



## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 39649 B1** (51) Cl. internationale : **G01N 1/40; G01N 1/28**
- (43) Date de publication : **30.11.2018**

- 
- (21) N° Dépôt : **39649**
- (22) Date de Dépôt : **30.12.2016**
- (71) Demandeur(s) :
- **UNIVERSITE HASSAN II, UNIVERISTÉ HASSAN II CASABLANCA- PRÉSIDENTE, 19 RUE TARIK BNOU ZIAD Casablanca (MA)**
  - **ECOLE SUPERIEURE DES INDUSTRIES DU TEXTILE ET DE L'HABILLEMENT (ESITH), KM 8 ROUTE D'EL JADIDA BP 7731 OULFA CASABLANCA (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **HANNACHE HASSAN ; GMOUH SAID ; ESSAMMAR ADNANE ; SAJID LAILA**
- (74) Mandataire : **ABDERRAHMANE FARHATE**

- 
- (54) Titre : **METHODE ET KIT D'EXTRACTION POUR LA DETERMINATION DES TENEURS EN AMINES AROMATIQUES ET ALIPHATIQUES DANS DIFFERENTES MATRICES**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne un kit d'analyse et une méthode d'extraction pour la détermination des teneurs en amines aromatiques et aliphatiques dans différentes matrices. 10 Selon l'invention le kit d'analyse comprend un adsorbant constitué de [0,1 à 2g] de NaCl, de [0 à 19] de Terre diatomée et de [0,1 à 10g] de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, d'un solvant choisi parmi les solvants organiques [toluène, dichlorométhane, éther, hexane, ... etc.] ou tout autre solvant reconnu pour son pouvoir de dissolution desdits amines comme de l'eau. Et d'un étalon interne choisi parmi [naphtalène- d8, 2,4,5- trichloroaniline, 4- anthracène- dl.O] ou tout 15 autre composé organique présentant les mêmes propriétés que les amines à analyser sans qu'il interfère avec eux. Le kit intervient dans la méthode en particulier par l'adsorbant au niveau de l'extraction SPE. La méthode se caractérise par un faible coût d'exécution et un rendement très élevé par rapport aux méthodes de l'art antérieur.

**Méthode et kit d'extraction pour la détermination des teneurs en amines aromatiques et aliphatiques dans différentes matrices.**

5

**Abrégé :**

La présente invention concerne un kit d'analyse et une méthode d'extraction pour la détermination des teneurs en amines aromatiques et aliphatiques dans différentes matrices.

- 10 Selon l'invention le kit d'analyse comprend un adsorbant constitué de [0,1 à 2g] de NaCl, de [0 à 1g] de Terre diatomée et de [0,1 à 10g] de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, d'un solvant choisi parmi les solvants organiques [toluène, dichlorométhane, éther, hexane, ... etc.] ou tout autre solvant reconnu pour son pouvoir de dissolution desdits amines comme de l'eau. Et d'un étalon interne choisi parmi [naphtalène- d8, 2,4,5- trichloroaniline, 4- anthracène- d10] ou tout
- 15 autre composé organique présentant les mêmes propriétés que les amines à analyser sans qu'il interfère avec eux. Le kit intervient dans la méthode en particulier par l'adsorbant au niveau de l'extraction SPE. La méthode se caractérise par un faible coût d'exécution et un rendement très élevé par rapport aux méthodes de l'art antérieur.

**Méthode et kit d'extraction pour la détermination des teneurs en amines aromatiques et aliphatiques dans différentes matrices.**

5

**Domaine de l'invention**

La présente invention se rapporte au domaine des méthodes d'analyse de laboratoire. Elle concerne en particulier une méthode et un kit d'extraction pour la détermination des teneurs en amines aromatiques et aliphatiques dans différentes matrices.

10

**Etat de l'art antérieur**

Les amines aromatiques sont des composés solides ou liquides utilisés pour la synthèse des matières colorantes, des produits pharmaceutiques, dans l'industrie du caoutchouc et des matières plastiques. La principale voie d'exposition aux amines aromatiques est la voie cutanée, surtout en milieu professionnel.

15

Les colorants sont des composés chimiques colorés, naturels ou synthétiques, en général organiques. Dans certaines conditions, ils possèdent la propriété de colorer durablement le support sur lequel ils sont appliqués. Ils se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible par l'œil humain (de 400 à 700 nm). Tous les composés répondant à cette définition se différencient par leur structure chimique, organique ou inorganique, ou par leur origine, naturelle ou synthétique. Ces composés sont utilisés pour colorer les textiles, les encres, les peintures, les vernis, les produits alimentaires, etc. Deux grandes familles de colorants peuvent être distinguées : Les colorants naturels et les colorants synthétiques.

