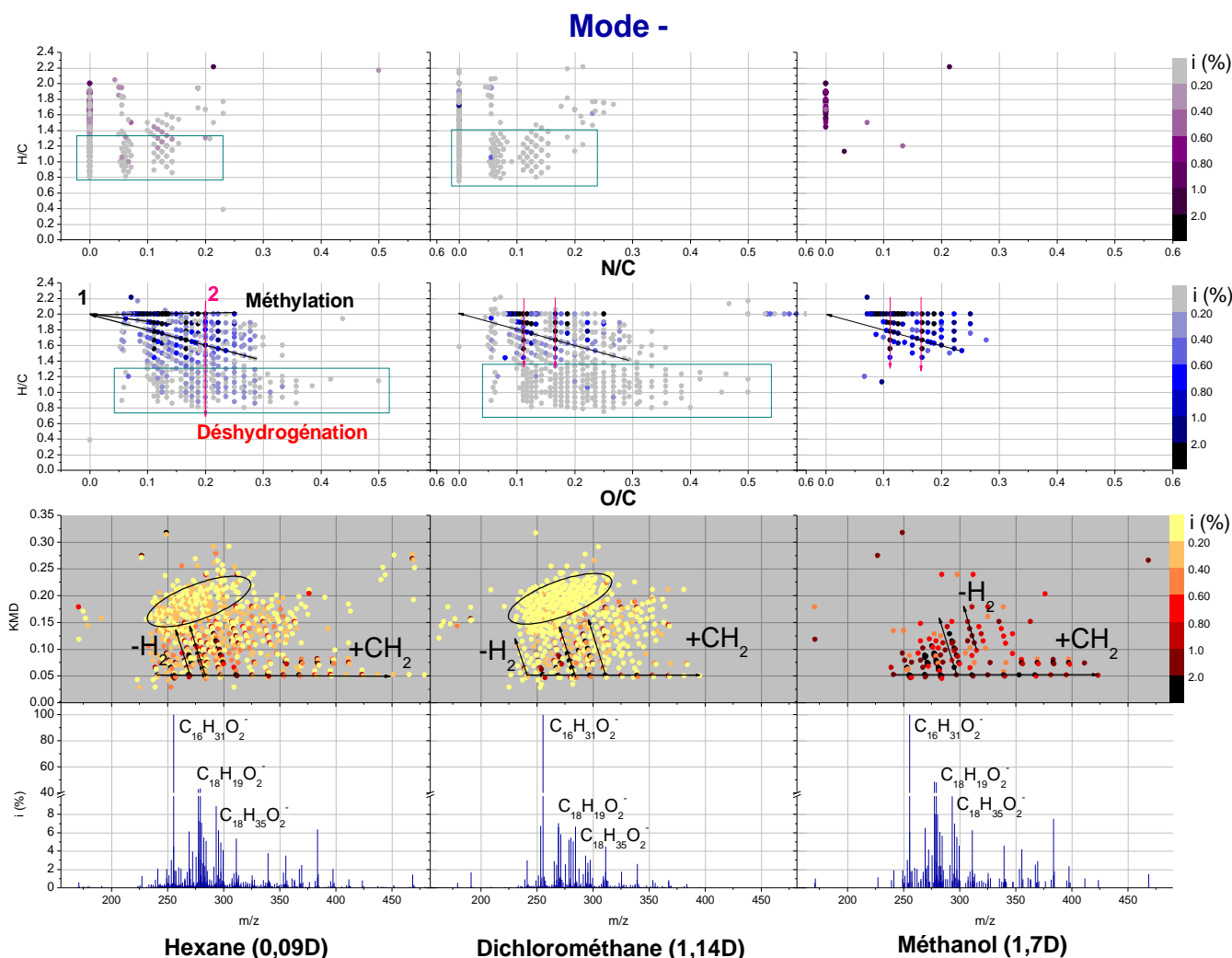


Figure V-7 : Analyses ESI-FTICRMS des extraits hexane, dichlorométhane et méthanol des MSS en mode négatif. L'échelle de couleur est proportionnelle à l'abondance relative des ions observés.

A côté de cette première périodicité, on en observe une seconde sur les deux types de cartes, révélatrice d'un même comportement. L'alignement de certains points sur les cartes de Kendrick d'espèces selon des lignes légèrement penchées par rapport à la verticale doit être associé à des composés possédant le même nombre d'atomes de carbone mais un nombre différent d'insaturation en accord avec des écarts successifs de H_2 . Sur les cartes de van

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

Krevelen H/C – O/C, cette même périodicité est observée sur les lignes parallèles à l'axe des ordonnées (droite rose, indexée 2) pour lesquelles le rapport nombre d'atomes de carbone sur nombre d'atomes d'oxygène est constant mais le nombre d'atomes d'hydrogène diffère. En conséquence, on peut considérer que la plus grande partie des composés observés par ESI en mode de détection négatifs sont des acides gras éventuellement hydroxylés présentant des chaînes hydrocarbonées plus ou moins longues et plus ou moins insaturées.

Ces résultats confirment ceux de Lu *et al.*¹³³ qui ont mis en évidence ces composés dans les MSS par GC/GC/MS. Par ailleurs, la technique ESI est particulièrement adaptée à l'examen de tels composés qui s'ionisent facilement par libération du proton acide extrêmement labile. L'emploi de méthanol pour réaliser l'extraction est particulièrement efficace pour permettre la détection de ces composés puisque seules ces contributions sont observées. Très peu de composés azotés sont en effet mis en évidence alors que les acides gras et/ou les molécules qui leurs sont associés sont observés de manière importante. Très abondants dans l'extrait, ils sont sans doute responsables de phénomènes d'extinction de signal. Ces phénomènes apparaissent moins importants dans les extraits hexane et dichlorométhane pour lesquels une seconde distribution de composés peut être observée. Les composés relatifs à cette seconde distribution contiennent de un à six atomes d'azote et de un à six atomes d'oxygène. Ils sont détectés dans une gamme de rapport m/z comprise entre 220 et 350. Ils contribuent pour moins de 5 % au TIC. Possédant des valeurs importantes de KMD et donc des rapports H/C proches de 1, ils sont fortement insaturés et peuvent être aromatiques voire poly-aromatiques. Ces espèces doivent être rapprochées de celles observées au cours de l'analyse LDI-FTICRMS des MSS.

V.3.3. Conclusion

L'analyse d'extraits par ESI-FTICRMS permet d'observer des classes de molécules différentes de celles jusqu'alors mise en évidence par LDI-MS. Elle est à ce titre complémentaire de ces techniques. Si dans certains cas, des espèces déjà observées en LDI-MS le sont en ESI-FTICRMS, elles ne représentent dans ce cas qu'une faible fraction du courant d'ion total. De manière globale, l'ESI assure l'observation quasi spécifique de classes de molécules polaires généralement peu insaturées possédant un nombre atome d'oxygène et d'azote pouvant être élevé. A ce titre, on peut considérer que cette méthodologie a permis de mettre en évidence les acides gras et les polyols/polyamines non aromatiques présents dans

133 Lu, X.; Cai, J.; Kong, H.; Wu, M.; Hua, R.; Zhao, M.; Liu, J.; Xu, G. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4441-4451.

les MSS. Des analyses complémentaires devront cependant être menées pour compléter ces résultats. Elles pourront porter par exemple sur, sur l'utilisation d'extractions successives des composés des MSS par des solvants à polarité croissante ou encore sur des fractions obtenues par chromatographie liquide préparative. Une extension de cette démarche aux SSS et EXS permettra également de confirmer toute ou partie des conclusions du chapitre précédent.

V.4. Analyse par résonance magnétique nucléaire des MSS et SSS.

V.4.1. Introduction

Le dernier volet de ce chapitre traite de l'analyse de la phase particulaire de fumées de cigarette MSS et SSS par RMN ^1H et ^{13}C . Le but est à nouveau d'obtenir des informations complémentaires afin de caractériser les différents types de fumée de cigarette. Cependant, d'autres objectifs sous-tendent cette démarche. En premier lieu, l'obtention d'informations par une technique alternative à celle par spectrométrie de masse permettra dans une certaine mesure de confirmer toute ou partie des résultats et conclusions jusqu'ici présentés. Dans un second temps, l'analyse RMN permettra également d'obtenir des informations structurales plus ou moins complètes sur certaines molécules présentes dans les MSS et les SSS.

La démarche entreprise consiste d'abord à étudier les fumées de cigarette au moyen des techniques de RMN à une dimension (^1H). Ces premières analyses sont ensuite complétées par des expériences de RMN à deux dimensions hétéro-nucléaires (HSQC) et homo-nucléaires (COSY et TOCSY) pour permettre une étude structurale.

L'étude de deux types de fumées de cigarette (MSS et SSS) est réalisée en vue d'une comparaison. Les résultats obtenus seront également confrontés à l'analyse réalisée par spectrométrie de masse. L'ensemble des mesures a été réalisé en phase liquide et a donc nécessité au préalable une extraction au dichlorométhane suivie d'une concentration et d'une reprise dans le chloroforme deutéré comme cela a été décrit dans le second chapitre de ce manuscrit.

L'ensemble des spectres a été acquis sur un appareil 600 MHz Bruker Avance III au sein du service commun de RMN de l'Université de Lorraine attaché à l'Equipe Méthodologie RMN du laboratoire CRM2. Cette partie de l'étude a bénéficié de l'expertise technique et scientifique du Docteur Mehdi Yemloul et du Professeur Daniel Canet.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

V.4.2. Principes généraux de la RMN

La résonance magnétique nucléaire est clairement reconnue comme étant un outil d'analyse et d'identification très performant dans le contexte des études structurales de molécules organique. Elle repose sur les interactions possibles entre les noyaux des atomes d'une molécule lorsque cette dernière est soumise à un champ magnétique B_0 d'une intensité de plusieurs teslas.

Pour qu'un noyau soit actif et puisse donner lieu à un signal en RMN, la valeur de son spin nucléaire doit être différente de 0. Parmi les noyaux actifs en RMN on retrouve l'atome d'hydrogène et l'atome de carbone 13 dont les spins équivalent $\frac{1}{2}$, d'où l'utilisation courante de cette technique dans l'analyse de molécules organiques.

V.4.2.A. Obtention du signal RMN

Dans le cas où un atome possède un spin nucléaire non nul, le noyau peut alors être associé à un petit aimant caractérisé par un moment magnétique μ (**Figure V-8 , 1**). Celui-ci équivaut au produit d'une constante γ , appelé constante gyromagnétique qui est spécifique du noyau considéré, par la valeur de spin I du noyau comme dans l'équation (22)

$$\mu = \gamma \times I \quad (22)$$

Sous l'action d'un champ magnétique B_0 , l'énergie potentielle E du noyau va s'en trouver modifiée selon l'expression (23)

$$E = -\gamma m B_0 \quad (23)$$

Avec m correspondant au nombre magnétique de spin qui peut prendre $2I+1$ valeurs comprises entre $-I$ et I . De manière à illustrer plus clairement les phénomènes mis en œuvre en RMN, un noyau dont le spin nucléaire est de $1/2$ sera pris comme exemple dans l'ensemble des descriptions qui seront réalisées dans cette partie.

Dans ce cas, deux populations de noyaux d'énergie potentielle E_1 et E_2 correspondants aux deux valeurs permises de m ($1/2$ et $-1/2$) sont distinguables. En présence d'un champ magnétique, il y a donc une levée de dégénérescence des niveaux d'énergies des noyaux possédant des valeurs de m différentes comme illustré sur la **Figure V-8 ,2**. La différence d'énergie entre ces deux états dépend donc à la fois du type de noyau considéré, de par la constante gyromagnétique, et du champ magnétique B_0 .

Pour une population de noyaux donnée, la répartition dans les états d'énergies E_1 et E_2 n'est pas équivalent du fait d'une stabilité légèrement plus importante dans l'état d'énergie

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

de plus faible valeur (E_1). Cet excès de population dans l'état E_1 est responsable de l'apparition de l'aimantation de l'échantillon. Celle-ci est représentée par un vecteur appelé aimantation macroscopique, noté \vec{M}_0 .

Lors d'une expérience de RMN, un second champ électromagnétique B_1 est appliqué perpendiculaire à B_0 à une fréquence ν . Pour qu'une absorption ait lieu, le produit de la constante de Planck par la fréquence de la radiation électromagnétique doit être égal à la différence d'énergie entre les deux niveaux comme formulé dans l'équation (24)

$$h\nu = E_2 - E_1 \quad (24)$$

De cette équation peut être déduite la relation de Larmor (25) qui relie le champ magnétique et la fréquence de la radiation électromagnétique donnant lieu au phénomène de résonance.

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (25)$$

Si les conditions de résonances sont respectées, l'absorption aura pour effet de faire passer une partie des noyaux de l'état d'énergie E_1 vers l'état d'énergie E_2 et donc de modifier le vecteur d'aimantation macroscopique \vec{M}_0 (**Figure V-8, 3**). Ce dernier, orienté initialement dans le sens du champ magnétique, va être basculé d'un angle α dont la valeur peut être contrôlée par la durée d'application du champ électromagnétique. Le retour à l'équilibre de l'aimantation, appelé relaxation, pourra alors être mesuré grâce à des bobines réceptrices placées à proximité de l'échantillon. Cette relaxation aura lieu en un temps variable dépendant du milieu et selon deux processus distincts. Le premier, appelé relaxation transverse, est lié à la perte de cohérence de l'aimantation au cours du temps (T_2) alors que le second correspond au retour à l'équilibre des noyaux passés dans l'état d'énergie supérieur, c'est la relaxation longitudinale (**Figure V-8, 4**) dont la durée est notée T_1 . Ces deux temps de relaxation peuvent avoir un impact sur la largeur des bandes observées et donner des informations sur la nature du milieu analysé.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

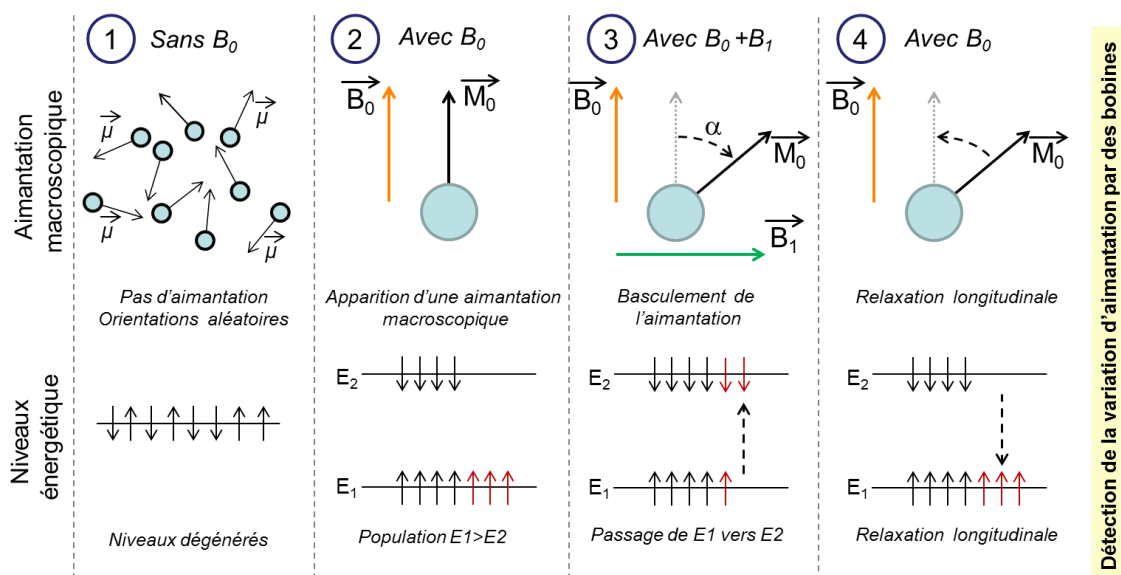


Figure V-8 : Origine du signal RMN pour un noyau de spin 1/2

V.4.2.A. Le déplacement chimique

Dans une molécule, chaque noyau atomique possède un environnement chimique qui lui est propre de par les éléments qui lui sont voisins et les liaisons chimiques dans lesquelles l'atome est engagé. La circulation des électrons au sein de ces liaisons va engendrer un champ magnétique local qui va s'opposer au champ magnétique B_0 . Cette opposition est quantifiée par une constante d'écran σ , d'où l'expression du champ effectif B_{eff} perçu par le noyau reportée ci-dessous (26)

$$B_{\text{eff}} = B_0 - \sigma \quad (26)$$

La conséquence de cet effet d'écran est que la fréquence de résonance des différents noyaux d'une molécule va légèrement varier d'un noyau à l'autre. Ainsi, chaque valeur de σ engendrera une fréquence de résonance différente, c'est l'effet de déplacement chimique. Celui-ci s'exprime en échelle relative (ppm) correspondant à l'écart entre la fréquence de résonance mesurée à une fréquence de référence ($\Delta\nu$) par rapport à la fréquence de travail de l'appareil (ν_{appareil}). La référence utilisée en RMN du proton et du carbone 13 est le tétraméthylsilane (TMS) qui constitue l'origine de l'échelle de déplacement chimique. La fréquence de résonance du TMS étant inférieure à celle de la quasi-totalité des molécules organique, l'échelle de déplacement chimique commencera à 0ppm en RMN du proton et du carbone 13 et les déplacements chimiques observés seront positifs. Lorsqu'un signal est proche de 0ppm, l'environnement chimique impose un effet d'écran très important. On dit alors que le signal est blindé.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

Le déplacement chimique correspond à l'exploitation de base des spectres RMN. Des tables ainsi que des bases de données de déplacement chimique empiriques permettent d'associer une valeur en ppm, à un environnement chimique particulier. Certaines bases de données permettent également de retrouver le spectre RMN pour une molécule donnée.

V.4.3. Etude des MSS

V.4.3.A. Analyse en RMN du proton

Le spectre RMN ^1H , résultat de l'accumulation de 128 mesures, d'un extrait de MSS est présenté sur la **Figure V-9**. Le nombre élevé de signaux observés, notamment dans la zone comprise entre 3,1 et 4,3 ppm, est révélateur de la complexité de l'échantillon analysé. Les différents pics observés sont plus ou moins bien résolus ce qui rend une interprétation fine difficile et plus particulièrement dans la détermination des constantes de couplage et de la multiplicité des signaux. Pour ces raisons, une attribution globale de massifs de manière à dégager les grandes familles de composés est privilégiée.

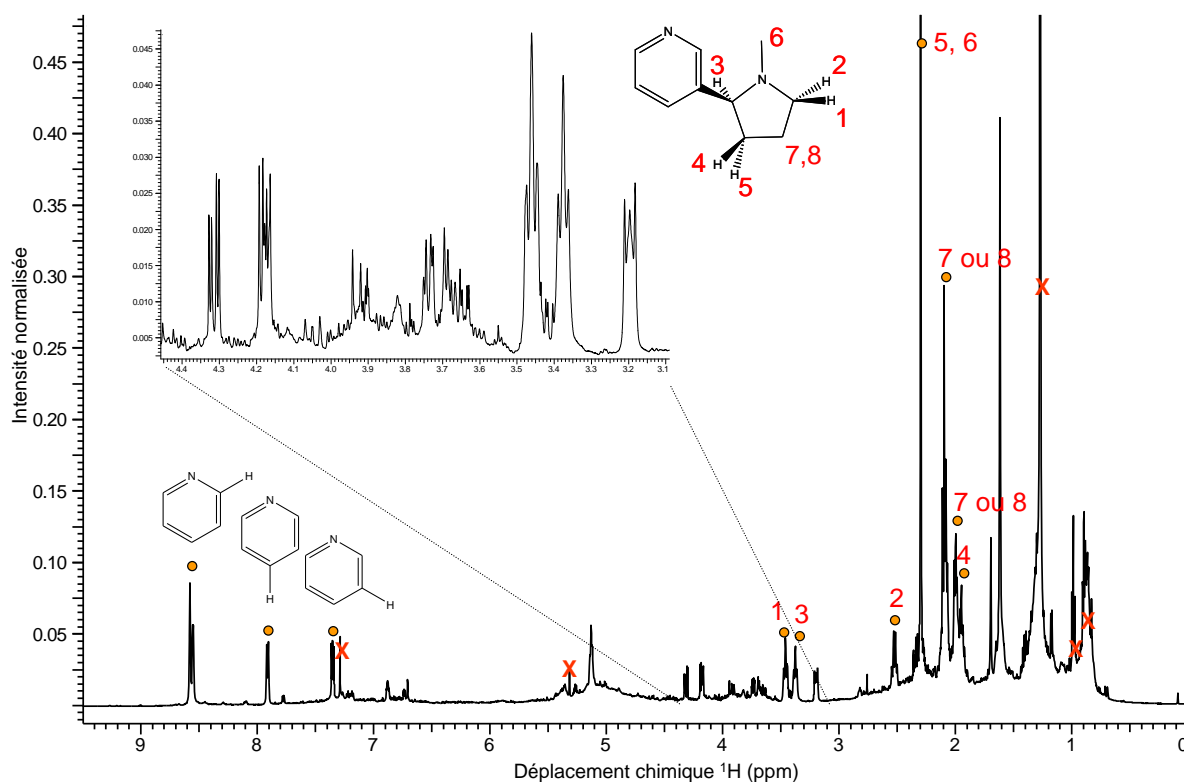


Figure V-9 : Spectre RMN ^1H de MSS obtenu à 600MHz (128 scans). Les pics marqués d'une croix rouge ont été observés dans le blanc de préparation. Les pastilles orange marquent les signaux attribués à la nicotine.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

Les signaux marqués d'une croix rouge sont également présents dans le blanc de préparation et attribués notamment au dichlorométhane (5,32 ppm) et au chloroforme (7,3 ppm). Ils ne sont pas pris en compte dans la suite des interprétations. Deux niveaux d'intensité de signaux sont présents sur le spectre obtenu qui peuvent être indicateurs de composés à des niveaux de concentration différents. Certains signaux (7,9 ppm ; 7,4 ppm ; 5,1 ppm et 3,4 ppm principalement) possèdent un haut rapport signal/bruit. En revanche, d'autres contributions présentent des intensités faibles mais des largeurs de pics plus importantes, c'est le cas par exemple, dans le domaine de déplacement chimique compris entre 4,5 à 5,5 ppm. Elles peuvent être associées à des protons possédant une forte multiplicité et/ou aux protons de molécules peu abondantes.