20

25

L'industrie des matières colorantes est née en Angleterre en 1856, avec la découverte de Perkin. Dès lors, de nombreuses entreprises se créèrent en France, en Suisse (fabrication de la fuchsine à Bâle) puis en Allemagne sous l'impulsion de chimistes, dont le professeur Hofmann. En outre, les travaux de recherches engagés par la Badische Anilin und Soda Fabrik (B.A.S.F.) conduisirent, en 1897, à la production de l'indigo synthétique. En 1975 on retrouvait, parmi les principaux pays producteurs de colorants, les États-Unis, la république fédérale d'Allemagne, la Grande-Bretagne, la France ainsi que de nouveaux concurrents comme le Japon, l'U.R.S.S. et l'Italie. Parmi les

30

colorants qui ont été développés les colorants azoïques restent la famille la plus utilisée dans le domaine du textile.

Les colorants azoïques constituent la famille la plus importante tant sur le plan de l'application, 5 puisqu'ils représentent plus de 50 % de la production mondiale de matières colorantes, que sur celui de la multiplicité des structures. Ces structures, qui reposent généralement sur le squelette de châssis, sont des systèmes aromatiques ou pseudo-aromatiques liés par un groupe Azo ( $-N=N-$ ). Le groupe Azo peut être répété plusieurs fois dans la molécule pour obtenir les disazoïques, trisazoïques, etc. L'introduction dans un tel édifice de substituants, donneurs 10 d'électrons sur l'un des cycles aromatiques et accepteurs d'électrons sur le second cycle, permet d'augmenter le phénomène de résonance. C'est ainsi que l'on peut influencer plus ou moins sur la couleur et sur les qualités de teinture.

Les jaunes sont facilement obtenus avec les pyrazolones ou les dérivés acétoacétylés, les naphthols 15 simples conduisent aux orangés et aux rouges, tandis que les bleus, les bruns, les noirs dérivent des aminonaphthols. L'obtention de belles nuances vertes est plus difficile, car le déplacement bathochrome s'accompagne le plus souvent d'un élargissement des bandes, donc diminue la pureté et la vivacité des nuances. La méthode la plus courante de préparation des colorants azoïques comporte la diazotation d'une amine primaire aromatique et la copulation du sel de 20 diazonium ainsi obtenu sur un phénol ou une amine.

Les colorants azoïques insolubles sont formés directement sur la fibre. En effet, au cours d'une première étape le support textile est imprégné d'une solution de naphthol ou copulant. Il est 25 ensuite traité avec une solution de sel de diazonium qui, par réaction de copulation, entraîne le développement immédiat du colorant azoïque. Ces colorants sont utilisés en teinture ou en impression des fibres cellulosiques, notamment dans les tons jaunes, orange et rouges.

Les colorants azoïques "sont de la classe chimique la plus importante de colorants dans l'industrie textile, tandis que 70% de colorants organiques sur le marché sont utilisés pour colorer les fibres naturelles et synthétiques, de la nourriture, des bonbons, des cosmétiques et des boissons.

30 Les colorants azoïques sont divisés en pigments solubles et insolubles, .Colorants solubles dans l'eau utilisée dans la teinture textile et les colorants liposolubles et des pigments dans l'impression.

La fabrication des colorants azoïques "est appelé processus de diazotation par lequel une amine aromatique (également appelé composant diazo) se transforme en un élément de diazonium qui réagit à son tour avec un composant de couplage, qui peut être le phénol, ou Naphtol une amine pour former le colorant.

- 5 Fournissant une grande variété de composants et pièces d'accouplement diazo possible, l'intervalle de variation de la «colorants azoïques est très grand. Le nombre de combinaisons augmente depuis le colorant "azo" peut avoir plus d'un composé azoïque.

La couleur-indice de l'industrie textile allemande comprend plus de 800 couleurs et 600 auxiliaires d'apprêtage. «Azo» Les colorants peuvent être : acide, base, mordant, réactifs, dispersés, directs,  
10 des solvants ou des colorants alimentaires.

Un article textile teint avec un colorant à risque mal fixé présente des solidités teintures plutôt faibles, ce qui peut entraîner, en cas de transpiration par exemple, un dégorgeement du colorant sur la peau. La liaison chimique azoïque est alors rompue et l'amine aromatique ainsi libérée est  
15 assimilée par l'organisme. Celle-ci, par l'intervention des azoréductases (enzymes dégradant l'amine), peut ainsi provoquer un risque de cancer.

Le principal risque d'absorption est le contact avec la peau car les amines aromatiques sont liposolubles. Un risque important qui est rarement pris en compte dans la pratique industrielle de certains pays qui font l'impasse des droits des travailleurs. Il existe également un risque  
20 considérable d'absorption par voie inhalatrice. Celle-ci peut se produire par inhalation de vapeurs, encore que la plupart de ces amines soient peu volatiles à température ordinaire, ou de poussières émanant de produits solides.