L'emploi de la base de données SDBS a permis d'identifier un certain nombre de pics intenses. Parmi eux, les signaux à 8,6 ppm ; 7,9 ppm et 7,3 ppm correspondraient aux protons en ortho, para et meta respectivement d'un cycle pyridinique et notamment à ceux contenu dans la molécule de nicotine. Les protons associés au cycle pyrrolidinique de cette même molécule sont également observés dans la gamme de déplacement chimique compris entre 1,8 et 3,5 ppm. L'attribution des signaux relatifs à la nicotine est résumée sur la **Figure V-9**. Notons également que la valeur du déplacement chimique mesurée sur les spectres obtenus peut être légèrement différente des valeurs répertoriées. C'est le cas par exemple du proton 1 de la nicotine qui apparaît dans les bases de données à 3,23 ppm et qui est détecté ici à 3,5 ppm. Ce phénomène est expliqué par Barsanti *et al.* par le caractère de l'atome d'azote du groupement pyrrolidinique.¹³⁴ Le doublet non liant de l'azote peut en fonction des conditions acido-basiques du milieu (rappelons que les fumées de cigarette ont un caractère plutôt acide) conduire à la formation de liaisons datives ou tout au moins de liaisons hydrogène avec une molécule de type acide de Lewis et en particulier avec des protons. Ce comportement a pour effet d'augmenter la valeur du déplacement chimique des protons voisins. Une partie de la nicotine observée n'est donc pas présente sous forme libre.

La forte contribution des protons de la nicotine sur le spectre RMN ¹H est en bon accord avec les résultats obtenus dans l'analyse des MSS par LDI-FTICRMS. L'ion protoné de la nicotine est rappelons-le, l'espèce qui domine de manière extrêmement importante le spectre de masse en mode de détection positif des MSS.

134 Barsanti, K. C.; Luo, W.; Isabelle, L. M.; Pankow, J. F.; Peyton, D. H. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 167-170.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

V.4.3.B. RMN hétéro-nucléaire, proton-carbone 13 (HSQC)

L'expérience HSQC est conduite sur le même échantillon de MSS en utilisant une séquence standard. Elle permet d'obtenir une information sur le déplacement chimique du ^{13}C et des protons qui lui sont liés. La carte obtenue est présentée sur la **Figure V-10**.

Plusieurs domaines peuvent être mis en évidence. Le premier correspond à la zone de déplacements chimiques de composés aromatiques (*zone a*). Il couvre les déplacements chimiques allant de 6 à 9 ppm en ^1H et de 100 à 160 ppm en carbone 13. A l'intérieur de cette zone, plusieurs types de composés peuvent être distingués. On observe en particulier les signaux associés aux pyridines. Une autre zone remarquable correspondant à des protons plus blindés de 6 à 6,9 ppm et présentant des déplacements chimiques en ^{13}C entre 107 et 127 ppm, doit être associée à des composés contenant une structure hétérocyclique aromatique azotée ou oxygénée tels que des pyrroles ou des furanes. Ces groupements peuvent être accolés à un cycle aromatique et être révélateurs de benzofuranes ou d'indoles. Ces composés sont connus pour être présents de manière significative dans la phase particulaire des MSS. Cette première zone peut également correspondre à des molécules aromatiques substituées, dont le déplacement chimique des protons aromatiques ont subi l'influence du substituant. Le **Tableau V-1** résume l'effet de certains d'entre eux sur les protons aromatiques.

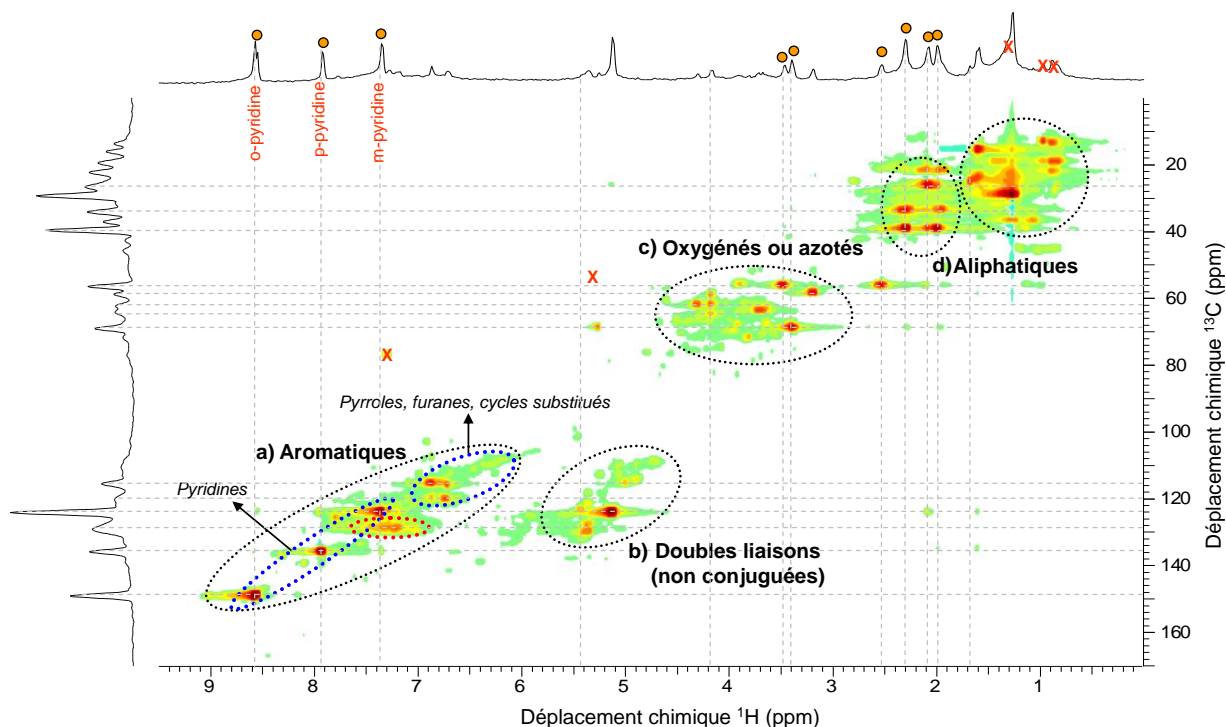


Figure V-10 : Spectre RMN HSQC de MSS obtenu à 600MHz.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

Il apparaît ainsi que certains groupements peuvent blinder de façon importante les protons aromatiques, notamment les fonctions $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{OR}$ et/ou $-\text{OH}$. Pour le groupement hydroxyle ce blindage peut atteindre 0,4 ppm. Ces résultats indiquent la présence, déjà reportée dans la littérature d'amines aromatiques, de composés phénoliques ou alkoxy.

La *zone b* comporte des composés présentant des déplacements chimiques en ^{13}C comparables à ceux des composés aromatiques mais pour lesquels les protons sont bien moins déblindés. (4,5 à 5,8 ppm). Cette zone est typique de structures insaturées à caractère oléfinique. Ces molécules peuvent correspondre à des espèces de la famille des terpènes dont la structure correspond à des enchaînements de motifs isoprène.

Tableau V-1 : Influence de divers substituants sur le déplacement chimique de protons benzéniques (cycle mono-substitué)¹³⁵

Substituant	Position ortho	Position méta	Position para
$-\text{CH}_3$, $-\text{R}$	-0,15	-0,1	-0,1
$-\text{CH}=\text{CH}_2$	+0,2	+0,2	+0,2
$-\text{COOH}$, $-\text{COOR}$	+0,8	+0,15	+0,2
$-\text{CN}$	+0,3	+0,3	+0,3
$-\text{CONH}_2$	+0,5	+0,2	+0,2
$-\text{COR}$	+0,6	+0,3	+0,3
$-\text{SR}$	+0,1	-0,1	-0,2
$-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$	-0,8	-0,15	-0,4
$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	-0,5	-0,2	-0,5
$-\text{I}$	+0,3	-0,2	-0,1
$-\text{CHO}$	+0,7	+0,2	+0,4
$-\text{Br}$	0	0	0
$-\text{NHCOR}$	+0,4	-0,2	-0,3
$-\text{Cl}$	0	0	0
$-\text{NH}_3^+$	+0,4	+0,2	+0,2
$-\text{OR}$	-0,2	-0,2	-0,2
$-\text{OH}$	-0,4	-0,4	-0,4
$-\text{OCOR}$	+0,2	-0,1	-0,2
$-\text{NO}_2$	+1,0	+0,3	+0,4
$-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{Cl}$, etc.	+0,4	+0,1	+0,1

La *zone c* qui correspond à des noyaux relativement déblindés peut également être associée à des groupements en α d'un hétéro-atome. Il peut s'agir de fonctions alcools, méthoxy ou amines.

La *zone d* regroupe des noyaux pour lesquels le ^1H et le ^{13}C sont très fortement blindés. Ils sont donc indicateurs de chaînes hydrocarbonées saturées. Il peut s'agir de groupements alkyles de molécules déjà mises en évidence par spectrométrie de masse comme par exemple les acides gras ou les amines aliphatiques ou encore les chaînes alkylées de composés aromatiques ou oléfiniques. Ils peuvent également correspondre à des alcanes à

135 Kemp, W. *Organic spectroscopy*; Macmillan, 1987.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

longues chaînes tels que les paraffines ou cires mais aussi aux substituants alkyles d'oléfines. La présence de l'ensemble de ces composés est en effet rapportée dans la littérature. A ce titre, la RMN apporte une information complémentaire aux techniques de spectrométrie de masse employées jusqu'alors en donnant accès à des informations sur les composés purement hydrocarbonés saturés ou très faiblement insaturés.

Afin d'affiner les résultats obtenus à l'aide de cette carte, les résultats d'expériences de corrélation de type COSY et TOCSY vont maintenant être décrits.

V.4.3.C. RMN COSY et TOCSY

Les expériences COSY et TOCSY sont basées sur la corrélation qui peut exister entre groupes de protons. L'expérience TOCSY est un outil régulièrement utilisé dans le domaine de l'étude de milieux complexes par RMN. A la différence d'une expérience COSY, une carte TOCSY fait apparaître des taches de corrélation non seulement entre groupes de protons portés par des carbones voisins, mais entre tous les groupes portés par des atomes de carbones successifs. En utilisant conjointement les cartes TOCSY et COSY, il est possible de déterminer quels sont les noyaux plus proches voisins et quels sont ceux qui sont plus éloignés. Il s'agit d'un outil particulièrement intéressant pour l'obtention de données structurales. La carte TOCSY obtenue dans l'étude de la fraction extraite au dichlorométhane des composés présents dans la phase particulière des MSS se trouve sur la **Figure V-11**. Comme pour le paragraphe précédent, différentes zones vont être décrites successivement.

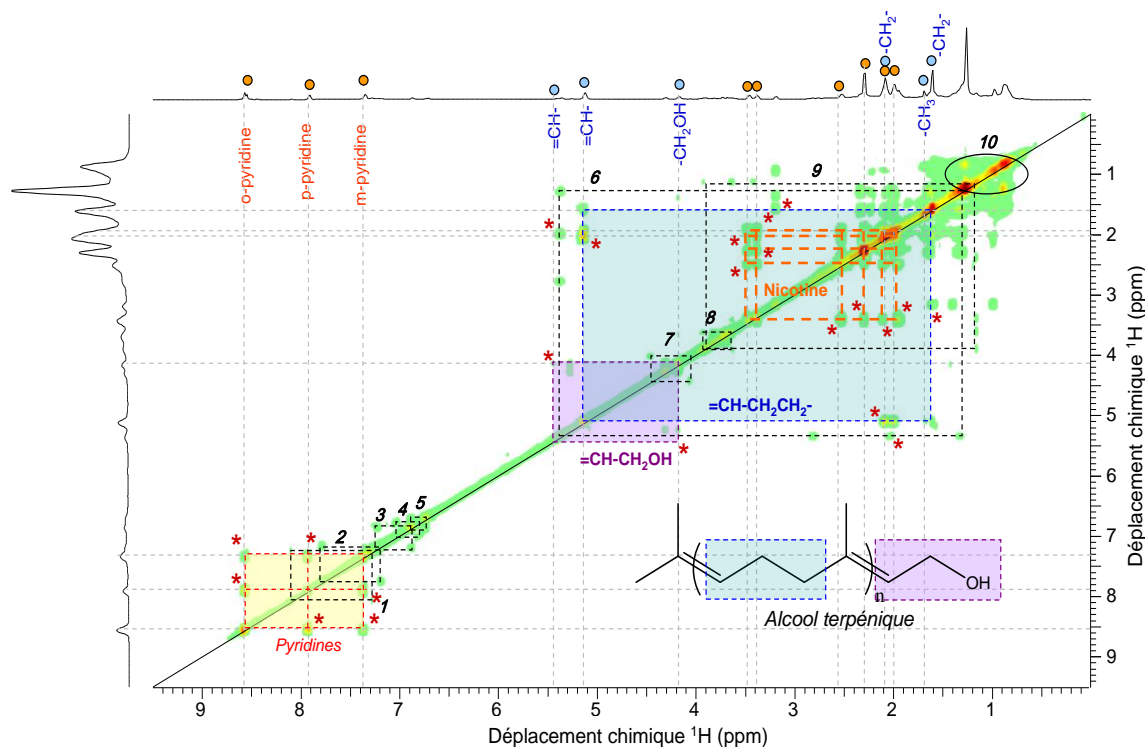


Figure V-11 : Spectre TOCSY de MSS. Les pastilles orange représentent les pics attribués à la nicotine. Les pastilles bleues correspondent à des structures de type alcools terpéniques. Les taches de corrélations présentes en COSY sont marquées d'une étoile rouge (toutes n'ont pas été repérées)

V.4.3.C.a. La zone des aliphatiques et des insaturés non conjugués

Cette zone couvre la zone de déplacements chimiques comprise entre 0 et 5,5 ppm. Plusieurs systèmes sont observés.

En tout premier lieu, il est possible d'attribuer les signaux relatifs à la partie pyrrolidinique de la molécule de nicotine en orange pour les protons compris entre 2 et 3,5 ppm.

Un second domaine en violet, à des déplacements chimiques compris entre 4,2 et 5,4 ppm, peut également être assez facilement isolé. D'après la carte HSQC, il s'agirait d'un proton porté par un carbone se trouvant entre un atome d'oxygène (un alcool par exemple) et un carbone hybridé sp^2 se trouvant dans la zone des doubles liaisons non conjuguées. Le proton porté par le carbone sp^2 (5,4 ppm) ne fait apparaître aucune autre tache de corrélation, il est raisonnable de penser qu'il soit lié à un atome de carbone sans proton, un hétéroatome comme l'oxygène (fonction carbonyle) déblinderait fortement le proton en α (vers 9-10 ppm).

Un autre système remarquable en bleu associe des protons portés par un carbone sp^2 lié à deux groupes de protons successifs à caractère aliphatique de type méthylène ou CH_2 . Un voisin immédiat présent sur la carte COSY à 2,1 ppm et un plus éloigné observé sur la carte

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

TOCSY à 1,6 ppm. De manière similaire à ce qui est observé pour le système violet, le proton situé sur le carbone sp^2 ne présente aucune autre tache de corrélation avec un second proton porté par un carbone sp^2 . En conséquence, la double liaison doit être engagée avec un carbone doublement substitué.

La présence de ce type de structure n'est pas surprenante car il est connu que des terpènes mais aussi des alcools terpéniques sont présents dans les fumées de cigarette. Le solanesol, alcool terpénique à 8 motifs isoprène, est un constituant important de la matière particulaire de la fumée de cigarette.¹³⁶ Présent dans les feuilles de tabac, il est comme la nicotine, transféré de manière intacte dans la fumée.

Beaucoup d'autres systèmes de corrélations sont encore observés (6, 7, 8 et 9), une étude plus fine est requise pour les attribuer.

V.4.3.C.b. La zone des aromatiques.

La zone des composés aromatiques présente également plusieurs systèmes de corrélation. On observe notamment celui du cycle pyridinique de la nicotine en orange au travers des trois taches de corrélation associées aux protons en ortho méta et para de l'azote (7,4 à 8,6 ppm).

Les systèmes 1 et 2 ont un déplacement chimique un peu plus faible et peuvent correspondre à la zone cerclée de rouge sur la carte HSQC (**Figure V-10**). Ces deux systèmes ne présentent qu'une seule tache de corrélation, ce qui veut dire que seulement deux groupes de protons peuvent être corrélés. Différentes situations peuvent être envisagées pour tenter de rendre compte du comportement observé. Elles sont présentées sur la **Figure V-12**.

Le cas 1 correspond à la situation où un cycle aromatique avec un seul élément X stoppe la corrélation. Deux taches de corrélation sont alors attendues. Cette configuration ne peut traduire ce qui est observé expérimentalement. Les conditions minimales pour n'observer qu'une unique tache de corrélation sont d'avoir deux atomes ne portant pas d'atomes d'hydrogène et un élément de symétrie (cas 2). On peut s'affranchir de l'élément de symétrie si dans le cycle, trois atomes ne portant pas d'hydrogène se trouvent placés de manière non consécutive (cas 3). Cette situation peut correspondre à l'accolement d'un cycle aromatique sur le premier et donc être indicateur de composés condensés. Une alternative à cette

136 Tang, H.; Richards, G.; Benner, C. L.; Tuominen, J. P.; Lee, M. L.; Lewis, E. A.; Hansen, L. D.; Eatough, D. J. *Environ. Sci. Technol.* **1990**, *24*, 848-852.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

possibilité est la présence de ces trois atomes au sein d'un noyau aromatique à cinq chaînons (cas 4).

L'ensemble de ces cas de figure peut se traduire par la présence de composés fortement aromatiques voire condensés comme les HAPs par exemple et à la présence de composés hétéro-aromatiques plus ou moins condensés, porteur de groupements pyrrole, furane ou pyridine. Des composés contenant des cycles aromatiques présentant plusieurs hétéroatomes peuvent également être envisagés. Ces résultats corroborent ceux obtenus par LDI-FTICRMS à 266 et 355 nm qui ont permis de définir que des composés fortement insaturés, aromatiques, condensés et contenant ou non des hétéroatomes sont présents dans les MSS.

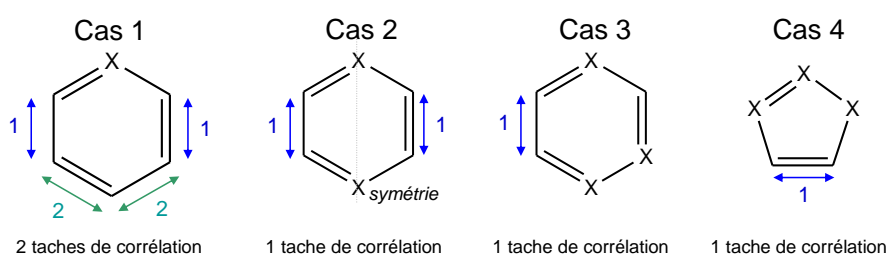


Figure V-12 : Structures possibles de cycles aromatiques donnant lieu à une ou deux taches de corrélations. X est un élément stoppant la corrélation entre protons (azote, oxygène ou carbone sans hydrogène)

V.4.3.D. Conclusion

L'examen de l'extrait au dichlorométhane de la matière particulaire des MSS par RMN ^1H et à l'aide des expériences de corrélation ^1H - ^{13}C de type HSQC ^1H - ^1H de type COSY et TOCSY a permis de mettre en évidence un certain nombre d'éléments. Certains confirment les analyses par spectrométrie de masse d'autres les complètent.

La forte quantité de nicotine dans les MSS est confirmée par RMN tout en précisant qu'une bonne part de celle-ci ne se trouve pas sous forme libre dans la matière particulaire. La mise en évidence de structures conjuguées mais également aromatiques plus ou moins condensées possédant en leur sein des hétéroatomes à l'aide des cartes de corrélation homo ou hétéro nucléaire confirme les analyses réalisées par LDI-FTICRMS à 266 et 355 nm. Les analyses ESI-FTICRMS qui ont permis de mettre en évidence des amines aliphatiques ou faiblement insaturées ainsi que des acides gras à longues chaînes sont confortés par la présence de domaines attribués à des structures fortement aliphatiques.

Ces expériences de RMN mettent également en évidence la présence de composés oxygénés tels que des alcools et notamment des alcools terpéniques mais aussi des composés

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

hydrocarbonés plus ou moins saturés. Ces espèces n'avaient pour l'heure pas encore été mises en évidence par les moyens analytiques jusqu'alors employés.

Dans le cadre de l'analyse des composés présents dans les MSS, la spectrométrie de masse et la RMN apparaissent par conséquent fortement complémentaires. Déjà présentée dans le cadre des études par LDI-FTICRMS, la comparaison des MSS et SSS issus d'une même cigarette va être étendue aux études de ces deux fumées par RMN ^1H et au travers d'expériences de corrélation ^1H - ^{13}C de type HSQC ^1H - ^1H de type COSY et TOCSY.

V.4.4. Comparaisons des MSS et SSS

Les spectres ^1H des MSS et des SSS sont présentés sur la **Figure V-13**.