Le cancer des voies urinaires (en particulier de la vessie), le risque d'intoxication aigüe qui peut produire des effets nocifs sur les globules rouges, la sensibilisation de la peau mais aussi des voies  
25 respiratoires... tous ces effets pathologiques sont dus à ces amines aromatiques.

Pour assurer la sécurité du consommateur, de nouvelles normes que se soit pour le textile, pour les articles chaussants ou dans d'autre domaines imposent des limites maximales de résidus (LMR) de plus en plus faibles dans les matrice textiles et cuir, d'où une nécessité pour les  
30 laboratoires d'analyses de s'adapter constamment et de développer des méthodes d'analyses de résidus cancérigènes toujours plus performantes.

La présence de ces résidus dans les habits ne doit pourtant pas être écartée. Elle pourrait même, au vu de leurs contact direct et permanent avec la peau constituer un problème de santé publique.

5 Due aux faibles niveaux de détection exigés par la réglementation et la nature complexe des matrices dans lesquelles les composés d'intérêts sont présents, la préparation d'échantillon, la détection et l'identification des composés à des niveaux de traces sont des aspects importants des méthodes analytiques.

10 Malgré l'avancée des techniques analytiques, les échantillons sont trop complexes pour être analysés sans étape préalable de traitement de l'échantillon. Cette dernière permet à la fois de fournir un extrait enrichi en composés mais aussi de minimiser au maximum la présence d'interférents lors de la détection finale. Leur présence peut rendre en effet plus difficile l'analyse des composés d'intérêt. La préparation de l'échantillon comprend en général l'extraction, la concentration et éventuellement une purification.

15 L'expérience et l'examen approfondi du protocole normatif d'analyse des échantillons permet de constater que l'étape de traitement des échantillons analytiques, étape non dissociable de la méthode d'analyse, apporte en général, la majeure partie de l'erreur analytique (justesse, fidélité) et représente le facteur limitant en termes de rapidité et d'automatisation. En effet cette étape  
20 est trop longue (environ **75 min**) et limite le taux de récupération à environ 20% dans le cas de l'amine (4-méthoxy-m-phénylènediamine) par exemple.

#### **Description sommaire de l'invention :**

25 La présente invention a pour objectif de mettre en oeuvre une nouvelle méthode de détection de traces d'amines aromatiques et aliphatiques dans des matrices, ayant une efficacité élevée et permettant de réaliser des gains en termes de temps d'analyse et du coût comparée aux méthodes de l'art antérieur grâce à une amélioration considérable du taux de récupération et du temps d'analyse.

30 Pour se faire, l'invention vise la mise au point d'une méthode d'extraction rapide et efficace pour remplacer l'étape d'extraction sur support solide décrite dans la norme en se basant sur l'adaptation d'une technique d'extraction selon un procédé dit de « Quechers » ,qui est une technique récemment homologuée dans le domaine de l'agroalimentaire, au protocole normalisé

d'analyse . La méthode « Quechers » permet de faire le criblage de pesticides dans les denrées alimentaires.

5 QuEChERS (**Quick- Easy- Cheap- Effective- Rugged- Safe**) est une méthode d'analyse multi-résidus appliquée pour la détermination des pesticides dans les aliments d'origine végétale tels que les fruits, les légumes, les céréales, ainsi que leurs produits dérivés. Son principe consiste à extraire les pesticides avec un solvant organique. Un aliquote est ensuite prélevé et purifié par SPE (extraction en phase solide) dispersive, à l'aide d'adsorbants et de sulfate de magnésium pour retirer l'eau résiduelle par simple centrifugation.

10 L'invention adopte ce type de protocole pour la détermination des résidus d'amines aromatiques et aliphatiques après leur extraction des différentes matrices.

Toutefois le challenge est de trouver un bon système d'adsorption qui permet à la fois une bonne élimination d'interférents et un bon taux de récupération (au moins égale à celui décrit par la méthode normalisée). La suite de la description est basée, à titre d'exemple non limitatif,  
15 concerne un cas d'amines aromatiques dans des matrices cuir et textile

#### **Brève description des figures :**

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront clairement à la lecture de la description suivante de plusieurs réalisations de l'invention, données à titre d'exemples non  
20 limitatifs, en référence aux dessins annexés correspondants dans lesquels :

**Figure 1** : est un schéma global du processus d'analyse des amines aromatiques

**Figure 2** : représente un logigramme de la méthode normalisée.

**Figure 3** : les différentes étapes du procédé « Quechers »

**Figure 4** : représente le logigramme de la nouvelle méthode généralisée.

25 **Figure 5** : diagramme de comparaison des solvants.

#### **Description détaillée de l'invention :**

L'invention propose une méthode alternative à la méthode normalisée illustrée dans la **figure 2** en se basant sur le protocole dit « Quechers » avec des ajustements pour l'adapter à la détection des  
30 amines aromatiques et aliphatiques en particulier le choix de l'adsorbant.

Avant la poursuite de la mise en place d'un tel protocole, nous avons décidé d'évaluer l'efficacité de l'extraction de la SPE (Solid-Phase Extraction) dispersive. Pour cela, plusieurs mélanges ont été

testés comme support adsorbant ; lors de ces essais, un mélange basé sur la terre diatomée, sulfate de sodium, chlorure de sodium et charbon actif a été retenu comme support absorbant:

- ✓ La terre diatomée pour éliminer les sels et autres interférents
- ✓ Le sulfate de sodium et chlorure de sodium pour adsorber l'eau. (Il faut signaler que le sulfate de magnésium, couramment utilisé dans la méthode Quechers, a été écarté volontairement. En effet, le magnésium est connu pour chélater les amines et former des complexes stables)
- ✓ Charbon actif pour éliminer les colorants non azoïques

5

10

Plusieurs mélanges ont donc été testés avec une application pré et post purification pour en évaluer l'influence selon le protocole normatif de la figure 2. Cette étude a été réalisée, sur un mélange de 4 amines choisit pour couvrir les différents taux de récupération décrits dans la norme à savoir 70% ; 50% et 20%.

15

20

L'extraction doit être menée avec précaution lors de l'analyse de matrices complexes pouvant contenir des interférents. Leur élimination représente une étape primordiale du processus analytique global. Par ailleurs, il a été montré que le traitement de l'échantillon avant l'analyse chromatographique constituait deux tiers du temps total et représentait une des principales sources d'erreurs sur les résultats de mesure. Ces procédures occupent donc une majeure partie de la durée globale de l'analyse et contribuent fortement à son coût. De plus, ces étapes influent considérablement sur la fiabilité et l'exactitude des résultats, ce qui se traduit par la nécessité de contrôler le processus analytique global.

25

La surveillance de la présence d'amines aromatiques dans les articles textile dans le domaine de la santé publique est confrontée à la quantification et l'identification de certaines molécules ayant des propriétés physico-chimiques différentes dans des matrices variées. Aussi, des méthodes sensibles, sélectives, fiables et engendrant un coût modéré sont nécessaires et représentent un enjeu non négligeable voire même un défi pour l'analyste.

Les teneurs en amines aromatiques prohibées sont déterminées selon deux normes **NF EN ISO14362-1** et **NF EN ISO14362-3**. Les amines aromatiques interdites sont regroupées dans le tableau 1 ci-dessous :

30



N°	Amine	N°de cas
1	biohényl-4-ylamine	92-67-1
2	benzidine	92-87-5
3	4-chloro-o-toluidine	95-69-2
4	2-naphthylamine	91-59-8
5 <sup>a)</sup>	o-aminoazotoluène	97-56-3
6 <sup>a)</sup>	5-nitro-o-toluidine	99-55-8
7	4-chloroaniline	106-47-8
8	4-méthoxy-m-phénylènediamine	615-05-4
9	4,4-méthylènedianiline	101-77-9
10	3,3'-dichlorobenzidine	91-94-1
11	3,3'-diméthoxybenzidine	119-90-4
12	3,3'-diméthylbenzidine	119-93-7
13	4,4'-méthylènedi-o-toluidine	838-88-0
14	6-méthoxy-m-touidine	120-71-8
15	4,4-méthylène-bis-(2-chloro-aniline)	101-14-4
16	4,4-oxydianiline	101-80-4
17	4,4-thiodianiline	139-65-1
18	o-toluidine	95-53-4
19	4,4-méthyl-m-phénylènediamine	95-80-7
20	2,4, 5-triméthylaniline	137-17-7
21	o-anisidine	90-04-0
22 <sup>b)</sup>	4-aminoazobenzène	60-09-3
23	Aniline	95-53-4

Le protocole de la détermination des amines aromatiques consiste en trois étapes tel qu'illustré à la figure 2 :

- ✓ Etape pré-analytique
- ✓ Etape analytique
- ✓ Etape post-analytique

Les différentes étapes et le temps nécessaire pour leurs réalisations sont illustrés sur la **figure 2**.