Une différence significative d'intensité des pics de la nicotine et du solanesol est observée entre le spectre des MSS et celui des SSS. Ceci est cohérent avec la diminution de la contribution de l'ion protoné de la nicotine observée au cours de l'analyse LDI-FTICRMS. Malgré cette diminution, l'intégration réalisée sur l'ensemble de la zone des protons aromatiques (6 à 8,9 ppm) montre une différence notable entre les SSS et les MSS passant de 10,9% pour les SSS à 8,9% dans les MSS. En effet, l'élargissement de certaines contributions dans cette gamme de déplacement chimique prévaut sur la plus faible intensité des pics relatifs au noyau pyridinique de la nicotine notamment, pour accroître globalement l'intensité de ces signaux. Ce résultat est en total cohérence avec l'accroissement de la valeur de DBE moyenne observée dans les deux modes de détection pour les SSS.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

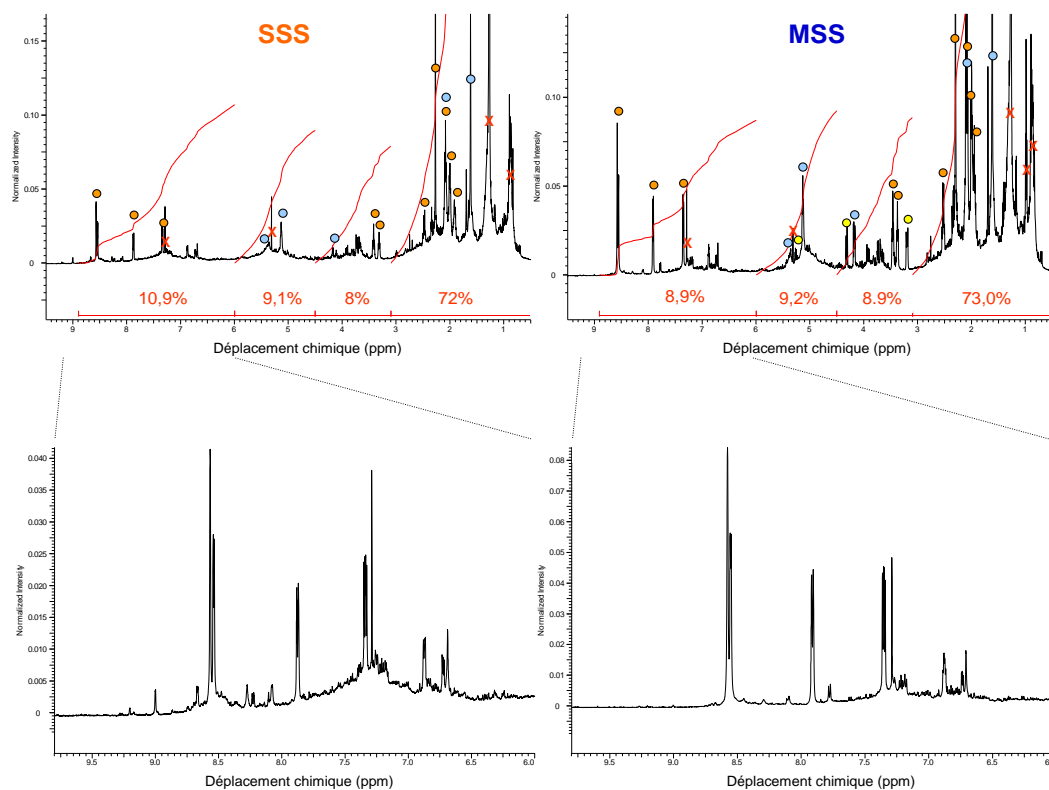


Figure V-13 : Spectres RMN 1H des MSS et SSS et agrandissement de la zone des aromatiques. Les pastilles orange, bleues et jaunes représentent les pics de la nicotine, du solanesol et les pics spécifiques aux MSS, respectivement.

Le domaine relatif aux contributions de protons proches d'un atome d'oxygène ou d'azote (2,1 à 4,5 ppm) semble légèrement plus important dans les MSS. Ces signaux sont à rapporter à des composés peu insaturés mais aussi polaires (présence d'azote et d'oxygène), plus présents comme cela a été montré par spectrométrie de masse dans les MSS. Dans ce domaine sont également observés des pics spécifiques aux MSS (pastilles jaune). Une identification plus précise de ces derniers ainsi qu'une comparaison plus poussée des MSS et SSS a été entreprise au travers d'expériences HSQC présentées sur la **Figure V-14**.

Les pics spécifiques aux MSS sont présents dans les zones des doubles liaisons non conjuguées (pic à 5,2 ppm), dans la zone des protons portés par un carbone en α d'un atome d'oxygène ou d'azote (pic à 4,2 ppm et 3,1 ppm) ainsi que dans la zone des aliphatiques fortement blindés (2,8 ppm). Ces résultats confirment la présence spécifique d'espèces polaires fortement aliphatique dans les MSS.

Pour poursuivre cette analyse des espèces spécifiques aux MSS, les résultats des expériences TOCSY pour les deux types de fumées sont reportés sur la **Figure V-15**.

Le signal à 5,3 ppm correspondant à un proton porté par un carbone sp^2 qui est corrélé avec deux protons proches voisins d'un atome d'oxygène. Le pic à 3,2 ppm est corrélé trois

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

fois avec des signaux relatifs à des protons portés par une structure aliphatique correspondant à une chaîne hydrocarbonée saturée. Cette chaîne peut être un substituant d'un cycle aromatique.

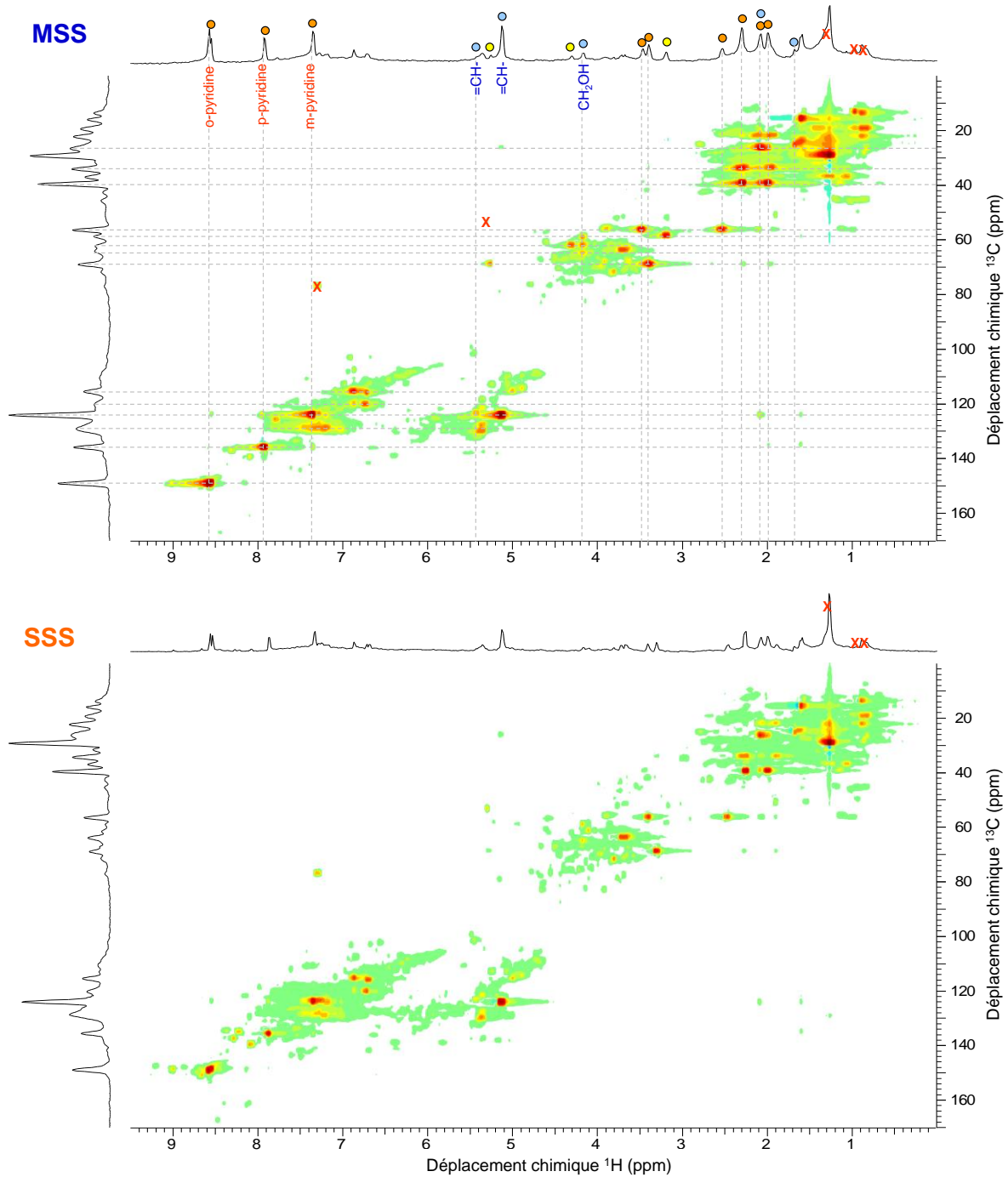


Figure V-14 : Cartes HSQC des MSS et SSS.

Analyses complémentaires des fumées de cigarettes par FTICRMS et RMN

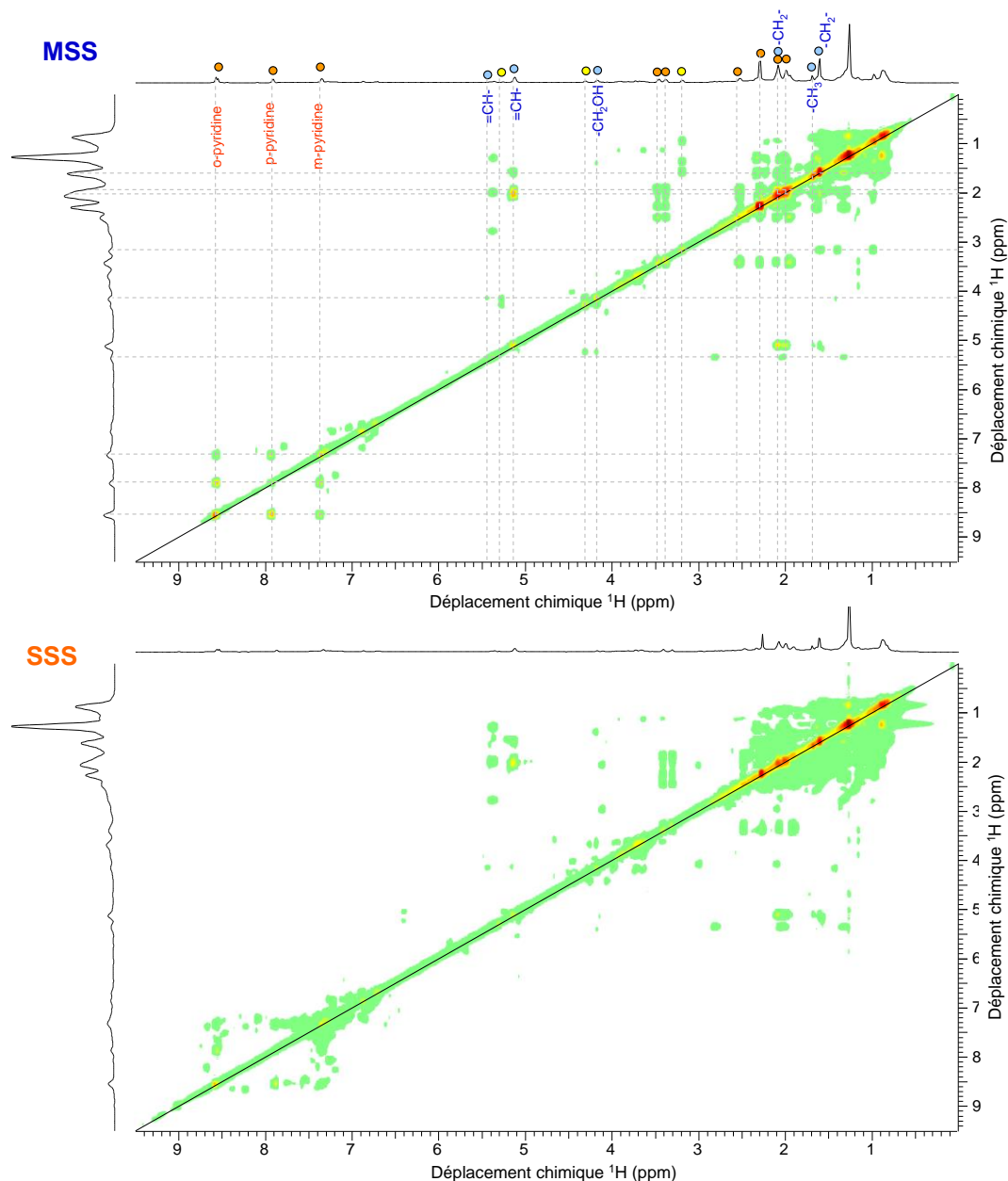


Figure V-15 : Cartes TOCSY des MSS et SSS.

La zone des aromatiques présente un plus grand nombre de système corrélés pour les SSS et regroupe donc plus d'informations. L'ensemble de ces corrélations se traduit par les « lignes » horizontales et verticales que forment les taches de corrélation. Ces lignes englobent les taches de corrélation que forment les protons en ortho, méta et para d'une pyridine. Il est raisonnable de penser que les molécules à l'origine de ces taches de corrélation présentent des modifications structurales du noyau pyridinique comme par exemple la présence de substituants.

V.5. Conclusion

L'emploi de méthodes de caractérisation complémentaires par spectrométrie de masse et par RMN à la LDI-FTICRMS à 355 nm a permis de confirmer certaines des conclusions données dans les chapitres précédents mais aussi d'étendre notre connaissance des fumées de cigarette à l'observation d'autres classes de composés.

L'utilisation d'une longueur d'onde de 266 nm en LDI-FTICRMS a permis d'accéder à des composés plus aromatiques et moins oxygénés. L'utilisation de la technique ESI-FTICRMS combinée à différents solvants d'extraction a mis en évidence la présence de composés polaires tels que des aliphatiques azotés et oxygénés voir fortement oxygénés comme les polyols ou les acides gras dans les MSS. Il est désormais envisageable d'appliquer ces méthodes aux autres types de fumées de cigarettes afin de conforter les interprétations avancées sur la seule base des différences observées entre les fumées en LDI-FTICRMS à 355 nm.

Au-delà de la confirmation de la présence d'une partie des classes de molécules déjà mises en évidence ou des critères de différenciation des MSS et des SSS, les techniques de RMN utilisées dans ce travail de thèse ont permis d'obtenir certaines informations structurales relatives notamment aux terpènes et aux alcools terpéniques comme le solanesol. Par ailleurs, la présence de composés fortement saturés porteurs ou non d'hétéroatomes a pu être spécifiquement démontrée avec cette technique spectroscopique. Les méthodes d'ionisation employées en spectrométrie de masse dans ce travail n'étant pas en mesure de les ioniser efficacement. La richesse des résultats obtenus méritent sans nul doute que les investigations dans ce domaine soient poursuivies en examinant notamment l'ensemble des fumées de cigarette à l'aide d'instruments plus puissants dotés de cryosonde pour accroître la sensibilité. D'autres expériences de RMN, notamment celle de diffusion des molécules en phase liquide, pourraient également permettre d'affiner les résultats obtenus.

Conclusion générale

Conclusion générale

La fumée de cigarette est un milieu complexe par la diversité des phases qui y sont présentes (solide, liquide et gazeuse), par sa réactivité (présences d'espèces radicalaires ou oxydantes), ainsi que par les milliers de molécules présentes. L'analyse de la phase particulaire présente un intérêt toxicologique particulier au regard de l'exposition chronique qui lui est associé tant dans le tabagisme passif qu'actif.

Durant ce travail de thèse, une approche analytique globale de la matière particulaire de différentes fumées de cigarette a été entreprise par différentes techniques dont la spectrométrie de masse.

Dans un premier temps, la méthode de prélèvement des MSS a été mise en place et validée à l'aide de l'analyse quantitative de certains traceurs par GC-MS/MS. La réalisation d'un plan d'expériences a permis d'estimer l'influence de certains paramètres de prélèvement sur la concentration de plusieurs de ces traceurs (nicotine, acénaphthylène, fluorène, benzène et toluène). Ainsi, il a pu être montré que le débit et la durée des bouffées n'ont que peu d'influence sur la concentration des traceurs dans les fumées. Au contraire, le degré hygrométrique de la cigarette ainsi que la dilution par son filtre ont un impact important sur leur concentration. Ces paramètres devront donc être bien contrôlés lors du prélèvement de la matière particulaire.

Une fois la méthode de prélèvement établie, l'analyse des particules provenant des MSS a été réalisée par LDI-FTICRMS à 355 nm. Les conditions ont été ajustées de manière à obtenir une empreinte spectrale la plus représentative possible de la composition chimique tant en mode de détection positif que négatif. Le spectre de masse résultant peut contenir plusieurs centaines de signaux. Pour chacun, une composition élémentaire est attribuée. Pour pouvoir interpréter et comparer des spectres de cette complexité, certains outils de traitements post-acquisition comme les diagrammes de Van Krevelen, les cartes de Kendrick ou les indices d'aromaticité ou les équivalents doubles liaisons ont été utilisés. Une majorité des composés détectés correspondent à des espèces organiques contenant un nombre d'atomes d'oxygène et/ou d'azote plus ou moins important. Elles correspondent principalement à des systèmes aromatiques, voire à des aromatiques condensés. Ces espèces sont détectées essentiellement sous leur forme protonée ou déprotonée suggérant ainsi la présence sur ces

Conclusion générale

molécules de sites de protonation ou d'hydrogènes labiles. Seules les espèces très fortement condensées ont été détectées sous forme radicalaire.

La méthode développée a ensuite été étendue à l'analyse de particules issues d'autres types de fumées, qu'elles soient associées au tabagisme actif ou passif. Tout d'abord, les MSS provenant de deux cigarettes de marque et de provenance géographique différentes (européenne et asiatique) ont révélé une composition assez proche. Certaines particularités en termes d'aromaticité de molécules et d'intensité de familles ont cependant été mises en évidence. Celles-ci peuvent être liées d'une part à la composition du tabac et d'autre part à la morphologie de la cigarette, plus particulièrement de leur filtre. Ceux-ci ont en effet une densité différente laissant penser que les fibres sont plus resserrées dans le cas de la cigarette européenne. De plus, dans le cas de la cigarette européenne, le filtre est percé d'aérations sur sa circonférence permettant une dilution des fumées. L'apport d'oxygène au foyer de combustion est alors modifié, ce qui influence les processus de pyrolyse et de combustion du tabac responsables de la présence de certaines espèces en phase particulaire.

Les spécificités de ces deux types de MSS semblent tout de même faibles en comparaison à la différence observée entre les fumées inspirées et expirées par un fumeur (MSS et EXS). Les expériences, menées avec des fumeurs volontaires, montrent qu'après passage dans l'organisme, les molécules détectées sont bien plus aromatiques et bien moins oxygénées. Ces observations permettent d'envisager des phénomènes de rétention spécifiques dans l'organisme, notamment pour les molécules fortement polaires. La comparaison des EXS provenant de deux fumeurs différents montrent de fortes ressemblances. En effet, énormément de composés sont communs aux deux types de fumées. Les quelques différences observées peuvent, quant à elles, être attribuées à des différences de temps de résidence des fumées dans les voies respiratoires, ce qui aurait pour effet de modifier les phénomènes de transfert de composés des MSS vers l'organisme.

L'analyse des EXS ne représente qu'une partie de la fumée associée au tabagisme passif. L'analyse de la fumée émise au foyer de la cigarette entre deux bouffées (SSS) est nécessaire pour avoir une idée plus exhaustive des molécules auxquelles sont exposés les fumeurs passifs. L'analyse par LDI-FTICRMS dans ce cas, a mis en relief le caractère plus aromatique et moins oxygéné des SSS. En effet, la température au foyer de combustion étant nettement inférieure entre deux bouffées, les molécules issues de la pyrolyse de tabac prennent une part prépondérante dans la composition de ces fumées. De plus, les SSS ne sont pas soumises au passage à travers le filtre de la cigarette et le tabac encore non consommé. En

conséquence, les molécules issues du transfert intact du tabac vers la fumée (comme la nicotine par exemple) ne représente qu'une petite partie des molécules présentes.

En conclusion, la comparaison MSS/SSS et MSS/EXS montre bien que la phase particulaire auquel est exposé le fumeur passif possède une composition différente de celle inhalée par le fumeur actif. Il est donc envisageable que les toxicités de ces deux types de fumées soient différentes.

De manière à évaluer l'apport de techniques complémentaires à la description détaillées des particules issues de fumées de cigarettes, l'analyse des MSS par d'autres techniques d'ionisation associées à la FTICRMS a également été effectuée.

En premier lieu, la longueur d'onde employée de l'ionisation par LDI a été abaissée à 266 nm. Ainsi, certains composés aromatiques condensés purement hydrocarbonés ont été mis en évidence alors qu'ils n'avaient pu être observés sur les MSS en LDI à 355 nm. Une extraction de la matière particulaire collectée sur les filtres à l'aide de différents solvants en vue d'une analyse ESI-FTICRMS a également été réalisée et a permis d'étendre l'analyse des MSS à des classes de molécules moins aromatiques et beaucoup plus oxygénés.

Dans un second temps, l'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) a été mise en œuvre à la fois sur les extraits de particules MSS et SSS. Les différentes expériences 1D du proton et 2D homo ou hétéro-nucléaires ont mis en évidence la présence de molécules aliphatiques de la famille des terpènes comme le solanesol dans les MSS. Cette molécule, tout comme la nicotine, est présente originellement dans le tabac et subit un transfert intact vers la fumée. L'analyse RMN des SSS a montré une diminution de l'intensité des raies associées à ces molécules et une augmentation de celles relatives à des espèces aromatiques, confirmant ainsi les analyses réalisées en LDI-FTICRMS. Une étude plus fine de la zone de déplacements chimiques des composés aromatiques montre que ceux-ci doivent être hétéro-aromatiques et fortement substitués (cycles condensés, fonction amine, hydroxy ou alkyloxy).

Des analyses complémentaires peuvent encore compléter ce travail. L'utilisation des sources d'ionisation telles que la photoionisation ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique peuvent mettre en évidence d'autres classes de molécules. D'autre part, une étude structurale de certains signaux par spectrométrie de masse en tandem permettrait d'affiner certaines hypothèses avancées. Des expériences RMN basées sur la diffusion de molécules en phase liquide pourront permettre de séparer les informations structurales selon la taille des molécules.

Résumé

La fumée de cigarette est reconnue pour être un important polluant des espaces confinés. La matière particulaire qui lui est associée présente un intérêt toxicologique important, tant dans le cadre du tabagisme actif que passif, de part sa forte propension à être retenue dans les voies respiratoires. De plus, les molécules qui les constituent ou qui sont adsorbées à leur surface peuvent être, après leur rétention, transférées à l'organisme sur des périodes de temps importantes ce qui conduit à une exposition prolongée à ces molécules, certaines étant reconnues toxiques. Cependant, les méthodes d'analyses classiques ne permettent qu'une description partielle et ciblée. C'est dans ce contexte qu'a été entrepris ce travail de thèse sur l'étude détaillée de la composition des particules impliquées dans le tabagisme actif et passif.

Dans un premier temps, une méthode de quantification par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS) a été mise en place dans le but de valider le dispositif de fumage et de prélèvement. Ainsi, la reproductibilité des échantillons de fumées de cigarette soumis à l'étude a pu être assurée. En considérant l'évolution de traceurs comme la nicotine ou certains HAPs, un plan d'expérience a permis d'évaluer l'influence sur la nature des prélèvements, de différentes caractéristiques associées aux bouffées (durée, débit d'aspiration) et à la cigarette (taux d'humidité, perméabilité du filtre).