L'expérience et l'examen approfondi de ce protocole, permet de constater que l'étape de traitement des échantillons analytiques, étape non dissociable de la méthode d'analyse, apporte en général, la majeure partie de l'erreur analytique (justesse, fidélité) et représente le facteur limitant en termes de rapidité et d'automatisation. Ces remarques ont été également confirmées par une étude du coût relatif à cet essai, En effet , l'étude du prix de revient tenant compte des différents paramètres selon le diagramme causes-effets d'ISHIKAWA « la méthode 5M » montre que les charges dues à la méthode restent de loin les plus importantes et elles dépassent 70% du coût global.

#### **Développement du nouveau Protocole de test selon l'invention:**

Après l'étape de réduction réalisée selon le même protocole normalisé décrit dans la figure 2, la purification commence par l'introduction de 5 mL d'extrait dans un tube contenant un mélange constitué du sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), de la terre diatomée , du chlorure de sodium( $\text{NaCl}$ ) et du charbon actif. Les tubes sont agités pendant une minute au vortex, puis centrifugés pendant 5 minutes à 3000 tr/min à température ambiante. 1 mL de surnageant est ensuite prélevé et injecté ( $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$ ) en GC/MS avec ajout préalable d'étalon interne (EI) dont le rôle est de corriger et assurer la reproductibilité du système d'injection de la GC/MS.

L'étalon interne est choisi parmi le [naphtalène-  $d_8$ , 2,4,5- trichloroaniline, 4- anthracène-  $d_{10}$ ] ou tout autre composé organique présentant les mêmes propriétés que les amines à analyser sans qu'il interfère avec eux.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact du charbon actif sur les taux de récupération. Les essais réalisés en utilisant différentes quantités du charbon actif (100mg, 25mg et 10mg) montrent que les taux de récupération en amines sont toujours inférieurs à 10% quel que soit la nature du mélange. Ces taux de récupération sont dus à la bonne adsorption des amines sur le charbon actif. En effet, les amines aromatiques possèdent une forme moléculaire plane qui s'adsorbe parfaitement sur le charbon.

Dans une seconde phase, nous avons ensuite concentré notre étude sur le mélange constitué du sulfate de sodium, chlorure de sodium et terre diatomée. Pour cela, nous avons préparé quinze

mélanges afin d'évaluer grossièrement l'influence de chacun des trois constituants sur les taux de récupération et déduire un mélange à optimiser dans une autre phase.

L'examen des résultats obtenus montre que :

- ✓ l'utilisation d'une quantité excédant 2g de terre diatomée réduit significativement les taux de récupération de 26% à 3% dans le cas de l'amine (4-méthoxy-m-phénylènediamine) par exemple.
- ✓ Sur quinze mélanges testés, Les mélanges (1, 2, 3, 4) du tableau 2 ci-dessous permettent d'obtenir des taux de récupération aussi bien que ceux déterminé par la norme.

10 **Tableau 2 :**

Amines	Exigences minimales du taux de récupération (Norme)	Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3	Mélange 4
		5g (NaCl) + 5g (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) + 2g (terre diatomée)	10g (NaCl) + 2g (terre diatomée)	10g (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) + 2g (terre diatomée)	Mélange (5g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 1g Terre diatomée + 1g NaCl)
		TR%	TR%	TR%	TR%
4-méthoxy-m-phénylènediamine	20%	43%	36%	64%	97%
4,4-méthylènedianiline	70%	104%	106%	117%	114%
4,4'-méthylènedi-o-toluidine	70%	100%	107%	99%	122%
4,4-méthyl-m-phénylènediamine	50%	64%	59%	73%	99%

Suite à cette étude préliminaire et afin d'optimiser le mélange nous avons procédé à un plan d'expérience sur la base du mélange qui a permis d'avoir les meilleurs taux de récupération (Mélange 4). A savoir le mélange constitué de :

- 15 5g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (facteur 1)
- 1g de Terre diatomée **TD** (facteur 2)
- 1g de NaCl (facteur 3)

Afin d'optimiser le mélange nous avons procédé à un plan d'expériences complet 3 niveaux (1,2,3) à 3 facteurs (A, B, C) et nous avons varié les différents facteurs tenant compte des conclusions de la phase 2.

Les limites choisit pour chaque facteur sont

$$5 \quad \begin{array}{l} 1- \\ 2- \\ 3- \end{array} \quad \text{NaCl (A)} \left\{ \begin{array}{l} 0\text{g} \\ 1\text{g} \\ 2\text{g} \end{array} \right. \quad \text{TD (B)} \left\{ \begin{array}{l} 0\text{g} \\ 1\text{g} \\ 2\text{g} \end{array} \right. \quad \text{Na}_2\text{SO}_4 \text{ (C)} \left\{ \begin{array}{l} 5\text{g} \\ 7\text{g} \\ 9\text{g} \end{array} \right.$$

Les essais réalisés sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Taux de récupération cible				20%	70%	50%	
Entrée	Facteur A	Facteur B	Facteur C	Remarques	Rdt amine	Rdt amine	Rdt Amines
1	1	1	1	Bonne adsorption	62%	70%	73%
2	1	1	2	Bonne adsorption	84%	80%	93%
3	1	1	3	Adsorption totale	0%	0%	0%
4	1	2	1	Bonne adsorption	84%	88%	94%
5	1	2	2	Bonne adsorption	93%	102%	102%
6	1	2	3	Adsorption totale	0%	0%	0%
7	1	3	1	Bonne adsorption	84%	98%	93%
8	1	3	2	Bonne adsorption	80%	96%	93%
9	1	3	3	Adsorption totale	0%	0%	0%
10	2	1	1	Excès d'eau	82%	107%	93%
11	2	1	2	Peu d'eau	79%	96%	89%
12	2	1	3	Adsorption totale	0%	0%	0%
13	2	2	1	Excès d'eau	78%	97%	87%
14	2	2	2	Bonne adsorption	90%	99%	98%
15	2	2	3	Adsorption totale	0%	0%	0%
16	2	3	1	Excès d'eau	82%	95%	94%
17	2	3	2	Bonne adsorption	76%	98%	90%
18	2	3	3	Adsorption totale	0%	0%	0%
19	3	1	1	Excès d'eau	88%	99%	97%
20	3	1	2	Bonne adsorption	70%	96%	82%
21	3	1	3	Adsorption totale	0%	0%	0%
22	3	2	1	Excès d'eau	70%	96%	83%
23	3	2	2	Bonne adsorption	65%	101%	77%
24	3	2	3	Adsorption totale	0%	0%	0%
25	3	3	1	Excès d'eau	74%	104%	85%
26	3	3	2	Bonne adsorption	80%	103%	92%
27	3	3	3	Adsorption totale	0%	0%	0%

Nous constatons que le mélange 14 constitué de 1g de **NaCl**, 1g de **TD** et 7g de **Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** reste le mélange de choix et permet d'atteindre des taux de récupération avoisinant les 100% (voir entrée 14 du tableau ci-dessus).

- 5 Selon un autre aspect de l'invention et afin de réduire encore plus le coût de revient de l'essai, nous avons réalisé une étude sur l'influence de la nature du solvant. Pour cette étude nous avons opté pour l'utilisation de solvants communs et moins onéreux que le ter-butylméthyléther. Les résultats obtenus sont illustrés sur le graphe **figure 5**. Pour les besoins de l'invention nous avons testé les solvants suivants : l'acétonitrile, acétate d'éthyle, dichlorométhane et méthanol.

10

**Protocole de la méthode élaborée :**

Le protocole de la nouvelle méthode selon l'invention est illustré à la **figure 4**. Il regroupe l'ensemble des étapes avec le temps nécessaire à la réalisation de chaque étape de la nouvelle méthode.

- 15 La méthode selon l'invention comprend les étapes suivantes :

Etape 1- certaines matrices peuvent nécessiter une extraction au préalable de précurseurs contenant les amines. Cette extraction peut être réalisée au moyen de solvants de choix reconnus par l'art antérieur.

- 20 A titre d'exemple, les matrices en plastiques, pâtes, résines, bois nécessitent une extraction au préalable. Ladite extraction est suivie par une évaporation de solvant par un moyen adéquat d'évaporation tel qu'un rota vapeur, un speed VAC, un lyophilisateur...etc.

- Etape 2- en cas de besoin, les amines doivent être libérées des différents précurseurs moyennant des réactions chimiques telles que les réductions, oxydation, ou toute autre réaction permettant la rupture de toute liaison chimique avec le précurseur. A titre d'exemple, pour les colorants azoïques dans le textile, cuir et matrice agroalimentaire.

- 25 Etape 3- extraction des amines à partir d'un échantillon de la matrice ou de leurs précurseurs préalablement extraits (étape 1). Ladite extraction se fait par ajout d'un volume d'un solvant qui n'est pas miscible avec la matrice, ne doit pas interférer avec la matrice (la dissoudre partiellement ou totalement), ne doit pas extraire des matières interférentes avec les amines. Le solvant selon l'invention est choisi parmi les solvants organiques [toluène, dichlorométhane, éther, hexane....etc.] ou tout autre solvant reconnu pour son pouvoir de dissolution audits amines
- 30 tel que l'eau. L'opération peut se faire selon le cas avec ou sans chauffage.

Etape 4- extraction SPE par Ajout de la solution obtenu à l'étape 3 sur un mélange adsorbant composé de **NaCl**, de **TD** et de **Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** puis agiter vigoureusement.

Etape 5- ajout de l'étalon interne puis centrifuger pendant 5 min à une vitesse de 3000 tr/min.