Dans un second temps, les particules de fumées inspirées (MSS), expirées (EXS) et de fumées émises entre deux bouffées (SSS) ont été analysées par spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier couplée à l'ionisation/désorption laser (LDI-FTICRMS) ou électrospray (ESI-FTICRMS). La comparaison MSS/EXS met en évidence une rétention préférentielle dans l'organisme des composés à forte polarité. Les SSS quant à elles révèlent des composés plus aromatiques et moins oxygénés que les MSS. Ce résultat a été associé à une différence de température et à une différence d'apport d'oxygène au niveau du foyer de combustion pendant et entre les bouffées. Ces paramètres influencent en effet la nature du phénomène majoritaire qui s'y produit (phases de pyrolyse et/ou de combustion). Un autre paramètre qui permet d'expliquer les différences observées est l'absence d'interactions des SSS après leur émission. Au contraire, les MSS, qui traversent le tabac encore non-consommé et le filtre de la cigarette, sont en mesure d'entraîner les molécules volatiles qu'ils contiennent telle que la nicotine par exemple. Ces résultats ont été, pour bon nombre, confirmés et complétés par des études réalisées en résonance magnétique nucléaire (RMN).

L'ensemble des résultats obtenus dans l'étude des MSS, SSS et EXS montre que, pour une part importante, fumeur passif et fumeur actif sont exposés à des classes de molécules différentes qui seraient en mesure de conduire à des pathologies spécifiques.

Abstract

Cigarette smoke is one of the more significant indoor contaminant. Cigarette smoke is associated with gas phase and particulate matter phase components. The cigarette smoke particles are of major concern from a toxicological viewpoint, for both active and passive smoking. Indeed a large part of them is retained by the different levels of human respiratory system. As a consequence, the molecules adsorbed on their surface or the molecules, which compose the particle itself, can be slowly released in the organism. In this context, particles involved in active and passive smoking were analyzed and compared.

In a first step, a quantification method by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) for some tracers has been developed and validated to allow the validation of both the smoking and the sampling procedures to be achieved. This is important to be sure that for a given cigarette smoke types, the different samples obtained from different collection procedure are statistically identical. This also allowed the influence of some smoking variables (type and humidity of the cigarette, puff duration, and flow rate of the puff) on the composition of the particles to be evaluated.

In a second step, mainstream cigarette smoke (MSS), sidestream cigarette smoke (SSS) and exhaled cigarette smoke (EXS) particles were analyzed by ion cyclotron resonance mass spectrometry coupled with laser desorption/ionisation (LDI-FTICRMS) or electrospray ion (ESI-FTICRMS). The comparison of MSS and EXS revealed the selective retention of the more polar molecules in the organism. In contrast to what it is obtained for MSS, it was found that the compounds detected in the analysis of SSS particles are highly unsaturated and content low amounts of oxygen and nitrogen atoms. This has to be linked to a lower dioxygen amounts and to a lower temperature between two puffs in the burning zone. Consequently, pyrolytic and combustion phenomena are the main process which induce the formation of SSS and MSS, respectively. Moreover, MSS cross unburned tobacco before to be collected and can induce distillation of some volatile compounds (e.g. nicotine) which are thought to be more saturated and more oxygenated that the compounds generated in the burning zone. These results were confirmed and completed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy analysis.

The results of the MSS, SSS and EXS particle analysis highlight the differences of chemical composition of these different cigarette smokes which is associated to active smoking for the first one and passive smoking for the latter ones. Consequently, differences of toxicological effect can be expected for each kinds of smoking behaviour.

Table des figures

FIGURE I-1 : DOMAINES DE DIMENSION ET DE CONCENTRATION DE DIFFERENTS AEROSOLS.....	I-9
FIGURE I-2 : PROCESSUS ET TERMINOLOGIES ASSOCIES A LA DYNAMIQUE DES AEROSOLS.....	I-10
FIGURE I-3 : FORMATION DE HAPS SUIVANT LES MECANISMES (A) $C_5H_5^\bullet$ ET (B) HACA	I-14
FIGURE I-4 : ZONES ET MECANISMES DE DEPOSITION DE PARTICULES DE DIFFERENTES TAILLES DANS LE SYSTEME RESPIRATOIRE ET PATHOLOGIES ASSOCIEES.	I-16
FIGURE I-5 : FRACTION MOYENNE DE DEPOSITION DANS LES VOIES AERIENNES DE 14 SUJETS POUR 3 AEROSOLS DIFFERENTS.....	I-17
FIGURE I-6 : PRINCIPE D'UN IMPACTEUR EN CASCADE.....	I-19
FIGURE I-7 : REPRESENTATION D'UN DISPOSITIF ATOFMS	I-21
FIGURE I-8 : LES DIFFERENTS TYPES DE FUMEEES DE CIGARETTE	I-23
FIGURE I-9 : COMPARAISON DU TAUX DE SURVIVANTS MASCULINS FUMEUR ET NON FUMEUR.....	I-27
FIGURE I-10 : STRUCTURE DE QUELQUES MOLECULES PRESENTES DANS LE TABAC.....	I-28
FIGURE I-11 : PROCESSUS MIS EN ŒUVRE DURANT LE FUMAGE D'UNE CIGARETTE	I-30
FIGURE I-12 : STRUCTURE MOLECULAIRE DE QUELQUES HAPS A) NAPHTALENE B) BENZO[A]PYRENE C) ANTHRACENE ET, D) ACENAPHTYLENE	I-34
FIGURE I-13 : STRUCTURE DU A) 1-NITRONAPHTALENE ET DU B) 2-NITROFLUORENE	I-35
FIGURE I-14 : STRUCTURE DE QUELQUES AZAARENES : A) QUINOLINE B) BENZO(F)QUINOLINE ET C) 1,7-PHENANTROLINE	I-36
FIGURE I-15 : STRUCTURE DE A) LA NAPHTYLAMINE B) LA BENZIDINE C) L'HARMANE ET D) LE NORHARMANE .	I-37
FIGURE I-16 : STRUCTURE DE A) LA N'-NITROSONORNICOTINE B) LA N'-NITROSOANATABINE C) LA N'-NITROSOANABASINE D) LA NNK ET E) LA NNAL.....	I-38
FIGURE I-17 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL REMPI/SPI-TOFMS POUR L'ANALYSE EN LIGNE DE FUMEEES DE CIGARETTES. (A) CIGARETTE, (B) FILTRE, (C) VANNE, (D) LIGNE DE TRANSFERT CHAUFFEE, (E) BRANCHE DE CONNEXION, (F) FILTRE A PARTICULES, (G) VANNE DE CONTROLE DU DEBIT, (H) POMPE A MEMBRANE.....	I-44
FIGURE I-18 : SPECTRE RMN 1H DE DOM.....	I-46
FIGURE I-19 : ANALYSE DE SSS PAR (A) LDI-MS, 266 NM ET (B) L2-MS, DESORPTION PAR LASER 10,6 μM ET IONISATION PAR LASER 266NM.....	I-48
FIGURE I-20 : COMPARAISON D'UN SPECTRE DE MASSE DE NOM EN HAUTE ET BASSE RESOLUTION.....	I-49
FIGURE II-1 : ESTIMATION DE LA DILUTION PAR LE FILTRE DE LA CIGARETTE A	II-55
FIGURE II-2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF DE PRELEVEMENT	II-56
FIGURE II-3 : DESCRIPTION DES DIFFERENTES PHASES D'UN PRELEVEMENT.....	II-58
FIGURE II-4 : PRINCIPE DE L'EVAPORATION AU TURBOVAP	II-60
FIGURE II-5 : CHROMATOGRAMME D'UN ECHANTILLON CONTROLE DE BTEX A 100 NG/ML OBTENU EN CG-FID SUR UNE COLONNE WAX (BLEU) ET 502.2 (VERT)	II-65
FIGURE II-6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN PIEGE A IONS.....	II-67
FIGURE II-7 : ZONES DE STABILITE DES IONS SELON Z ET R (GAUCHE) ET AGRANDISSEMENT D'UNE ZONE DE PIEGEAGE EFFICACE DES IONS (DROITE) DANS UN PIEGE IONIQUE.....	II-69
FIGURE II-8 : CHROMATOGRAMME D'UN ECHANTILLON DE CONTROLE A 100 NG/ML POUR LES HAP (BLEU) ET 6,4 $\mu G/ML$ POUR LA NICOTINE (ORANGE). DANS LES DEUX CAS, LES ETALONS INTERNES SONT PRESENTS A 100 NG/ML	II-71

FIGURE II-9 : CHROMATOGRAMMES DES COMPOSES ADSORBES A LA SURFACE DE PARTICULES DE MSS ET EXTRAITS DU FILTRE DE QUARTZ. SPECTRES DE MASSE EN TANDEM DE DIFFERENTS HAPS EMPLOYES COMME TRACEURS A ET DE LA NICOTINE B.....	II-72
FIGURE II-10 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DES ESSAIS POUR LA VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE DE LA NICOTINE. LES POINTS BLEUS REPRESENTENT LES ESSAIS DES ETALONS, LES RONDS VERTS REPRESENTENT LES ESSAIS DOPES, LES POINTS JAUNES SONT LES RENDEMENTS DE RECUPERATION DE LA NICOTINE. LA LIGNE NOIRE EST LE MODELE LINEAIRE ET LES LIGNES POINTILLEES CORRESPONDENT AUX INCERTITUDES DE TOUT LE PROCEDE DE PREPARATION D'ECHANTILLONS	II-76
FIGURE II-11 : PRINCIPE DU TEST DE COMPARAISON DE VARIABLE POUR EVALUER L'HOMOGENEITE DE PLUSIEURS POPULATIONS.....	II-77
FIGURE II-12 : PERIODE PRELIMINAIRE DE LA CARTE DE CONTROLE POUR LA MESURE QUANTITATIVE DE LA NICOTINE PAR GC-MS/MS	II-78
FIGURE II-13 : ETUDE DES POINTS CENTRAUX DE LA NICOTINE	II-83
FIGURE II-14 : RESULTATS DU PLAN D'EXPERIENCES, LES FACTEURS EVALUES SONT L'EFFET DU DEBIT (1) ET DE LA DUREE (2) DE LA BOUFFEE AINSI QUE LA VENTILATION (3) ET LE CONDITIONNEMENT/HYGROMETRIE (4) DE LA CIGARETTE. LES RADARS (EN HAUT DE LA FIGURE) REPRESENTENT LES EFFETS RELATIFS DES DIFFERENTS FACTEURS EN %. LES ROND GRIS ET CERCLES NOIRS REPRESENTENT LES LIMITES DE SIGNIFICATIVITE (LS) DES EFFETS POUR LES DIFFERENTES MOLECULES. L'EFFET DE L'INTERACTION 1234 EST TOUJOURS NON-SIGNIFICATIF	II-85
FIGURE III-1 : PRINCIPE DU MOUVEMENT CYCLOTRONIQUE.	III-93
FIGURE III-2 : SPECTROMETRE DE MASSE FTICR EXPLORER QFT-9 (VARIAN).....	III-94
FIGURE III-3 : SCHEMA DU SPECTROMETRE PROMALDI-FTICR-MS.....	III-94
FIGURE III-4 : SCHEMA SYNOPTIQUE D'UNE SEQUENCE D'ANALYSE FTICR-MS EN UTILISANT LE MODULE PROMALDI.	III-95
FIGURE III-5 : ETAPES DE TRAITEMENT DU SIGNAL POUR L'OBTENTION D'UN SPECTRE DE MASSE A PARTIR D'UN INTERFEROGRAMME.	III-98
FIGURE III-6 : SPECTRE DE MASSE LDI-FTICRMS DE MSS DE LA CIGARETTE A EN MODE POSITIF.	III-99
FIGURE III-7 : CALIBRATION PSEUDO-INTERNE A L'AIDE DE GRAPHITE POUR UN SPECTRE DE MSS DE LA CIGARETTE A EN MODE DE DETECTION NEGATIF.	III-101
FIGURE III-8 : PERFORMANCES OBTENUES EN LDI-FTICRMS EN MODE DE DETECTION POSITIF POUR LES MSS DE LA CIGARETTE A. LE GRAPHIQUE DU BAS REPRESENTE L'ERREUR EN PPM SUR LES COMPOSITIONS ELEMENTAIRES ASSOCIEES A CHAQUE PIC. LA GRAPHIQUE DU MILIEU EST LA RESOLUTION DE CHAQUE PIC DE MASSE AVEC LA RESOLUTION MINIMALE POUR DISTINGUER LA CONTRIBUTION D'UN ¹² CH ET CELLE D'UN ¹³ C (LIGNE ROUGE). LE GRAPHIQUE SUPERIEUR REPORTE L'INTENSITE THEORIQUE DES ¹³ C DES IONS ATTRIBUES ET LE SEUIL DE DETECTION (S/N=3) EN ROUGE.	III-102
FIGURE III-9 : INDICE D'AROMATICITE DES COMPOSES DETECTES AU COURS DE L'ANALYSE EN MODE POSITIF DE MSS DE LA CIGARETTE A. LE SPECTRE DE MASSE ASSOCIE EST PRESENTE SUR LA FIGURE III-6. ...	III-104
FIGURE III-10 : REPARTITION PAR FAMILLES DES COMPOSES DETECTES LORS DE L'ANALYSE EN IONS POSITIFS PAR LDI-FTICRMS DES MSS DE LA CIGARETTE A	III-105
FIGURE III-11 : DIAGRAMME DE VAN KREVELEN OBTENU PAR ANALYSE EN MODE POSITIF DE MSS DE LA CIGARETTE A. LE SPECTRE DE MASSE ASSOCIE EST PRESENTE SUR LA FIGURE III-6.	III-106

FIGURE III-12 : CARTE DE KENDRICK OBTENUE PAR ANALYSE EN MODE POSITIF DE MSS DE LA CIGARETTE A. LE SPECTRE DE MASSE ASSOCIE EST PRESENTE SUR LA FIGURE III-6.	III-108
FIGURE III-13 : ANALYSE DES MSS EN MODE DE DETECTION POSITIF POUR DEUX CONDITIONS DE TRANSFERT DES IONS. EN ORANGE POUR UNE AMPLITUDE DE LA RF DE 140 V ET EN BLEU POUR UNE AMPLITUDE DE 275 V.	III-109
FIGURE III-14 : ANALYSE DES MSS EN MODE DE DETECTION NEGATIF POUR DEUX CONDITIONS DE TRANSFERT DES IONS. EN ORANGE POUR UNE AMPLITUDE DE LA RF DE 140 V ET EN BLEU POUR UNE AMPLITUDE DE 275 V.	III-110
FIGURE III-15 : ANALYSE DES MSS EN MODE DE DETECTION NEGATIF POUR TROIS VALEURS D'ENERGIE LASER.	III-111
FIGURE III-16 : INFLUENCE DE L'ENERGIE LASER LORS DE L'ANALYSE DES MSS EN MODE DE DETECTION POSITIF SUR LA DISTRIBUTION DES ESPECES OBSERVEES.	III-113
FIGURE IV-1 : SPECTRE DE MASSE DES MSS DE LA CIGARETTE A (HAUT) ET B (BAS) EN MODE DE DETECTION POSITIF.	IV-120
FIGURE IV-2 : DIAGRAMME DE VENN DU NOMBRE D'IONS POSITIFS COMMUNS ET SPECIFIQUES POUR LES CIGARETTES A ET B AINSI QUE LES DBE MOYENNES DE CHAQUE ZONE (HORS CONTRIBUTION ¹³ C).	IV-121
FIGURE IV-3 : ANALYSE DES SPECTRES DE MASSE DE MSS POUR LA CIGARETTE A (BLEU FONCE) ET B (BLEU CLAIR)	IV-122
FIGURE IV-4 : INTENSITE NORMALISEE DES DIFFERENTES CLASSE DE COMPOSES OBSERVES DANS L'ETUDE DE LA MATIERE PARTICULAIRE DES MSS DES CIGARETTES A ET B.	IV-124
FIGURE IV-5 : SPECTRE DE MASSE DES EXS DU FUMEUR F EN MODE POSITIF.	IV-127
FIGURE IV-6 : DIAGRAMME DE VENN DU NOMBRE D'IONS POSITIFS COMMUNS ET SPECIFIQUES POUR LES MSS ET EXS AINSI QUE DES DBE MOYENNES DE CHAQUE ZONE (HORS CONTRIBUTION ¹³ C).	IV-128
FIGURE IV-7 : ANALYSE GLOBALE DES SPECTRES DE MASSE DE MSS (BLEU) EXS (VERT)	IV-130
FIGURE IV-8 : INTENSITE NORMALISEE DES DIFFERENTES CLASSES DE COMPOSES OBSERVES DANS L'ETUDE DE LA MATIERE PARTICULAIRE DES MSS ET DES EXS.	IV-131
FIGURE IV-9 : DIAGRAMME DE VENN DES IONS POSITIFS COMMUNS ET SPECIFIQUES AUX EXS DE DEUX FUMEURS DIFFERENTS (HORS CONTRIBUTIONS ¹³ C)	IV-133
FIGURE IV-10 : CLASSIFICATION DES FAMILLES CHIMIQUES POUR LES EXS V ET F	IV-134
FIGURE IV-11 : REPRESENTATION DES ESPECES SPECIFIQUES AUX FUMEEES EXPIREES DE CHAQUE FUMEUR DANS LES DEUX MODES DE DETECTION.	IV-135
FIGURE IV-12 : SPECTRE DE MASSE DES SSS DE LA CIGARETTE A EN MODE POSITIF.	IV-137
FIGURE IV-13 : DIAGRAMME DE VENN DES IONS POSITIFS COMMUNS ET SPECIFIQUES AUX MSS ET SSS (HORS CONTRIBUTIONS ¹³ C)	IV-138
FIGURE IV-14 : ANALYSE GLOBALE DES SPECTRES DE MASSE DE MSS (BLEU) SSS (ORANGE).	IV-139
FIGURE IV-15 : CLASSIFICATION DES FAMILLES CHIMIQUES POUR LES EXS V ET F.	IV-140
FIGURE IV-16 : ETUDE DES COMPOSES DE TYPE C _x H _y N ₂ O ₀₋₅ ^{(*)+} DANS LES MSS (GAUCHE) ET LES SSS (DROITE)	IV-141
FIGURE IV-17 : DIAGRAMME DE VENN DES ESPECES COMMUNES ET SPECIFIQUES AUX MSS, SSS ET EXS EN MODE DE DETECTION POSITIF.	IV-144

FIGURE V-1 : SPECTRES DE MASSE ET CARTES DE KENDRICK EN LDI–FTICRMS EN MODE NEGATIF (GAUCHE) ET POSITIF (DROITE) DES MSS A 266 NM (ROSE) ET 355 NM (BLEU).....	V-149
FIGURE V-2 : REPARTITION EN DIFFERENTES FAMILLES DES COMPOSES DETECTES A 355 ET 266NM.	V-149
FIGURE V-3 : DIAGRAMMES DE VAN KREVELEN DES ESPECES DETECTEES DANS L’ANALYSE DES MSS PAR LDI–FTICRMS A 266 NM (ROUGE) ET 355 NM (BLEU) EN MODE POSITIF ET NEGATIF.	V-150
FIGURE V-4 : DIAGRAMMES DE VENN DES IONS POSITIFS SPECIFIQUES ET COMMUNS A L’ANALYSE PAR LDI–FTICRMS DES MSS A 266 ET 355 NM. POUR CHAQUE DOMAINE, LE NOMBRE DE COMPOSES ET LA VALEUR MOYENNE DE DBE EST DONNEE.	V-151
FIGURE V-5 : PRINCIPE DE L’IONISATION PAR ELECTRONEBULISATION (ESI)	V-152
FIGURE V-6 : ANALYSES ESI-FTICRMS DES EXTRAITS HEXANE, DICHLOROMETHANE ET METHANOL DES MSS EN MODE POSITIF. L’ECHELLE DE COULEUR EST PROPORTIONNELLE A L’ABONDANCE RELATIVE DES IONS OBSERVES.....	V-154
FIGURE V-7 : ANALYSES ESI-FTICRMS DES EXTRAITS HEXANE, DICHLOROMETHANE ET METHANOL DES MSS EN MODE NEGATIF. L’ECHELLE DE COULEUR EST PROPORTIONNELLE A L’ABONDANCE RELATIVE DES IONS OBSERVES.....	V-157
FIGURE V-8 : ORIGINE DU SIGNAL RMN POUR UN NOYAU DE SPIN 1/2	V-162
FIGURE V-9 : SPECTRE RMN ¹ H DE MSS OBTENU A 600MHZ (128 SCANS). LES PICS MARQUES D’UNE CROIX ROUGE ONT ETE OBSERVES DANS LE BLANC DE PREPARATION. LES PASTILLES ORANGE MARQUENT LES SIGNAUX ATTRIBUES A LA NICOTINE.	V-163
FIGURE V-10 : SPECTRE RMN HSQC DE MSS OBTENU A 600MHZ.....	V-165
FIGURE V-11 : SPECTRE TOCSY DE MSS. LES PASTILLES ORANGE REPRESENTENT LES PICS ATTRIBUES A LA NICOTINE. LES PASTILLES BLEUES CORRESPONDENT A DES STRUCTURES DE TYPE ALCOOLS TERPENIQUES. LES TACHES DE CORRELATIONS PRESENTES EN COSY SONT MARQUEES D’UNE ETOILE ROUGE (TOUTES N’ONT PAS ETE REPEREES)	V-168
FIGURE V-12 : STRUCTURES POSSIBLES DE CYCLES AROMATIQUES DONNANT LIEU A UNE OU DEUX TACHES DE CORRELATIONS. X EST UN ELEMENT STOPPANT LA CORRELATION ENTRE PROTONS (AZOTE, OXYGENE OU CARBONE SANS HYDROGENE).....	V-170
FIGURE V-13 : SPECTRES RMN 1H DES MSS ET SSS ET AGRANDISSEMENT DE LA ZONE DES AROMATIQUES. LES PASTILLES ORANGE, BLEUES ET JAUNES REPRESENTENT LES PICS DE LA NICOTINE, DU SOLANESOL ET LES PICS SPECIFIQUES AUX MSS, RESPECTIVEMENT.....	V-172
FIGURE V-14 : CARTES HSQC DES MSS ET SSS.	V-173
FIGURE V-15 : CARTES TOCSY DES MSS ET SSS.....	V-174