Etape 6- Analyse du surnageant par une technique d'analyse permettant l'identification et/ou la quantification des amines comme la technique de chromatographie (ex. GC/MS)

Selon un autre aspect de l'invention, l'étape d'extraction SPE fait appel à un kit pour réaliser l'opération d'extraction. Ledit kit est constitué de composé pour réaliser les fonctions suivantes :

- élimination de l'eau
- 10 - élimination des interférents comme les macromolécules, les sels organiques et inorganiques...etc.

Le kit selon l'invention comprend un ensemble de tubes adaptés pour la centrifugation et caractérisés en ce que :

- 15 - Un premier tube comprenant un mélange adsorbant constitué de [0,1 à 2g] de NaCl, de [0 à 1g] de Terre diatomée et de [0,1 à 10g] de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- un deuxième tube comprenant un solvant pour l'extraction des amines directement à partir d'une matrice ou indirectement à partir des précurseurs de la dite matrice.
- un troisième tube comprenant un étalon interne pour corriger et assurer la reproductibilité de la technique d'analyse.

20

#### **Etude comparative des charges relatives à la nouvelle méthode par rapport à la méthode normalisée :**

25 Cette étude a été réalisée selon la même démarche en tenant compte des différents paramètres selon la méthode des 5M.

Le Tableau ci-dessous est une comparaison entre le coût des charges nécessaires pour la réalisation de l'essai par la méthode -norme- et par la méthode développée « QUECHERS »

Charges		Norme			QuEACHERS			Economie		
		Coût en Dh	Coût en €	% du PR complet	Coût en Dh	Coût en €	% du PR complet	En Dh	en €	En %
Charges techniques	Solvants	38,41	3,44	71,8%	3,94	0,35	48,0%	34,47	3,09	90%
	Réactif	22,75	2,04		3,69	0,33		19,06	1,71	84%
	Standards	9,87	0,88		5,28	0,47		4,58	0,41	46%
	Consommables	33,68	3,02		16,64	1,49		17,04	1,53	51%
	Frais salariaux techniques	109,38	9,81		46,88	4,20		62,50	5,61	57%
Charges de gestion	Frais salariaux de gestion	13,26	1,19	4,4%	13,26	1,19	8,3%	0	0	0%
Charges indirectes	Gaz	1,56	0,14	23,7%	1,56	0,14	43,6%	0,00	0,00	0%
	Électricité	30,09	2,70		29,75	2,67		0,34	0,03	1%
	Métriologie des équipements	0,46	0,04		0,42	0,04		0,04	0,00	8%
	Amortissement des équipements	38,55	3,46		37,68	3,38		0,86	0,08	2%
Total		297,99	26,73		159,10	14,27		138,89	12,46	47%

L'examen du tableau nous permet de constater que le coût de revient relatif à l'essai a été réduit de 27 à 14 euros en utilisant la nouvelle méthode. Cette réduction est principalement due à la réduction des charges techniques. En effet comme illustré dans le tableau:

- 5 ➤ Le coût des solvants et consommables a été nettement réduit (3 au lieu de 9 euros) ceci est justifié par la réduction du volume du solvant d'extraction et la quantité des consommables.
- 10 ➤ La réduction la plus importante correspond au frais salariaux. Le coût relatif à ce poste est passé de 10 à environ 4 euros car le temps nécessaire à la réalisation de l'essai selon la nouvelle méthode n'est que de 1h30min au lieu 3h30min en utilisant le protocole décrit dans la norme.

Ces résultats très intéressants nous ont incités à valider la nouvelle méthode afin de l'adopter comme méthode interne et permettre une meilleure compétitivité au laboratoire.

15 Selon un dernier aspect de l'invention, la méthode a été validée selon les exigences de la norme « NF T 90-210 » de mai 2009 « Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire » qui se repose sur quatre plans d'expériences.

- le plan A : Etude de la fonction d'étalonnage.
- le plan B : Etude de la limite de Quantification présupposée.
- 20 - le plan C : Etude des rendements.

- le plan D : Etude de l'exactitude.

Chaque plan est caractérisé par un certain nombre d'essais à réaliser que l'on devra ensuite valider au moyen de tests statistiques.

5 La linéarité, la sensibilité, la répétabilité, les limites de quantification, la fidélité, la justesse et l'exactitude ont été étudiées et attestent que la méthode, concernant les amines aromatiques possède les performances nécessaires pour répondre aux exigences de la réglementation. Ainsi à l'issue de cette évaluation, la méthode pourra être utilisée comme méthode d'analyse au laboratoire.