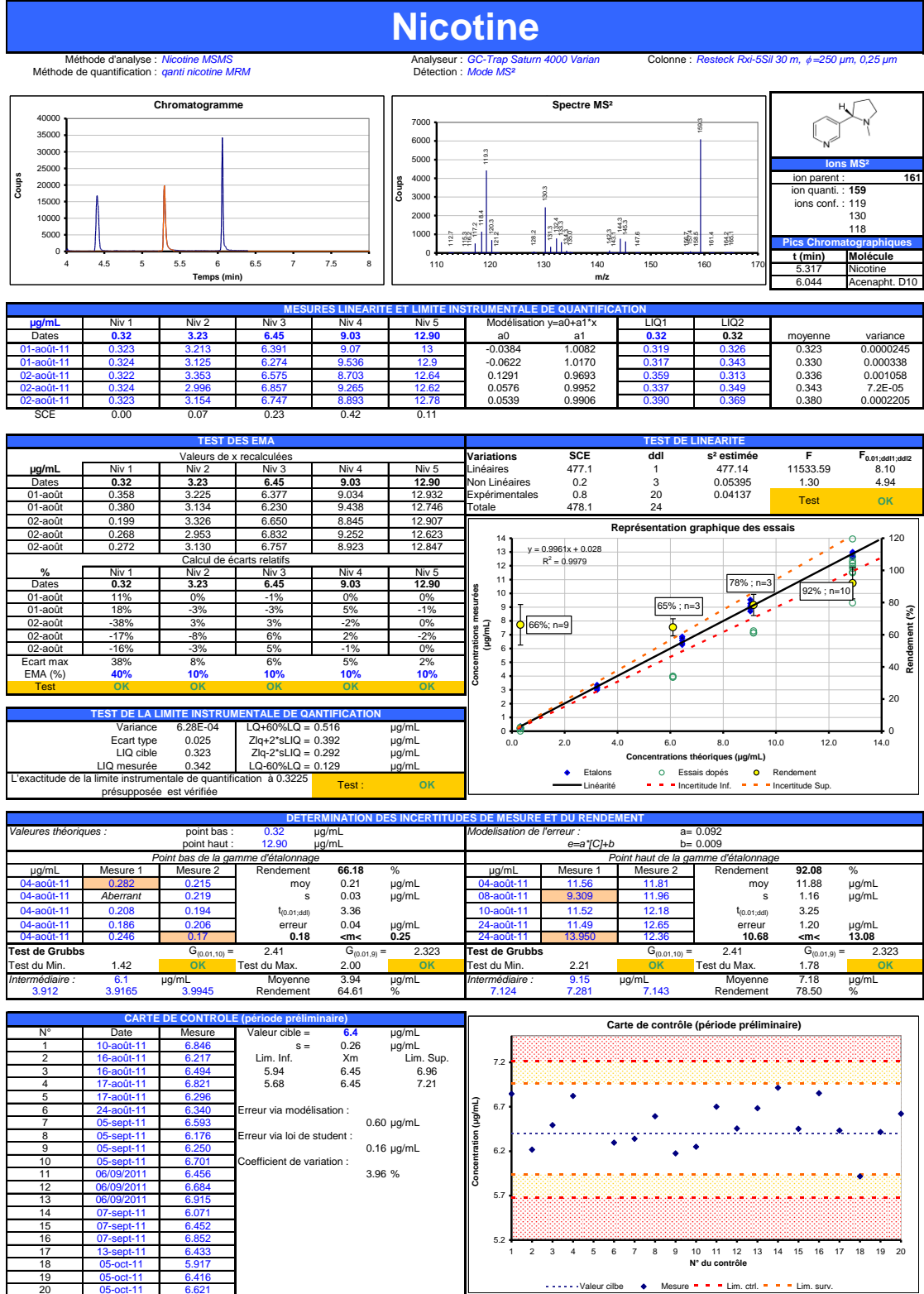
Table des tableaux

Tableau I-1 : Bilan bibliographique des travaux menés au cours de la dernière décennie dans le cadre de l'analyse des fumées de cigarette.....	I-41
Tableau II-1 : Comparaison des masses et des dimensions de deux cigarettes testées par un test de Student bilatéral au risque alpha de 1%. Le nombre d'individus retenus pour chaque type de cigarette est n = 6.....	II-54
Tableau II-2 : Programme de température pour l'analyse GC-MS/MS de la nicotine et des HAPs.....	II-64
Tableau II-3 : Temps de rétention du benzène, du toluène et du bromofluorobenzène (étalon interne) sur les deux colonnes chromatographiques employées.....	II-66
Tableau II-4 : Segments GC-MS/MS pour l'analyse de la nicotine, de 12 HAPs et méthyl-HAPs.....	II-71
Tableau II-5 : Vérification des EMA dans le cas de la nicotine	II-74
Tableau II-6 : Vérification de la linéarité du modèle dans le cas de la nicotine.....	II-75
Tableau II-7 : Vérification de l'homogénéité des rendements de récupération de la nicotine .	II-77
Tableau II-8 : Dénomination des facteurs et des niveaux du plan d'expériences.....	II-83
Tableau II-9 : Test de reproductibilité des essais réalisés sur plusieurs jours	II-84
Tableau II-10 : Estimation de la perte de quantité traceur liée à la ventilation/dilution calculée par le plan d'expérience	II-85
Tableau V-1 : Influence de divers substituants sur le déplacement chimique de protons benzéniques (cycle mono-substitué).....	V-166

Annexes

Annexes

Annexe I : Résultats de la validation de la méthode de quantification de la nicotine.



TEST DE LA LIMITE INSTRUMENTALE DE QUANTIFICATION

DETERMINATION DES INCERTITUDES DE MESURE ET DU RENDEMENT

CARTE DE CONTROLE (période préliminaire)

Carte de contrôle (période préliminaire)

Annexes

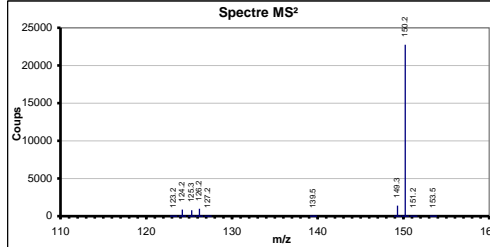
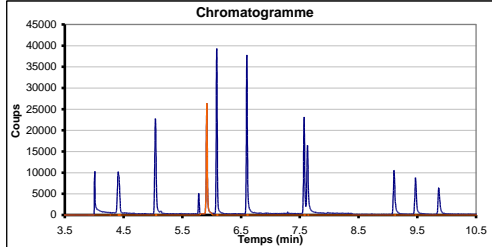
Annexe II : Résultats de la validation de la méthode de quantification de l'acénaphthylène.

Acénaphthylène

Méthode d'analyse : HAP d msms etalon
Méthode de quantification : quanti 2 HAP léger MRM

Analyseur : GC-Trap Saturn 4000 Varian
Détection : Mode MS²

Colonne : Resteck Rxi-5Sil 30 m, φ=250 μm, 0,25 μm



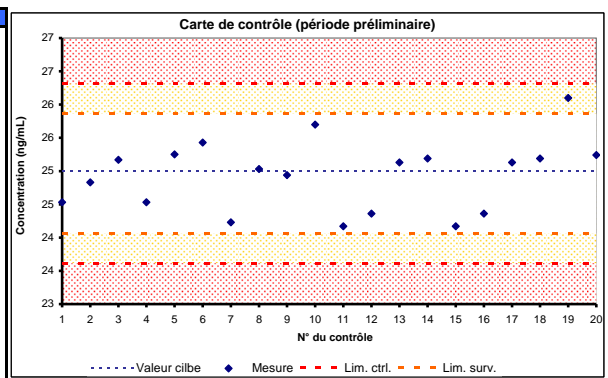
Ions MS²	
ion parent :	152
ion quanti. :	150
ions conf. :	126 149 125
Pics chromatographique	
t (min)	Molécule
5.906	Acénaphthylène

MESURES LINEARITE ET LIMITE INSTRUMENTALE DE QUANTIFICATION											
ng/mL	Niv 1	Niv 2	Niv 3	Niv 4	Niv 5	Modélisation y=a0+a1*x		LIQ1	LIQ2	moyenne variance	
Dates	5	15	30	60	100	a0	a1	5.00	5.00		
18-juil-11	4.953	15.64	28.98	61.66	97.33	0.6212	0.9784	3.181	3.646	3.414	0.1081125
19-juil-11	5.012	14.96	29.69	59.55	101.8	-0.5105	1.0170	4.794	4.966	4.880	0.014792
20-juil-11	4.972	15.31	29.73	61	97.94	0.5381	0.9822	3.338	3.321	3.330	0.0001445
21-juil-11	4.942	15.39	31.16	58.37	97.4	0.8862	0.9659	3.726	3.969	3.848	0.0295245
22-juil-11	5.058	14.21	30.91	60.7	99.94	0.0405	1.0029	3.565	4.507	4.036	0.443682
SCE	0.01	1.23	3.34	6.78	15.13						

TEST DES EMA						TEST DE LINEARITE					
ng/mL	Niv 1	Niv 2	Niv 3	Niv 4	Niv 5	Variations	SCE	ddl	s ² estimée	F	F _{0.01,ddl1,ddl2}
Dates	5.00	15.00	30.00	60.00	100.00	Linéaires	29016.9	1	29016.90	21913.38	8.10
18-juil	4.428	15.351	28.986	62.388	98.847	Non Linéaires	2.8	3	0.93255	0.70	4.94
19-juil	5.430	15.212	29.696	59.058	100.603	Expérimentales	26.5	20	1.32416	Test	OK
20-juil	4.514	15.040	29.721	61.558	99.167	Totale	29046.2	24			
21-juil	4.199	15.016	31.344	59.516	99.925						
22-juil	5.003	14.128	30.779	60.482	99.608						
Calcul de écarts relatifs						Représentation graphique des essais					
%	Niv 1	Niv 2	Niv 3	Niv 4	Niv 5	y = 0.9893x + 0.3151 R ² = 0.999					
Dates	5.00	15.00	30.00	60.00	100.00	Concentrations mesurées (ng/mL) vs Concentrations théoriques (ng/mL)					
18-juil	-11%	2%	-3%	4%	-1%	Essais dopés (○), Rendement (●), Incertitude Inf. (---), Incertitude Sup. (---)					
19-juil	9%	1%	-1%	-2%	1%	Mesures (◆), Linéarité (—)					
20-juil	-10%	0%	-1%	3%	-1%	18% ; n=9, 38% ; n=3, 43% ; n=3, 66% ; n=9					
21-juil	-16%	0%	4%	-1%	0%						
22-juil	0%	-6%	3%	1%	0%						
Ecart max	16%	6%	4%	4%	1%						
EMA (%)	40%	10%	10%	10%	10%						
Test	OK	OK	OK	OK	OK						

DETERMINATION DES INCERTITUDES DE MESURE ET DU RENDEMENT									
Valeurs théoriques :					Modélisation de l'erreur :				
point bas :		5.00 ng/mL		a = 0.117	point haut :		100.00 ng/mL		b = -0.106
Point bas de la gamme d'étalonnage					Point haut de la gamme d'étalonnage				
ng/mL	Mesure 1	Mesure 2	Rendement	17.56 %	ng/mL	Mesure 1	Mesure 2	Rendement	66.37 %
08-aout-11	0.424	0.2	moy	0.88 ng/mL	08-aout-11	76.3	68.05	moy	66.37 ng/mL
08-aout-11	Aberrant	1.228	s	0.43 ng/mL	08-aout-11	69.99	76.57	s	10.41 ng/mL
08-aout-11	0.482	1.243	t _(0.01,ddl)	3.36	10-aout-11	52.61	53.14	t _(0.01,ddl)	3.36
08-aout-11	1.058	0.723	erreur	0.48 ng/mL	24-aout-11	56.03	Aberrant	erreur	11.64 ng/mL
08-aout-11	1.140	1.40	<m<	1.36	24-aout-11	79.760	64.71	<m<	78.01
Test de Grubbs G _(0.01,10) = 2.41 G _(0.01,9) = 2.323					Test de Grubbs G _(0.01,10) = 2.41 G _(0.01,9) = 2.323				
Test du Min. 1.58 OK Test du Max. 1.22 OK					Test du Min. 1.30 OK Test du Max. 1.29 OK				
Intermédiaire :	50	21.93	Moyenne	21.33 ng/mL	Intermédiaire :	25	9.40	Moyenne	9.40 ng/mL
	21.52	21.93	Rendement	42.67 %		10.35	9.64	Rendement	37.61 %

CARTE DE CONTROLE (période préliminaire)			
N°	Date	Mesure	Valeur cible = 25 ng/mL
1	05-sept-11	23.650	s = 2.45 ng/mL
2	05-sept-11	24.390	Lim. Inf. Xm Lim. Sup.
3	06-sept-11	24.580	24.06 24.96 25.86
4	06-sept-11	25.790	23.61 24.96 26.31
5	06-sept-11	24.530	
6	12-sept-11	24.830	Erreur via modélisation :
7	12-sept-11	25.170	2.83 ng/mL
8	12-sept-11	24.530	Erreur via loi de student :
9	12-sept-11	25.250	0.33 ng/mL
10	13-sept-11	25.430	Coefficient de variation :
11	13-sept-11	24.230	1.80 %
12	26-sept-11	25.030	
13	26-sept-11	24.940	
14	26-sept-11	25.700	
15	26-sept-11	24.170	
16	05-oct-11	24.360	
17	05-oct-11	25.130	
18	07-oct-11	25.190	
19	07-oct-11	26.100	
20	07-oct-11	25.240	



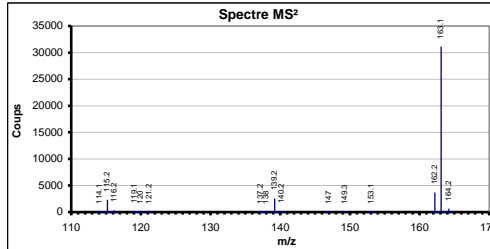
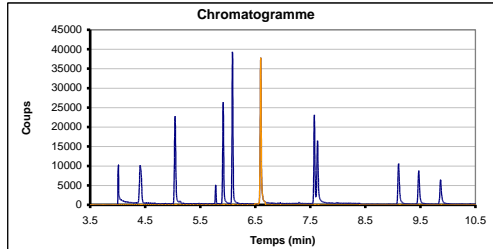
Annexe III : Résultats de la validation de la méthode de quantification du fluorène.

Fluorène

Méthode d'analyse : HAP d msms etalon
Méthode de quantification : quanti 2 HAP léger MRM

Analyseur : GC-Trap Saturn 4000 Varian
Détection : Mode MS²

Colonne : Resteck Rxi-5Sil 30 m, φ=250 µm, 0,25 µm

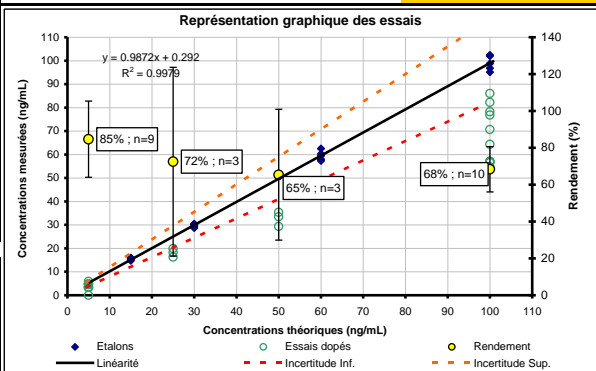


Ions MS²	
ion parent :	165
ion quanti. :	163
ions conf. :	139
	115
	162
Pics chromatographique	
t (min)	Molécule
6.586	Fluorene

MESURES LINEARITE ET LIMITE INSTRUMENTALE DE QUANTIFICATION										
ng/mL	Niv 1	Niv 2	Niv 3	Niv 4	Niv 5	Modélisation y=a0+a1*x		LIQ1	LIQ2	
Dates	5	15	30	60	100	a0	a1	5.00	5.00	moyenne variance
18-juil-11	4.921	15.99	28.71	62.48	95.14	1.1875	0.9586	3.44	3.151	3.296 0.0417605
19-juil-11	5.036	14.74	29.46	60.26	102.4	-0.7260	1.0263	3.9	4.128	4.014 0.025992
20-juil-11	4.97	15.2	30.46	57.35	102	-0.4183	1.0099	3.22	3.471	3.346 0.0315005
21-juil-11	4.924	15.76	30.33	57.97	98.75	0.4726	0.9780	2.228	2.434	2.331 0.021218
22-juil-11	4.917	15.84	30.05	59.46	96.78	0.9441	0.9635	3.376	4.092	3.734 0.256328
SCE	0.01	1.09	2.08	16.42	40.45					

TEST DES EMA					
ng/mL	Niv 1	Niv 2	Niv 3	Niv 4	Niv 5
Dates	5.00	15.00	30.00	60.00	100.00
18-juil	3.895	15.442	28.712	63.940	98.011
19-juil	5.614	15.069	29.412	59.422	100.482
20-juil	5.336	15.466	30.577	57.204	101.418
21-juil	4.552	15.632	30.530	58.793	100.492
22-juil	4.124	15.461	30.210	60.735	99.471
Calcul de écarts relatifs					
%	Niv 1	Niv 2	Niv 3	Niv 4	Niv 5
Dates	5.00	15.00	30.00	60.00	100.00
18-juil	-22%	3%	-4%	7%	-2%
19-juil	12%	0%	-2%	-1%	0%
20-juil	7%	3%	2%	-5%	1%
21-juil	-9%	4%	2%	-2%	0%
22-juil	-18%	3%	1%	1%	-1%
Ecart max	22%	4%	4%	7%	2%
EMA (%)	40%	10%	10%	10%	10%
Test	OK	OK	OK	OK	OK

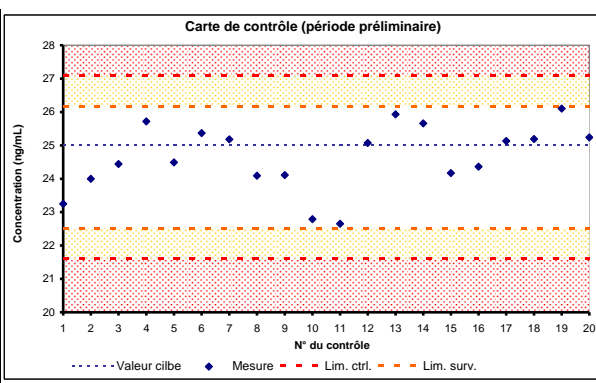
TEST DE LINEARITE					
Variations	SCE	ddl	s² estimée	F	F _{0.01,ddl1,ddl2}
Linéaires	28898.0	1	28897.98	9623.65	8.10
Non Linéaires	1.3	3	0.41959	0.14	4.94
Expérimentales	60.1	20	3.00281		
Totale	28959.3	24			
				Test	OK



TEST DE LA LIMITE INSTRUMENTALE DE QUANTIFICATION			
Variance	4.04E-01	LQ+60%LQ = 8.000	ng/mL
Ecart type	0.636	Zlq+2*sLIQ = 4.615	ng/mL
LIQ cible	5.000	Zlq-2*sLIQ = 2.073	ng/mL
LIQ mesurée	3.344	LQ-60%LQ = 2.000	ng/mL
L'exactitude de la limite instrumentale de quantification à 5 présupposée est vérifiée			
Test :			OK

DETERMINATION DES INCERTITUDES DE MESURE ET DU RENDEMENT									
Valeurs théoriques :					Modélisation de l'erreur :				
point bas : 5.00 ng/mL					a = 0.118				
point haut : 100.00 ng/mL					b = 0.443				
Point bas de la gamme d'étalonnage					Point haut de la gamme d'étalonnage				
ng/mL	Mesure 1	Mesure 2	Rendement		ng/mL	Mesure 1	Mesure 2	Rendement	
08-août-11	4.764	3.399	84.67	%	08-août-11	86.01	76.81	68.35	%
08-août-11	Aberrant	5.881	moy	4.23	08-août-11	70.63	82.21	moy	68.35
			s	0.92				s	11.91
08-août-11	3.279	4.521	t _(0.01,ddl)	3.36	10-août-11	56.89	57.14	t _(0.01,ddl)	3.25
08-août-11	4.866	3.344	erreur	1.03	24-août-11	56.55	54.72	erreur	12.24
08-août-11	4.677	3.37	<m<	5.27	24-août-11	78.20	64.35	<m<	80.59
Test de Grubbs G _(0.01,10) = 2.41					Test de Grubbs G _(0.01,10) = 2.41				
Test du Min. 1.03 OK					Test du Min. 1.14 OK				
Test du Max. 1.78 OK					Test du Max. 1.48 OK				
Intermédiaire : 50 ng/mL Moyenne 32.69 ng/mL					Intermédiaire : 25 ng/mL Moyenne 18.12 ng/mL				
35.34 33.45 29.29 Rendement 65.39 %					19.89 18.22 16.245 Rendement 72.47 %				

CARTE DE CONTROLE (période préliminaire)			
N°	Date	Mesure	Valeur cible = 25 ng/mL
1	05-sept-11	23.250	s = 0.91 ng/mL
2	05-sept-11	24.000	Lim. Inf. Xm Lim. Sup.
3	06-sept-11	24.440	22.52 24.34 26.17
4	06-sept-11	25.720	21.60 24.34 27.09
5	06-sept-11	24.490	
6	12-sept-11	25.370	Erreur via modélisation :
7	12-sept-11	25.180	3.31 ng/mL
8	12-sept-11	24.090	Erreur via loi de student :
9	12-sept-11	24.110	0.58 ng/mL
10	13-sept-11	22.790	Coefficient de variation :
11	13-sept-11	22.650	3.76 %
12	26-sept-11	25.070	
13	26-sept-11	25.930	
14	26-sept-11	25.680	
15	26-sept-11	24.170	
16	05-oct-11	24.360	
17	05-oct-11	25.130	
18	07-oct-11	25.190	
19	07-oct-11	26.100	
20	07-oct-11	25.240	



Annexes

Annexe IV : Vérification de l'homogénéité des rendements de récupération de la nicotine.

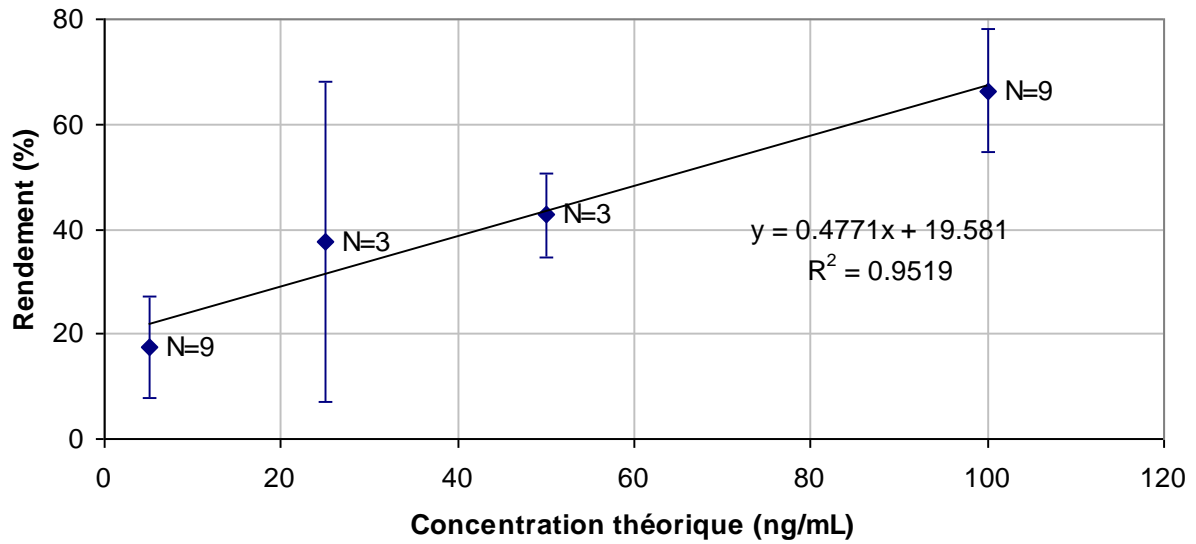
	Rendement	x_j	$(x_j - x_i)^2$	$(x_{ij} - x_j)^2$
Gr. 1	87.4	66.2	135.7	451.9
	64.5			2.9
	57.7			72.4
	76.3			101.9
	66.7			0.2
	67.9			3.0
	60.2			36.4
	63.9			5.3
	51.2			225.6
Gr. 2	89.6	92.1	203.1	6.1
	72.2			5207.5
	89.3			7974.9
	89.1			7933.4
	108.1			11694.2
	91.6			8381.5
	92.7			8595.7
	94.4			8914.9
	98.1			9616.2
95.8			9180.3	
Gr. 3	64.1	64.6	174.9	0.2
	64.2			4122.3
	65.5			4288.1
Gr. 4	77.9	78.5	0.4	0.4
	79.6			6332.0
	78.1			6094.2
Moyenne totale (x_t) :	77.8			
Variance inter-groupe (s^2_{IG}) :	1259.5	ddl _{IG} =	3	(Nb groupes - 1)
Variance résiduelle (s^2_r) :	4725.8	ddl _r =	21	(Nb essais - Nb groupes)
F calc =	3.8			
F table 1% =	26.7			
F table 5% =	8.7			
F_{calc} < F_{table} ; les essais peuvent être considérés comme identiques et regroupés.				

Annexe V : Vérification de l'homogénéité des rendements de récupération du fluorène.

	Rendement	x_j	$(x_j - x_t)^2$	$(x_{ij} - x_j)^2$	
Gr. 1	95.3	84.7	106.2	112.5	
	65.6			364.5	
	97.3			160.0	
	93.5			78.7	
	68.0			278.6	
	117.6			1085.6	
	90.4			33.0	
	66.9			316.5	
	67.4			297.6	
Gr. 2	86.0	68.4	36.2	311.8	
	70.6			4988.6	
	56.9			3236.5	
	56.6			3197.9	
	78.2			6115.2	
	76.8			5899.8	
	82.2			6758.5	
	57.1			3265.0	
	54.7			2994.3	
64.4			4140.9		
Gr. 3	70.7	65.4	80.6	28.0	
	66.9			4475.6	
	58.6			3431.6	
Gr. 4	79.6	72.5	3.6	50.2	
	72.9			5311.5	
	65.0			4222.4	
Moyenne totale (x_t) :	74.4				
Variance inter-groupe					
(s^2_{IG}) :	523.4	ddl _{IG} =	3	(Nb groupes - 1)	
Variance résiduelle (s^2_r) :	2912.1	ddl _r =	21	(Nb essais - Nb groupes)	
F calc =	5.6				
F table 1% =	26.7				
F table 5%					
=	8.7				
Fcalc < F table; les essais peuvent être considérés comme identiques et regroupés.					

Annexes

Annexe VI : Détermination du modèle linéaire du rendement de récupération de l'acénaphthylène



Annexe VII : Articles et communications scientifiques

Articles

Articles publiés

Schramm, S.; Carré, V.; Scheffler, J.-L.; Aubriet, F.. Analysis of Mainstream and Sidestream Cigarette Smoke Particulate Matter by Laser Desorption Mass Spectrometry ; *Analytical chemistry* ; **2011**, 83, 133–142.

Articles en préparation

Schramm, S.; Carré, V.; Scheffler, J.-L.; Aubriet, F.. Analysis of Exhaled Cigarette Smoke Particulate Matter by Laser Desorption Mass Spectrometry

Communications orales

Carré, V.; Schramm, S.; Aubriet, F.; Investigation of cigarette smoke particulate matter by laser desorption/ionization FTICRMS. **Avril 2010**. 9th European Fourier Transform Mass Spectrometry Workshop.

Schramm, S.; Carré, V.; Aubriet, F.; Investigation of cigarette smoke particulate matter by laser desorption/ionization FTICRMS. **Avril 2010**. XV^{èmes} Rencontre du club jeune de la société française de spectrométrie de masse

Aubriet, F.; Schramm, S.; Carré, V.; Comparison of electrospray and laser desorption ionization to study cigarette smoke by FTICRMS and FTICRMSⁿ. **Juin 2010**. Desorption

Schramm, S.; Carré, V.; Scheffler, J.-L.; Aubriet, F.; Tabagisme actif et passif, une étude différentielle de la fraction particulaire. **Septembre 2011**. Spectrométrie de masse et analyse protéomique 2011 -28^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse

Schramm, S.; Carré, V.; Scheffler, J.-L.; Chaimbault, P. ; Delhomme, O. ; Aubriet, F. ; Differential study of inhaled and exhaled cigarette smoke by mass spectrometry. **Avril 2012**. XVII^{èmes} Rencontre du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse

Communications affichées

Schramm, S.; Carré, V.; Scheffler, J.-L.; Courier, B. ; Aubriet, F.; Etude par désorption ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse FTICRMS de différents types de fumées de cigarettes. **Septembre 2009**. Spectrométrie de masse et analyses protéomiques 2009 - 26^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse

Schramm, S.; Carré, V.; Scheffler, J.-L.; Aubriet, F.; High resolution mass spectrometry for the investigation of cigarette smoke particulate matter. Comparison between active and passive smoking. **Mai 2012**. 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics

Annexes

Schramm, S.; Carré, V.; Scheffler, J.-L.; Aubriet, F.; Etude des fumées de cigarettes inspirées et expirées. Détermination de l'influence des paramètres de prélèvement par spectrométrie de masse. **Septembre 2012.** *29^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse*

Analysis of Mainstream and Sidestream Cigarette Smoke Particulate Matter by Laser Desorption Mass Spectrometry

Sébastien Schramm,[†] Vincent Carré,^{*,†} Jean-Luc Scheffler,[‡] and Frédéric Aubriet^{*,†}

Laboratoire de spectrométrie de masse et de chimie laser, Université Paul Verlaine - Metz, Institut de Chimie, Physique et Matériau, Institut Jean Barriol Fédération de Recherche 2843, 1 Boulevard Arago, F-57078 Metz cedex 03, France, and Ascal, Parc d'activités Forbach Ouest F-57600 Forbach, France

Laser desorption ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (LDI-FTICRMS) was used to investigate particulate matter (PM) associated with mainstream (MSS) and sidestream cigarette smokes (SSS). The high mass resolution and the high mass measurement accuracy allowed a molecular formula for each detected signal in the 150–500 m/z range to be assigned. The high number of peaks observed in mass spectra required additional data processing to extract information. In this context, Kendrick maps and Van Krevelen diagrams were drawn. These postacquisition treatments were used to more easily compare different cigarette smokes: (i) MSS from different cigarettes and (ii) MSS and SSS from the same cigarette. In both ion detection modes, most of the detected species were found to be attributed to $C_{6-31}H_{2-35}N_{0-7}O_{0-9}$ compounds. The compounds observed in the study of SSS appeared to be more unsaturated and less oxygenated than those observed when MSS of the same cigarette was investigated.

Cigarette smoke is a very complex mixture, which includes compounds in both vapor and particulate phases. Cigarette smoke components may be organic or inorganic. The high temperature reached during the combustion of a cigarette induces pyrolytic reactions as well as the formation of radical species.¹ Some of these radicals may react with various compounds present in cigarette smoke, which leads to the formation of new components. As a consequence, cigarette smoke is considered as a dynamic mixture, the composition evolving until all reactive species (mainly radicals) are quenched or consumed.² In addition to species produced by combustion, pyrolytic processes, or reaction with radicals, some components of tobacco can be directly transferred into the smoke.

A cigarette is composed of different constituents (tobacco, filters, paper, and additives), which produce a large variety of compounds when combusted. Consequently, an impressive number of components are thought to be associated with cigarette

smoke. However, only a limited number of them have been identified.

Some of the 4800 identified compounds are known to be toxic and/or tumor promoters as for example nicotine or carbon monoxide, which possess a direct toxic activity. The metabolites of some tobacco-specific nitrosamines, such as 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and *N*'-nitrosornicotine (NNN), induce toxic activity.³ Other toxic compounds such as volatile organic compounds (VOCs)⁴ or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are also present. Some of them are adsorbed on the surface of particulate matter (PM). The small size of cigarette smoke particles, generally in the 300–400 nm range,⁵ allows PM to penetrate deeply into the lungs. In this case, adsorbed compounds may be slowly released in the organism by thermal desorption at 37 °C physiological temperature over a long period of time. Consequently, these species are significant from a toxicological viewpoint.

Cigarette smoke is generally divided into two classes. Sidestream cigarette smoke (SSS) refers to the smoke emanating from the cigarette between puffs, and mainstream cigarette smoke (MSS) corresponds to the smoke inhaled by the smoker. In addition, the mixture of exhaled MSS and SSS constitutes environmental tobacco smoke (ETS), a major concern in indoor air pollution and passive smoking.

The main techniques used to analyze organic compounds in both SSS and MSS generally involve chromatography coupled to a specific analyzer, as for example gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)⁶ or liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS).^{7–10} To increase the sensitivity and the selectivity of the detection, tandem mass spectrometry (GC-MS/MS or LC-MS/MS¹¹) is used in addition to the separative approach.

- (3) Hecht, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 160–171.
- (4) Hoffmann, D.; Hoffmann, I.; El-Bayoumy, K. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 767–790.
- (5) Kleeman, M. J.; Schauer, J. J.; Cass, G. R. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3516–3523.
- (6) Moir, D.; Rickert, W. S.; Levasseur, G.; Larose, Y.; Maertens, R.; White, P.; Desjardins, S. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 494–502.
- (7) Lee, H.-L.; Wang, C.; Lin, S.; Hsieh, D. P. H. *Talanta* **2007**, *73*, 76–80.
- (8) Wu, W.; Ashley, D. L.; Watson, C. H. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4827–4832.
- (9) Wagner, K. A.; Finkel, N. H.; Fossett, J. E.; Gillman, I. G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1001–1006.
- (10) Wu, J.; Joza, P.; Sharifi, M.; Rickert, W. S.; Lauterbach, J. H. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1341–1345.
- (11) Xiong, W.; Hou, H.; Jiang, X.; Tang, G.; Hu, Q. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *674*, 71–78.

* Corresponding authors. (F.A.) E-mail: aubriet@univ-metz.fr; (V.C.) e-mail: carre@univ-metz.fr, phone: (33) 3 87 31 58 54, fax: (33) 3 87 31 58 51.

[†] Université Paul Verlaine - Metz.

[‡] Ascal, Parc d'activités Forbach Ouest.

(1) Borgerding, M.; Klus, H. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2005**, *57*, 43–73.

(2) Baker, R. R.; Bishop, L. J. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2004**, *71*, 223–311.

According to the complexity of SSS and/or MSS matrixes, solid-phase extraction (SPE) or solid-phase microextraction SPME is generally required.^{12–14} The analysis of NO_x is typically conducted by chemiluminescence.¹⁵ Inorganic compounds are generally investigated by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP/MS).¹⁶ An exhaustive analysis of cigarette smoke requires a significant number of analyses because of the large number of organic or inorganic compounds. Indeed, the analytical methods used only focus on a specific class of compounds and involve pretreatment steps, i.e., extraction and preconcentration, which are time- and solvent-consuming. Moreover, biases may be introduced by loss or modification of investigated compounds.

To simplify the global analysis of cigarette smokes, some authors proposed the use of tracers as an alternative to an exhaustive analysis. More specifically, PM_{2.5} may be used as tracer of PM and CO, nicotine¹⁷ or 2,5-dimethylfuran¹⁸ are known to be tracers of VOCs. The quantitative analysis of specific compounds by several groups compared different cigarette smokes and tobaccos. Recent studies focused on the evolution of some gas-phase compounds (VOCs, ammonia, CO, etc.) in MSS on the single-puff level. Indeed, the concentration of some compounds is known to evolve during smoking.¹⁹ Moir et al. compared tobacco-specific gas compounds (nitrosamine compounds, nicotine, ammonia, etc.) and heavy metals in tobacco and marijuana MSS,⁶ and Pieraccini et al. investigated VOCs in MSS and SSS of two different brands of cigarettes.¹² CO₂, C₂H₄, NO,²⁰ or VOCs²¹ are detected in MSS and SSS but at different concentrations. A concentration of 0.017 mg/cigarette of ammonia was found in MSS, whereas amounts as high as 5 mg/cigarette were observed in SSS.²⁰ In the field of tobacco analysis, the comparison of the amounts of tobacco-specific nitrosamines (TSNA) and *N*-nitroso compounds allowed Stepanov et al. to observe significant differences between tobaccos used in Moldovan and European cigarettes.²² Lower TSNA amounts were found in Moldovan tobacco.

Generally, off-line²³ and on-line^{16,20,24} resolved puff-by-puff analyses have been reported. The amounts of some compounds, for example ammonia²⁰ and nicotine,²³ increase during smoking.

As a matter of fact, some compounds present in MSS may be adsorbed on unconsumed tobacco and be desorbed by subsequent puffs and finally inhaled by the smoker.²

Previous reports on the analysis of cigarette smoke generally focused on gases, heavy metals, or specific pollutants such as polycyclic aromatic compounds (PAH), nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons (nitroPAH),²⁵ or TSNA. Only a limited number of works have been dedicated to the analysis of nonvolatile or less volatile species adsorbed on the surface of cigarette smoke particulate matter. Recently, laser desorption mass spectrometry (LDI-MS) was used to investigate PM from both MSS and SSS collected on filters or membranes or after bubbling in washing bottles.²⁶ Alternatively, mass spectrometry techniques coupled to laser desorption and/or ionization LDI-MS techniques in both on-line and off-line mode have been considered as powerful tools to investigate environmental dust particles.^{27,28} The interaction of a laser beam with the particles ensures that the species adsorbed on their surface are efficiently desorbed and ionized. Consequently, laser desorption is viewed as an in situ and rapid method, which provides relevant information on the particle components and on the compounds adsorbed on the surface. Nevertheless, the high number of compounds associated with environmental dust particles significantly complicates the analysis of the obtained mass spectrum. Even if ionization parameters are adjusted to avoid fragmentation, isobaric interference occurs. To assign a formula to each detected ion with a high level of confidence, *m/z* measurements have to be conducted with high mass measurement accuracy and high mass resolution. This can be achieved by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICRMS). This technique has been used to analyze complex mixtures such as petroleum,^{29,30} natural organic matter (NOM),³¹ or dissolved organic matter (DOM),³² which includes several thousands of different compounds.²⁶ Carré et al. reported the use of LDI-FTICRMS to analyze PM collected from cigarette smoke. Chemical formulas were obtained for ions in the 80–210 *m/z* range. Nevertheless, the obtained mass resolution was not sufficient enough to definitely and unambiguously identify each peak of the mass spectrum, especially for signals at *m/z* greater than 220. In our work, the high mass resolution and the high accuracy mass measurement attained with a 9.4 T FTICRMS instrument allows the definite assignment of a formula to each detected signal. These assignments are necessary to allow an effective comparison between different cigarette smokes. First, a home-built smoking machine will be described, and then the repeatability of smoking and sampling procedures will be evaluated, taking into account the amounts of benzene, toluene, and particulate matter by using a statistical approach. The LDI-FTICRMS analysis of the MSS collected on a quartz filter from a commercial cigarette will be extensively described, especially the

- (12) Pieraccini, G.; Furlanetto, S.; Orlandini, S.; Bartolucci, G.; Giannini, I.; Pinzauti, S.; Moneti, G. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1180*, 138–150.
- (13) Polzin, G. M.; Kosa-Maines, R. E.; Ashley, D. L.; Watson, C. H. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 1297–1302.
- (14) Saha, S.; Mistri, R.; Ray, B. C. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 307–311.
- (15) Jenkins, R. A.; Gill, B. E. *Anal. Chem.* **2002**, *52*, 925–928.
- (16) Chang, M. J.; Naworal, J. D.; Walker, K.; Connell, C. T. *Spectrochim. Acta B* **2003**, *58*, 1979–1996.
- (17) Xie, J.; Wang, X.; Sheng, G.; Bi, X.; Fu, J. *Atmos. Environ.* **2003**, *37*, 3365–3374.
- (18) Charles, S. M.; Jia, C.; Batterman, S. A.; Godwin, C. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 1324–1331.
- (19) Adam, T.; Mitschke, S.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *572*, 219–229.
- (20) Baren, R. E.; Parrish, M. E.; Shafer, K. H.; Harward, C. N.; Shi, Q.; Nelson, D. D.; McManus, J. B.; Zahniser, M. S. *Spectrochim. Acta. A* **2004**, *60*, 3437–3447.
- (21) Charles, S. M.; Batterman, S. A.; Jia, C. *Atmos. Environ.* **2007**, *41*, 5371–5384.
- (22) Stepanov, I.; Hecht, S. S.; Mirvish, S. S.; Gonta, M. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8082–8086.
- (23) Xie, J.-P.; Sun, S.-H.; Wang, H.-Y.; Zong, Y.-L.; Nie, C.; Guo, Y.-L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2573–2578.
- (24) Mitschke, S.; Adam, T.; Streibel, T.; Baker, R. R.; Zimmermann, R. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2288–2296.

- (25) Havey, C.; Dane, A.; Abbas-Hawks, C.; Voorhees, K. *Environ. Chem. Lett.* **2009**, *7*, 331–336.
- (26) Carré, V.; Aubriet, F.; Muller, J.-F. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *540*, 257–268.
- (27) Morrical, B. D.; Fergenson, D. P.; Prather, K. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 1068–1073.
- (28) Aubriet, F.; Carré, V. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *659*, 34–54.
- (29) Rodgers, R. P.; Schaub, T. M.; Marshall, A. G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, A-27 A.
- (30) Marshall, A. G.; Rodgers, R. P. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *37*, 53–59.
- (31) Sleighter, R. L.; Hatcher, P. G. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 559–574.
- (32) Mopper, K.; Stubbins, A.; Ritchie, J. D.; Bialk, H. M.; Hatcher, P. G. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 419–442.

signals in the 150–500 m/z range. Comparisons of (i) MSS and SSS from the same cigarette and (ii) MSS from two different cigarettes will also be reported. Nevertheless, to ensure an easier comparison, postacquisition data treatments are required, which consist mainly of creating 2D or 3D graphical representations of the mass spectrometry results, as for example in Kendrick or Van Krevelen maps.

EXPERIMENTAL SECTION

Samples. Two kinds of cigarettes have been used. Cigarette A is a European commercial light cigarette which contains 0.60 mg of nicotine and leads to the production of 8 mg of carbon monoxide and 7 mg of tar per cigarette according to the manufacturer. Cigarette B is a regular Asian cigarette. No information on tar, nicotine, and CO are provided by the manufacturer.

Smoking and Sampling Methods. Cigarettes were smoked using a home-built smoking machine, which allowed collection of PM, benzene, and toluene. A description of both the smoking machine and the smoking procedure (ISO 4387) is given in Supporting Information 1. After collection, loaded quartz filters were removed from the cassettes and stored at room temperature and ambient pressure for 30 min prior to storage for 1 h in a ventilated air oven at 30 °C. Before weighing, the loaded quartz filters were placed in a dry atmosphere for 12 h at 25 °C. This storage procedure allowed highly volatile compounds, which may disturb weighing, to be removed from the cigarette smoke samples. Three blank quartz filters, which underwent the same storage procedure, were also weighed as a control and used to define the correction associated with the hygrometry variation. Incertitude in the weighing was evaluated to be ± 0.04 mg.

Sorbent tubes were stored in a refrigerator at 4 °C before solvent desorption. Compounds adsorbed on the main and back-up charcoal sorbent were desorbed with 4 mL of CS₂ (LGC-promochem). Each resulting extract was analyzed by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID).

Instrumentation. *GC-FID.* GC-FID analyses were conducted with a HP 6890 gas-phase chromatograph (Agilent, Pickering, ON, Canada) fitted with two capillary columns of different polarities. Each column was associated with a distinct FID. A fixed split ratio ensured that a specific amount of sample was injected into each column. Both columns were 60 m length and had an inner diameter of 250 μm . The first column was a Rtx-WAX with glycol polyethylene stationary phase (Resteck US, Bellefonte, PA), and the second column was a Rtx-502.2 with dimethyl/diphenylpolysiloxane stationary phase (Resteck US, Bellefonte, PA). Validation of analysis was conducted by comparison of the results obtained with both columns. Helium (Alphagaz Air Liquide, Mitry Mory, France) was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Linearity was obtained for benzene and toluene in a 1–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration range. A standard solution was analyzed every 10 sample injections to control the stability of the GC-FID measurements.

LDI-FTICRMS. All mass spectra were acquired using a laser desorption ionization LDI-FTICR mass spectrometer (IonSpec, Lake Forest, CA) equipped with an actively shielded 9.4-T superconducting magnet (Cryomagnetics, Oak Ridge, TN). An external ion source ProMaldi card was used. Loaded quartz filters were fixed on a sample holder which was directly introduced into

the ion source. Ions were generated by LDI of the sample with an ORION air-cooled Nd:YAG laser system (New Wave Research Inc., Fremont, CA) working at a 355 nm wavelength (laser pulse duration 5 ns, output energy 4 mJ). The ions resulting from eight successive laser–sample interactions were stored in a RF-only hexapole before transfer to the FTICR cell. After each pulse, the sample stage was moved such that ions were generated from a fresh (not previously laser irradiated) target area. The ion guide was tuned to optimize the efficient transfer of ions in the 150–500 m/z range into the FTICRMS cell. Note that increasing the amplitude of the RF applied to the ion guide to allow the transfer of larger ions to the FTICR cell did not modify the resulting mass spectrum for large m/z ions but induced a switch of low mass cutoff to higher m/z values. To thermalize ions during accumulation in the storage hexapole, N₂ was introduced by a pulsed valve. After transfer, ions were trapped in the ICR cell with a 0.25 V trapping potential. The ions in the 100–1000 m/z range were then excited by the application of an arbitrary excitation wave function (SWIFT) on the excitation plates. The resulting image current was detected, amplified, digitized, apodized (Blackman), and Fourier-transformed to produce a mass spectrum. The signal was sampled during 2.097 s with 2048 or 4096 K data points. Each mass spectrum reported in the following sections was the sum of 45 individual mass spectra. A ~ 0.2 mm² area of the filter was irradiated by each laser shot, which resulted in a total investigated area of 0.72 cm², i.e., $\sim 7\%$ of the global surface of the sample. This is thought to average possible heterogeneity across the filter. The obtained average mass accuracy was typically better than 0.6 ppm, and fwhm mass resolution at m/z 250 was close to 300 000. To confirm the obtained chemical formulas for some species, MS² experiments were conducted by sustained off-resonance irradiation collision-induced dissociation (SORI CID).

Ion Assignment. Before acquisition, the mass spectrometer was externally calibrated on the basis of the cluster ions associated with the LDI of graphite. Significant amounts of positive and negative species were generated, which allowed calibration in the 160–500 m/z range. After mass spectrum acquisition, specific ions were unambiguously identified by MS/MS measurements such as protonated nicotine ion and K₃SO₄⁺ cluster ions and used to internally calibrate the obtained mass spectrum. Elemental composition of each detected signal with S/N > 3 was determined by using Omega 8 Elemental Composition software (Varian-IonSpec Inc.) with the following search criteria: C_{6–100}¹³C_{0–2}H_{6–100}N_{0–20}O_{0–20}S_{0–5}K_{0–5} general formula and 2 ppm tolerance error. When possible (ions with high abundance), the isotopic pattern was checked with Omega 8 Exact Mass Calculator software (Varian-IonSpec Inc.). The assignment of the m/z 430.92154 ion to [C₉H₁₄O₆K₃SO₄]⁺ (relative error value 0.46 ppm) was confirmed by the m/z 431.92455 and 432.91961 signals attributed to [¹³C¹²C₈H₁₄O₆K₃SO₄]⁺ (relative error value 0.34 ppm) and [C₉H₁₄O₆⁴¹K³⁹K₂SO₄]⁺ (relative error value 0.35 ppm), respectively. Periodically, the mass spectrum was recalibrated by taking into account the assigned ions using the calibration algorithm proposed by Masselon et al.³³ Finally, an averaged relative error between 0.5 and 0.6 ppm was systematic

(33) Masselon, C.; Tolmachev, A. V.; Anderson, G. A.; Harkewicz, R.; Smith, R. D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 99–106.

cally obtained for each mass spectrum reported in this work. For $m/z < 500$ positive ions, mass resolution was systematically sufficient enough ($>150\,000$) to distinguish ^{12}C from ^{13}C , which only differ by 0.00448 Da. For negative ions, mass resolution was found to be slightly lower but greater than 80 000 for m/z 400 (required resolution $\sim 82\,000$), which seems to indicate that some peaks may coalesce. Nevertheless, ion abundance in the m/z 350–400 range was found to be small enough to assume that ^{13}C contribution of the isotopic pattern was not observable.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of the Sampling and Smoking Procedure. First of all, the repeatability of both smoking and sampling procedures has been achieved. It is not possible to distinctly examine the sampling of PM, benzene, and toluene on the one hand and the smoking process on the other hand. Consequently, the repeatability of the sampling and smoking procedure has been evaluated simultaneously. This first step is of major importance. Indeed, comparison of different cigarette smokes is only possible if the distribution of compounds does not significantly vary between different smoking/collecting experiments. To determine the repeatability, eight cigarettes A were smoked with our home-built smoking-machine and amounts of selected tracers, i.e., benzene, toluene, and PM, were measured after collection on a sorbent tube and quartz filter, respectively. To evaluate the day-to-day variation, experiments have been spread out over three days. For each tracer, the residual variance and the intergroup variance were calculated. The Fisher test was applied to the results obtained for each selected tracer. A 5% error risk was considered.

Supporting Information 2 reports the results obtained for each of the three tracers. $F_{\text{experimental}}$ was found to be systematically lower than F_{table} for benzene, toluene, and PM. This indicates that the intergroup variance is lower than the residual variance. Consequently, day-to-day variation is not significant compared to sample-to-sample variation at the 5% risk of error level. Coefficients of variations for PM, benzene, and toluene were found to be 6.6%, 6.9%, and 13.2%, respectively. Important correlations were also observed when the variation of the three tracers was conjointly examined. Thus, the average of benzene/toluene, benzene/PM, and toluene/PM amount ratios were found to be 0.67 ± 0.06 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$), 4.96 ± 0.46 ($\mu\text{g}/\text{mg}$), and 7.5 ± 1.1 ($\mu\text{g}/\text{mg}$), respectively. The coefficients of variation for each of these ratios were 9.5%, 9.5%, and, 14.3%, respectively. Consequently, it may be assumed that the variation of the relative abundance of tracers and with some respect of the different components of cigarette smoke does not exceed 20% and is generally lower than 10% between cigarettes under the sampling and smoking conditions used in this study.

Analysis of MSS of a Commercial Light European Cigarette by LDI-FTICRMS. The blank quartz filter was first analyzed by LDI-FTICRMS. No signals were detected when measurements were performed at the laser irradiance used to conduct LDI-FTICRMS of cigarette smoke PM. Nevertheless, the increase of laser irradiance by a factor of 2 led to the detection of two poor signals, with a S/N ratio close to 5, at m/z 369.93158 and 493.24104. These ions were never detected in the study of loaded quartz filters.

Figure 1 reports the positive mass spectrum obtained by LDI-FTICRMS of PM associated with MSS of cigarette A. In the 150 to 450 m/z range, ~ 800 signals (see Supporting Information 3) were detected and identified. Most of these ions were found to be relative to $[\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_{0-4}\text{O}_{0-4}]^{*+}$ and $[\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_{1-4}\text{O}_{0-4}]^+$ species, with $x = 10-27$ and $y = 10-35$. The laser irradiance used was low enough to prevent ion fragmentation. Indeed, the $[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O} + \text{H}]^+$ ion, which is the main daughter ion observed by MS/MS at a low activation energy of $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O} + \text{H}]^+$ (m/z 243.14913), was never observed. In addition, complementary experiments performed on an alternative collecting support ensure the detection of the protonated ion of benzoacridine $[\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N} + \text{H}]^+$, whereas its $[\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}]^+$ specific fragment was not observed at m/z 202.06510.³⁴ An increase of the laser irradiance allowed this fragmentation to be observed. Consequently, it is reasonable to assume that all detected ions are related to M^{*+} molecular and, $[\text{M} + \text{H}]^+$ protonated or $[\text{M} - \text{H}]^+$ deprotonated pseudomolecular ions. Indeed, the significant amounts of nitrogen atoms in the detected compounds favor the observation of protonated or deprotonated species by the formation of quaternary ammonium groups. Protonated, deprotonated, and molecular radical ions and ^{13}C isotopic contribution can be distinguished. Note that one signal is assigned to one chemical formula, which may include different isomers. The number of isomers increases with the ion m/z ratio.

Radical molecular cations only represent a limited fraction, i.e., $\sim 1\%$, of the detected ions, and they were associated with highly unsaturated compounds or the abundant compounds in cigarette smoke. This appears reasonable according to the fact that charge in this case may be easily delocalized. For each $[\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_{1-4}\text{O}_{1-4}]^{*+}$ radical cation, the associated $[\text{C}_x\text{H}_{y+1}\text{N}_{1-4}\text{O}_{1-4}]^+$ ions corresponding to $[\text{M} + \text{H}]^+$ or $[\text{M} - \text{H}]^+$ species were also systematically detected.

According to the intense signal detected at m/z 163.12325, which was attributed to the protonated ion of nicotine, it may be assumed that $[\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_{1-4}\text{O}_{0-4}]^+$ ions were mainly protonated species of cigarette smoke components. Nevertheless, the proton affinity of cigarette components highly depends on the number of nitrogen atoms and unsaturations, and for specific compounds, deprotonated species may also be formed. In this respect, ~ 770 signals are considered as specific to at least 770 cigarette components. It is obvious that the number of detected compounds is greater than 770 according to possible isomers, as for example nicotine and anabasine. Detected ions may be gathered into different series with respect to the number of oxygen atoms. The $[\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_{1-4}\text{O}_{1-4}]^+$ ions were found to be the more numerous ions ($\sim 70\%$) and represent the most important cumulated ion current ($\sim 60\%$). In addition, the most abundant ion series was the $[\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_2\text{O}_{1-4}]^+$ series. To ensure a more accurate analysis of the obtained results, additional data treatments were required. Kendrick maps and Van Krevelen diagrams were used.³⁵ An example of Kendrick map, as well

(34) Pantiru, M.; Lintelmann, J.; Matuschek, G. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Air Quality Management at Urban, Regional and Global Scales*, Istanbul, Sept 26–30, 2005; pp 10–20.

(35) Kim, S.; Kramer, R. W.; Hatcher, P. G. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5336–5344.

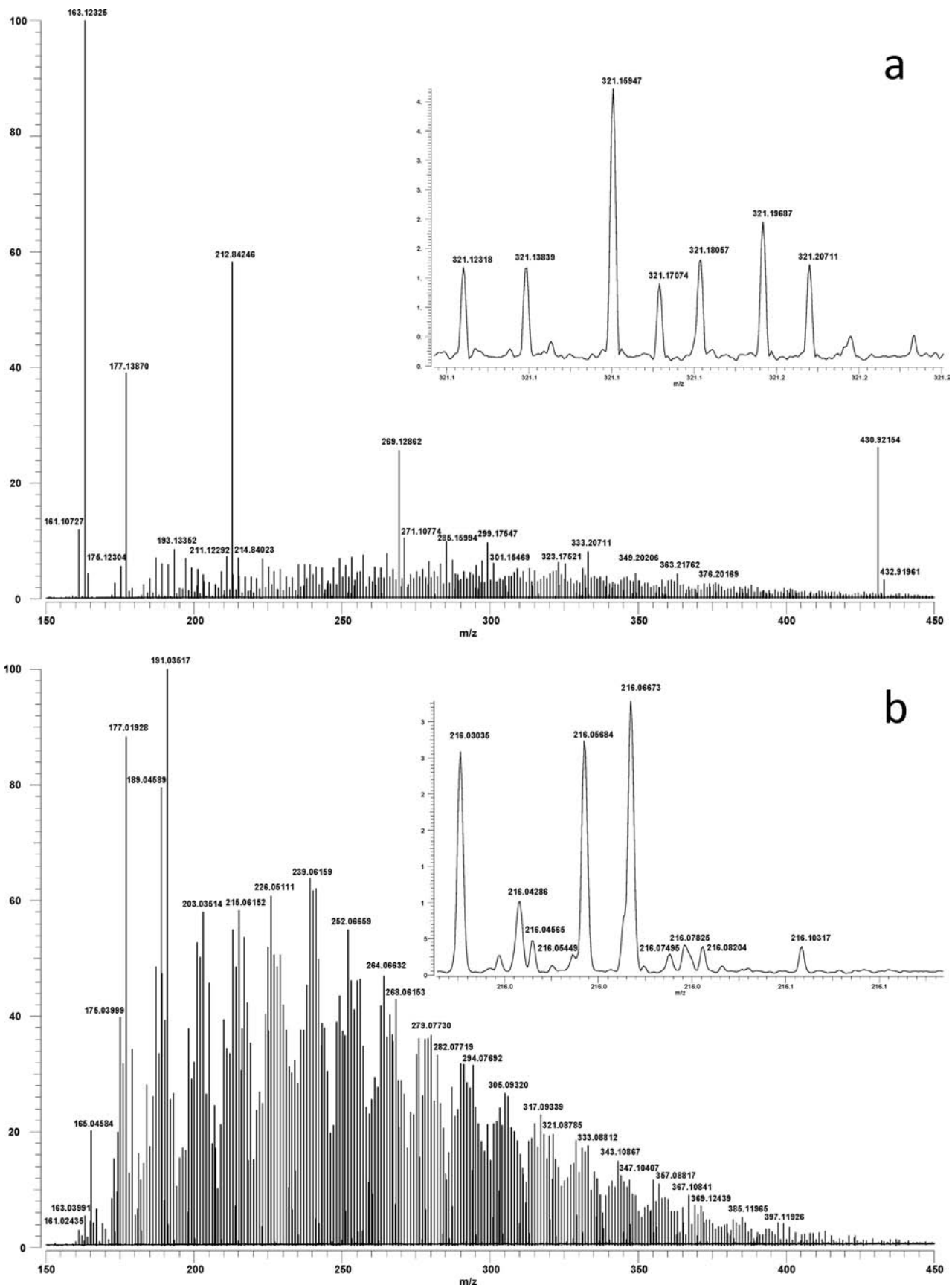


Figure 1. (a) Positive and (b) negative LDI-FTICR mass spectra of mainstream smoke of cigarette A collected on a quartz filter. Mass spectra were obtained at the 355 nm wavelength.

as a description of its drawing, is given in Supporting Information 4. In addition, the formulas to obtain the double bond equivalent number (DBE) and the aromaticity index (AI) are also given.³⁶

A 9.35 averaged DBE was found for all detected cations. For species detected in the positive mode analysis of cigarette A, the relative abundance of each class of AI (i.e., AI < 0.5: aliphatic or olefin (with or without heteroatoms); 0.5 < AI < 0.65: aromatic and heteroaromatic compounds; AI > 0.65: condensed species) was found to be 22%, 50%, and 28%, respectively. 3-D Van Krevelen diagrams (H/C, N/C, and O/C) were also built for $[C_xH_yNO_{0-3}]^{*+}$ and $[C_xH_yNO_{0-3}]^+$ on the one hand and for $[C_xH_yN_2O_{0-4}]^{*+}$ and $[C_xH_yN_2O_{0-4}]^+$ on the other hand, and they are presented in Supporting Information 5. The obtained diagrams split the different series according to the amounts of heteroatoms and the number of unsaturations. The large amounts of nitrogen and oxygen atoms in the components of cigarette smoke were clearly evidenced in the observed distribution, which involved a N/C and O/C ratio larger than that typically observed in the investigation of coal, crude oil,³⁷ or NOM.³⁸ This behavior may be explained by the interaction of organic species with nitrogen oxides produced in the smoking process.

In addition to $[C_xH_yN_{0-4}O_{0-4}]^{*+}$ and $[C_xH_yN_{0-4}O_{0-4}]^+$ organic ions, inorganic species were also observed. More specifically, the intense signal at m/z 212.84246 was assigned to $K_3SO_4^+$. The presence of inorganic compounds in cigarette smoke has been highlighted in a previous study.¹⁹ They may come from fertilizer used during tobacco cultivation or from some additive such as aluminum sulfate. An interesting ion was also observed at m/z 430.92154 and was assigned to $[C_9H_{14}O_6, K_3SO_4]^+$. It corresponds to the association of organic and inorganic moieties. SORI-CID measurement led solely to one fragmentation channel: the loss of the organic part and the detection of $K_3SO_4^+$ ion. It may be assumed that the m/z 430.92154 ion results from the interaction in the gas phase of the inorganic ion with the organic moiety ($C_9H_{14}O_6$). In that case, $K_3SO_4^+$ may be considered as a cationic agent of some cigarette components. Other low abundance species at m/z 328.89005, 344.88470, and 355.90074 were also associated with the combination of $K_3SO_4^+$ with $C_5H_8O_3$, $C_5H_8O_4$, and $C_6H_9NO_3$, respectively. Processes, which may explain their formation, have to be close to what it is typically observed in conventional chemical ionization. This aspect is still under investigation.

Figure 1b presents the negative mass spectrum obtained in the study of cigarette A MSS particles. More than 1500 signals (see Supporting Information 3) have been observed and assigned to the general $[C_{6-27}H_{3-31}N_{0-5}O_{0-6}]^{(\bullet)-}$ formulas. Most of the detected ions may be associated with $[M - H]^-$ species. Only a small number of them were found to be radicals (~12%).

The species detected in negative ion mode are found to be highly unsaturated. Indeed, the averaged DBE of anions is higher (10.6) than the averaged DBE of cations (9.35), the more abundant species present in the negative detection mass spectrum exhibit AI values in the 0.5–1 range, and less than 10% of the detected

anions have AI < 0.5. More specifically, no negative ions with a KMD lower than 0.10, i.e., a DBE value of 8, were observed. In contrast, compounds with a DBE as high as 24 were observed for negative ions, which means that some of the observed species in negative detection mode are highly condensed.

Another important difference observed in species obtained in negative and positive detection modes is the amounts of nitrogen and oxygen atoms. Larger O/C and N/C ratios were observed when anions were examined. For a large number of anions, the O/C ratio is greater than 0.2, which is the highest O/C ratio observed for positive ions, and may be close to 1 for some of them. These latter anions were found to be free of nitrogen atoms, which may indicate that they are associated with species produced by the degradation of cellulose during the smoking procedure.³⁹ Indeed, 25% of the negative ions were associated with $[C_xH_yO_{1-5}]^{\bullet-}$ species. Some of the $[C_xH_yO_{1-5}]^-$ ions are thought to be related to deprotonated carboxylic acids present in tobacco or produced during smoking.

In both ion detection modes, note that no pure carbon ions were detected. These species are generally associated with soot, which means that detected signals are related to species adsorbed on the surface of MSS PM.

Comparison between Cigarette A and Cigarette B. PM of MSS from an Asian cigarette, i.e., cigarette B, was collected according to the same procedure used for cigarette A MSS PM. Averaged amounts of tracers were found to be 10.212 mg, 37.471 μ g, and 65.118 μ g per cigarette for PM, benzene, and toluene, respectively. These values were definitely higher to what was found for cigarette A (Supporting Information 2). This may be explained by several factors. The first is the nature and the relative amounts of the different tobacco brands. Adam²² demonstrated that amounts of volatile or gas compounds in smoke were significantly different for the pure Virginia, Oriental, Burley, and Maryland cigarette brands.^{19,24} A second important parameter is the nature of the additive in the cigarette as well as the different fertilizers used during tobacco cultivation. Unfortunately, this information is not available for cigarettes A and B so the influence of this parameter on the differences observed in the concentrations of selected tracers is unproven. Nevertheless, a last parameter may also be considered and checked: the physical characteristics of each cigarette. They are given in Supporting Information 6. The mass and the density of tobacco for cigarettes A and B are not statistically different. In contrast, the mass, the length, and the density of the cigarette filter is significantly smaller for cigarette B, which may trap PM less efficiently. In addition, an increase of both mass and length of the filter for cigarette A may be reasonably associated with an increase of adsorption processes of VOCs (benzene and toluene) and a decrease of their concentration in MSS of cigarette A. Moreover, it is well-known that filters of light cigarettes (cigarette A) present more efficient aeration capabilities than those of the regular cigarettes (cigarette B). This allows air dilution of smoke and a decrease of the amounts of MSS inhaled by the smoker.

The mass spectra obtained in the study of cigarette B MSS PM by LDI-FTICRMS are given in Supporting Information 7. The global fingerprints observed for both negative and positive ions are very similar to what were previously observed for cigarette A

(36) Koch, B. P.; Dittmar, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 926–932.

(37) Wu, Z.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2511–2516.

(38) Hertkorn, N.; Frommberger, M.; Witt, M.; Koch, B. P.; Schmitt-Kopplin, P.; Perdue, E. M. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8908–8919.

(39) Faix, O.; Meier, D.; Fortmann, I. *Holz Roh. Werkst.* **1990**, *48*, 281–285.

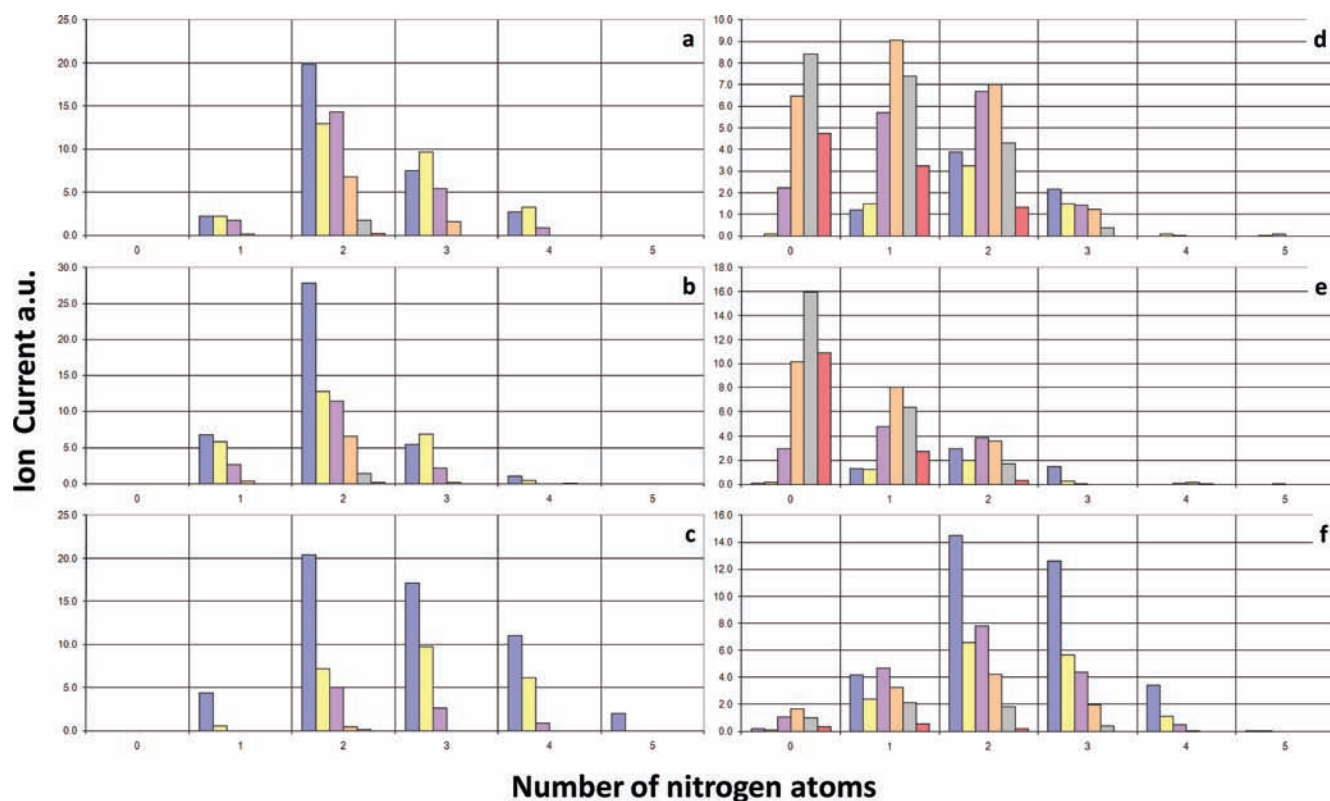


Figure 2. Distribution of (a, b, and c) positive and (d, e, and f) negative $C_xH_yN_{0-5}O_{0-6}^{\pm}$ ions detected in the study of (a, d) MSS of cigarette A, (b, e) MSS of cigarette B, and (c, f) SSS of cigarette A by LDI-FTICRMS. The color of the bars is related to the number of oxygen atoms: from 6 from blue to red.

(see Figure 1). Nevertheless, the fine examination of the $C_xH_yN_{0-5}O_{0-6}^{\pm}$ distribution with respect to the number of oxygen and nitrogen atoms (Figure 2) highlighted some differences. Species with one or two nitrogen atoms were found to be more abundant in MSS of cigarette A (see more specifically the ion current observed in both ion detection modes). In addition, the $C_xH_yN_2O_z^+$ ions were more oxygenated for cigarette A. For example, comparison of the relative distribution of $C_xH_yN_2^+$ and $C_xH_yN_2O_2^+$ ions are presented in Figure 2a and Figure 2b and show a general trend. The ion current of oxygenated positive ions for cigarette A is close to 60% of the TIC and represents only 50% of the TIC for cigarette B.

Another significant difference between cigarettes A and B is the averaged DBE of detected compounds. The DBE is definitely lower for cigarette B (8.1 and 10.0 for positive and negative ions, respectively) than for cigarette A (9.4 and 10.6 for positive and negative ions, respectively). This is also confirmed by examination of the AI values: 28% of cigarette A MSS positive ions have an AI < 0.5 compared to 35% for cigarette B MSS. Similar trends were observed for negative ions (8% versus 14%). All of these observations may be associated with the production of less oxygenated aromatic and condensed species when cigarette B was smoked. The higher amounts of oxygen when cigarette A was smoked (i.e., specific nature of the cigarette filter for light cigarettes) may lead to the formation of more oxygenated species. In addition, the smaller size and the less dense nature of the cigarette filter of the regular cigarette B may be due to a less efficient collection of saturated or slightly unsaturated compounds. This behavior may also explain the higher amounts of ions and the detection of larger species for cigarette B.

Comparison of MSS and SSS. Figure 3 reports the positive and negative mass spectra of SSS PM by LDI-FTICRMS at the 355 nm wavelength. The spectra show ions that were generally detected in the analysis of MSS PM. Nevertheless, the relative ion distributions appear to be dependent on the cigarette smoke PM (MSS or SSS) (see, for example, the relative distribution of m/z 163.12305, 177.13862, 212.84278, 269.12855, and 430.92154 positive ions). Inorganic $[K_3SO_4]^+$ is the base peak for SSS whereas the protonated ion of nicotine is the base peak for MSS.

The amount of PM is definitely higher for SSS than for MSS. Indeed, the mass of collected PM is equal to 8.22 and 5.52 mg/cigarette for SSS and MSS, respectively. This difference may be due to the collection procedure. MSS was only collected during puffs, at an individual time duration of 2 s, whereas SSS was collected during the entire smoking procedure. Despite larger PM amounts, the total ion current (TIC) obtained after laser desorption ionization is lower for SSS (~1200 au) compared to that observed for MSS (~2100 au). Note that LDI only affects the top layers of the investigated sample. Consequently, it is not surprising that TIC is not linked to PM amounts. For both cigarette smoke PM, the number of detected peaks in the obtained positive mass spectra (see Figure 1 and Figure 3 for MSS and SSS, respectively) is comparable. Most detected peaks are due to organic species (~770 for MSS and ~720 for SSS). The different ion series for each of these samples are reported in Figure 2. It is obvious that the distribution of species is significantly different for MSS and SSS. Regardless of the number of nitrogen atoms in the detected $[C_xH_yN_{1-5}O_{1-5}]^+$ ions, MSS species appear to be more oxygenated than SSS species. For MSS, $[C_xH_yN_{1-5}O_{1-5}]^+$ signals

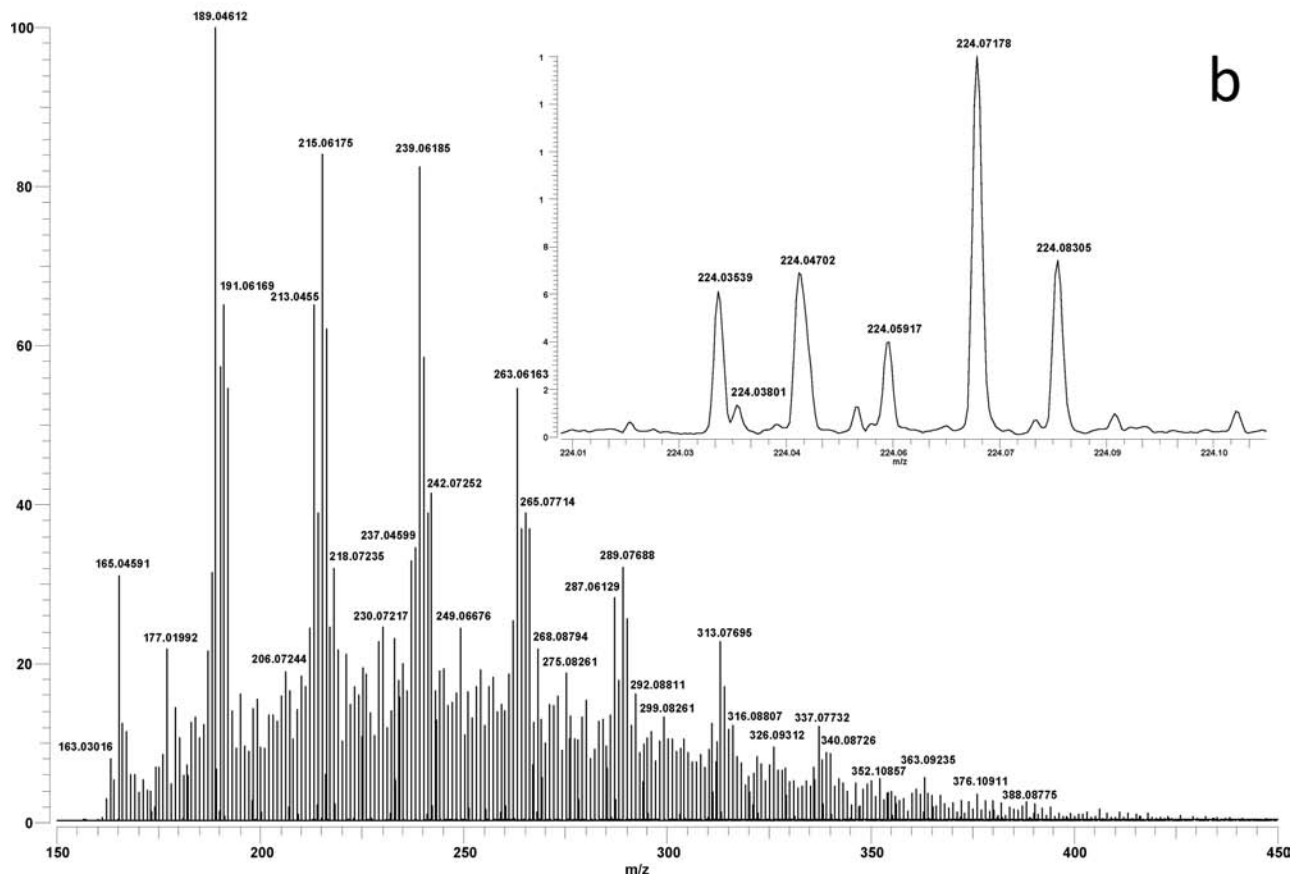
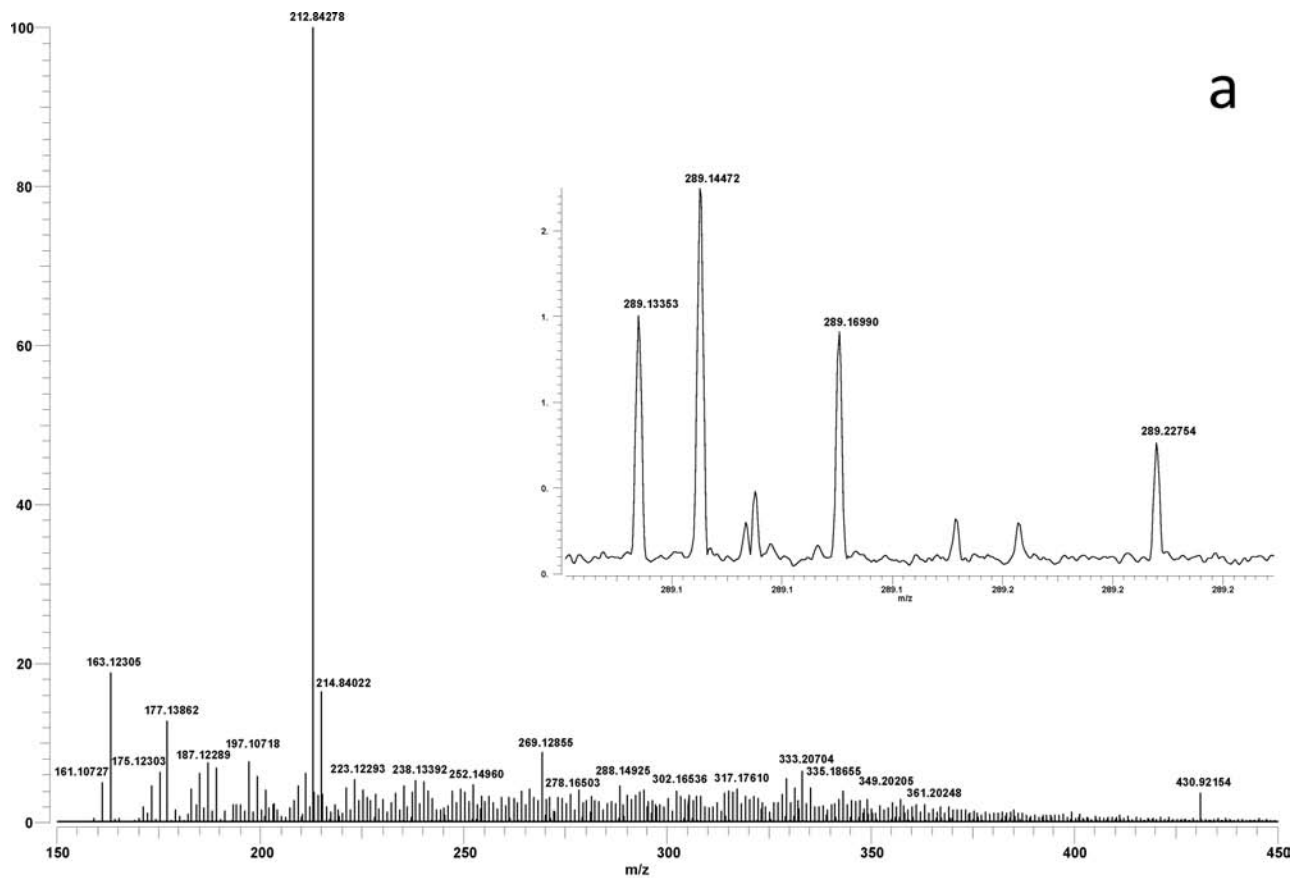


Figure 3. (a) Positive and (b) negative LDI-FTICR mass spectra of sidestream cigarette smoke of cigarette A collected on a quartz filter. Mass spectra were obtained at the 355 nm wavelength.

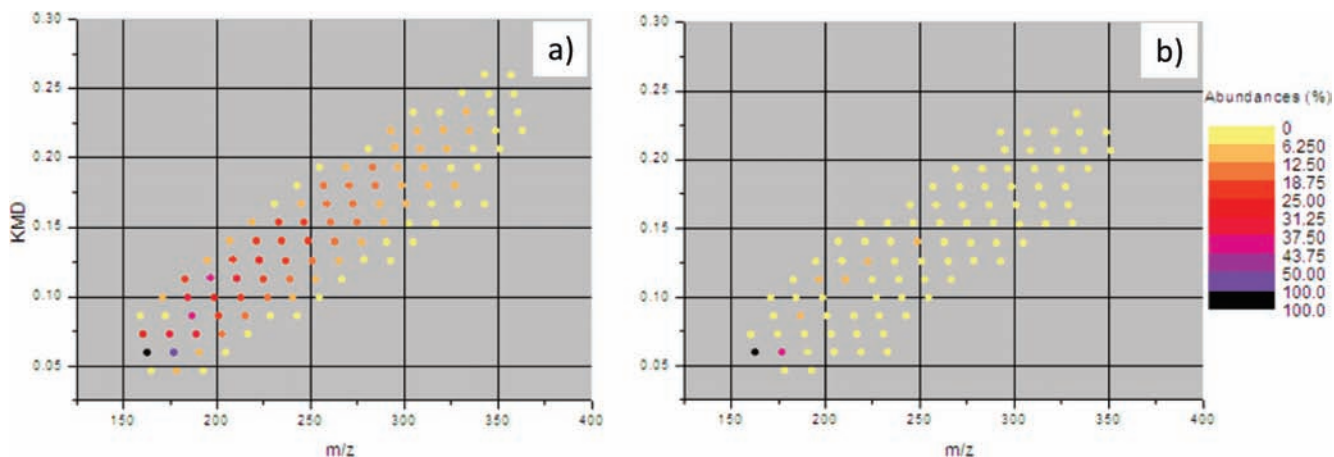


Figure 4. Kendrick maps of $C_xH_yN_2^+$ ions detected in the investigation of SSS (a) and MSS (b) collected on a quartz filter during the smoking of cigarette A.

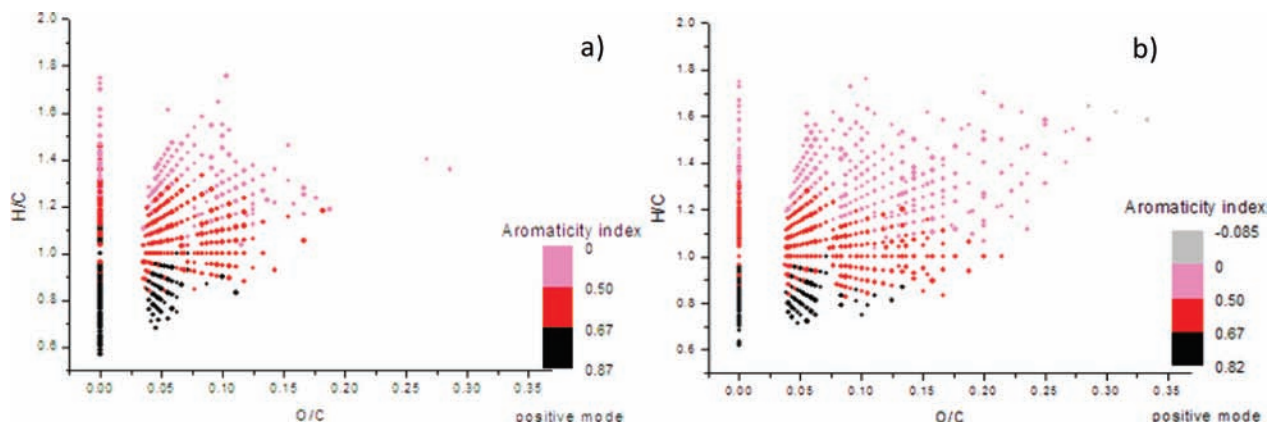


Figure 5. Positive ion oxygen/carbon–hydrogen/carbon Van Krevelen diagrams of (a) SSS and (b) MSS compounds collected during the smoking of cigarette A.

correspond to 70% of the detected species and to 60% of the TIC, whereas $[C_xH_yN_{1-5}]^+$ ions only represent $\sim 30\%$ of both the TIC and the number of detected species. The numbers of $[C_xH_yN_{1-5}O_{1-5}]^+$ and $[C_xH_yN_{1-5}]^+$ ions are found to be very close for SSS; nevertheless, the former ions correspond to $\sim 35\%$ of the TIC and the latter ions to more than half of the TIC.

Figure 4 reports the Kendrick map of $[C_xH_yN_2]^+$ ions for MSS and SSS. The same compounds are evidenced, but it is obvious that SSS involves more abundant $[C_xH_yN_2]^+$ species. In addition, SSS compounds are found to be more condensed for a given number of carbon atoms.

$[C_xH_yN_2O_2]^+$ ions are a good example to demonstrate the distribution differences between MSS and SSS oxygenated compounds. The TIC of these species is three times greater for MSS than for SSS, and the number of $C_xH_yN_2O_2$ compounds is two times greater for MSS than for SSS as shown in Figure 2. H/C–O/C Van Krevelen diagrams reported in Figure 5 for both MSS and SSS allow this analysis to be extended to all detected species.

Van Krevelen diagrams clearly highlight the more pronounced aromatic and condensed nature of species (red and black in Figure 5) for SSS PM. This is supported by the position of the different compounds detected by LDI in the O/C–H/C ratio Van Krevelen diagram and comparison with the integrated view of compositional space proposed by Hertkorn et al.³⁸

The number of compounds with AI ≥ 0.5 is more important for SSS (551, 65% of the TIC) than for MSS (494, 50% of the TIC). This is also evidenced when averaged DBE are compared. For negative ions, 10.6 and 12.6 values were obtained for MSS and SSS of cigarette A, respectively.

An intriguing behavior of SSS was also evidenced in the negative mass spectrum reported in Figure 3b. The distribution of the main peaks as a function of the number of carbons presents an odd/even effect. For example, $C_{11,13,15,17,19,21,23,25}H_{5,7,9}N_2^-$ ions are more abundant than $C_{12,14,16,18,20,22,24}H_{5,7,9}N_2^-$ ions, and the increment of mass between each of these ions is related to C_2 or C_2H_2 . The increase of the averaged DBE and this specific behavior for SSS may be a consequence of specific processes associated with the formation of SSS. In addition to the combustion of cigarette ingredients, the low level of oxygen during the main part of the collection time of SSS favors a pyrolysis phenomenon. It is well known that pyrolytic processes of organic compounds lead to the formation of C_2 species as well as dehydrogenation events. As a consequence, it is not surprising to observe more aromatic and condensed species in SSS on the one hand and to detect species for which the differences of global formulas were related to C_2 or C_2H_2 moieties on the other hand. Condensation of these species produced by the pyrolysis of tobacco well explains the observed odd/even alternation. Moreover, the high temperature of the

gas associated with MSS, which interacts with nonconsumed tobacco, may induce both a distillation of the most volatile compounds through unconsumed tobacco and their adsorption on MSS PM. These species are thought to be more saturated than those produced by the combustion of tobacco. Alternatively, the higher amounts of dioxygen and reactive oxygen species in the gas phase of MSS are also thought to be responsible for the higher amounts of oxygen atoms in a significant number of MSS components. This is confirmed by comparing the number of nonoxygenated $C_xH_yN_z^{+(\bullet)}$ species in MSS: 28% of detected signals and 32% of the TIC, and in SSS: 48% of detected signals and 54% of the TIC.

CONCLUSION

The methodology proposed in this paper allowed the full analysis of one of the more complex mixtures associated with "indoor" air pollutant. The ability of the collection method to yield reproducible samples allowed the comparison of cigarette smokes. The high mass resolution and the high mass measurement accuracy attained by FTICRMS, due to the capability of LDI to investigate particulate matter with a limited number of preparation steps, allowed specific fingerprints to be obtained for each of the investigated cigarette smokes. The nature and the distribution of the components for each of these cigarette smokes were rationalized with respect to the different phenomena related to the processes of smoking (combustion and pyrolysis). The detection of less unsaturated and more oxygenated compounds in MSS was specifically explained. Comparison with other complex mixtures of organic samples such as coal, petroleum, or NOM may be tentatively proposed but note that the ionization technique used significantly affects the nature and the distribution of ions as previously demonstrated by Hertkorn et al.³⁸ for ESI, APCI, and APPI. Laser desorption is known to efficiently ionize organic species, which absorb significantly at the laser wavelength used, regardless of their polarity. In this respect, cigarette smoke components appear to be mainly associated with condensed aromatics and nitrogen-rich species. In contrast, components of coal and crude oil are mainly associated with more or less saturated hydrocarbons with small amounts of nitrogen and oxygen,³⁷ whereas NOM are known to be more oxygenated.³⁸ The compositional differences are obviously linked to the different origins of these complex mixtures.

The obtained results provide the chemical formulas of numerous components without structural information. The use of an

FTICR mass spectrometer to perform MSⁿ experiments may increase the knowledge of cigarette smoke composition. Despite the high capability of FTICRMS in the field of tandem mass spectrometry, some limitations are evident, especially when MS/MS is performed on parent ions associated with complex samples such as an environmental matrix. The first limitation involves the selection of the parent ion because several ions may have the same nominal mass. As an example, 10 signals were detected in the range of m/z 216.03035 to 216.10317 in the negative mass spectrum from the LDI-FTICRMS analysis of MSS. This limitation may be overcome by a complex parent ion isolation sequence. However, different isomers may be attributed to a given detected signal. Consequently, the resulting MS/MS mass spectrum is the superposition of the different fragments produced after activation of each isomer, which significantly complicates the interpretation of the results. This difficulty is clearly associated with the technique used, which does not include the separation step prior to analysis. This may be overcome by using ion mobility. In this case, ions with the same chemical formula but different structures may be separated according to their cross-section after the ionization step but before structural identification with tandem mass spectrometry.

Future studies should focus on the identification of the components associated with PM exhaled by the smoker for two reasons. The first is to define the full composition of ETS, which relates to the smoke inhaled by the passive smoker. The second is to define the fraction of MSS components that are retained in the pulmonary alveoli of the active smoker.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank The French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche for funding. The authors also acknowledge valuable discussions with Prof. P. Chaimbault and Dr. B. Courrier. Prof. J.-J. Gaumet is also acknowledged for editing the manuscript.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review July 29, 2010. Accepted November 11, 2010.

AC1019842