10 Cette nouvelle méthode mise en place et validée, selon l'invention, a abouti aux résultats suivants :

- Taux de récupération pour l'ensemble des amines dépassant 85 %
- Gain en consommables, produits chimiques et standards de 60 %
- Gain en temps total moyen d'analyse de 30 %
- 15 • Diminution du coût de revient de 47 %
- Validation de la méthode selon la norme NF T 90-210

20

25

30



**Revendications :**

1. Kit d'analyse pour la détection et la quantification des amines aromatiques ou aliphatiques dans une matrice **caractérisée en ce qu'il** est constitué :
  - d'un adsorbant à base d'un mélange de NaCl, de terre diatomée et de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour éliminer l'eau et les interférents.
  - d'un solvant pour l'extraction des amines directement à partir d'une matrice ou indirectement à partir des précurseurs de la dite matrice.
  - d'un étalon interne pour corriger et assurer la reproductibilité de la technique d'analyse.
  
2. Kit d'analyse selon la revendication 1 **caractérisé en ce que** la quantité de NaCl dans le mélange adsorbant est comprise entre 0,1g et 2g.
  
3. Kit d'analyse selon la revendication 1 **caractérisé en ce que** la quantité de terre diatomée dans le mélange adsorbant est comprise entre 0g et 1g.
  
4. Kit d'analyse selon la revendication 1 **caractérisé en ce que** la quantité de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans le mélange adsorbant est comprise entre 0,1g et 10g.
  
5. Kit d'analyse selon la revendication 1 **caractérisé en ce que** le solvant pour l'extraction des amines est choisi parmi les solvants organiques [toluène, dichlorométhane, éther, hexane, ... etc.] ou tout autre solvant reconnu pour son pouvoir de dissolution audits amines comme de l'eau.
  
6. Kit d'analyse selon la revendication 1 **caractérisé en ce que** l'étalon interne est choisi parmi [naphtalène- d<sub>8</sub>, 2,4,5- trichloroaniline, 4- anthracène- d<sub>10</sub> ] ou tout autre composé organique présentant les mêmes propriétés que les amines à analyser sans qu'il interfère avec eux.
  
7. Méthode de détection et de quantification des amines aromatiques ou aliphatiques dans une matrice en utilisant le kit des revendications précédentes **caractérisée en ce qu'elle** comprend les étapes suivantes :
  - extraction au préalable de précurseurs contenant les amines à partir d'un échantillon de

la matrice à l'aide du solvant, suivie par une évaporation du solvant par un moyen adéquat d'évaporation tel qu'un rota vapeur, speed VAC, lyophilisateur...etc.

- libération des amines à partir des différents précurseurs moyennant des réactions chimiques.

- extraction des amines, directement de la matrice ou indirectement à partir des précurseurs, par ajout d'un volume du solvant du kit.

- extraction SPE par ajout dans un tube contenant la solution obtenue à l'étape précédente du mélange adsorbant du kit composé de NaCl, de terre diatomée et de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, suivi d'une agitation.

- ajout d'un étalon interne dans le tube puis centrifugation pendant 5 min à une vitesse d'au moins 3000 tr/min.

- prélèvement du surnageant du tube pour l'analyser par une technique d'analyse permettant l'identification et/ou la quantification des amines.

8. Méthode selon la revendication 7 **caractérisée en ce que** la libération des amines à partir des différents précurseurs peut se faire par des réactions de réductions, d'oxydation, ou toute autre réaction permettant la rupture de toute liaison chimique avec le précurseur.

9. Méthode selon les revendications 7 et 8 **caractérisée en ce que** la technique d'analyse est la chromatographie GC/MS.

10. Utilisation du kit et de la méthode des revendications 1 à 9 pour la détection des amines aromatiques ou aliphatiques dans des matrices textile, cuir et agroalimentaire pour la détection des amines au niveau des colorants azoïques.

1/5

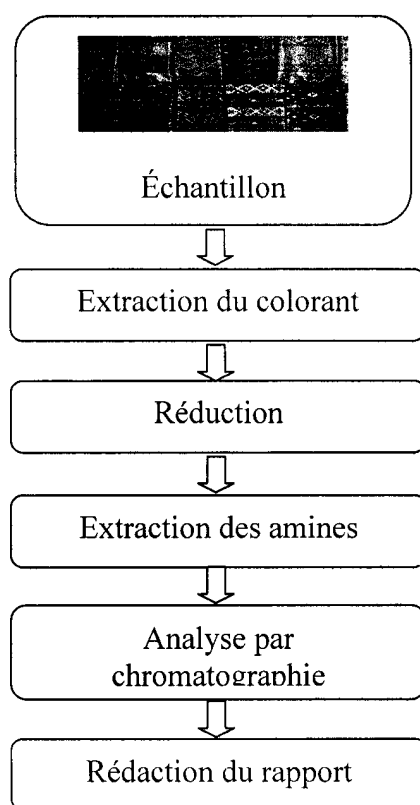


Fig. 1

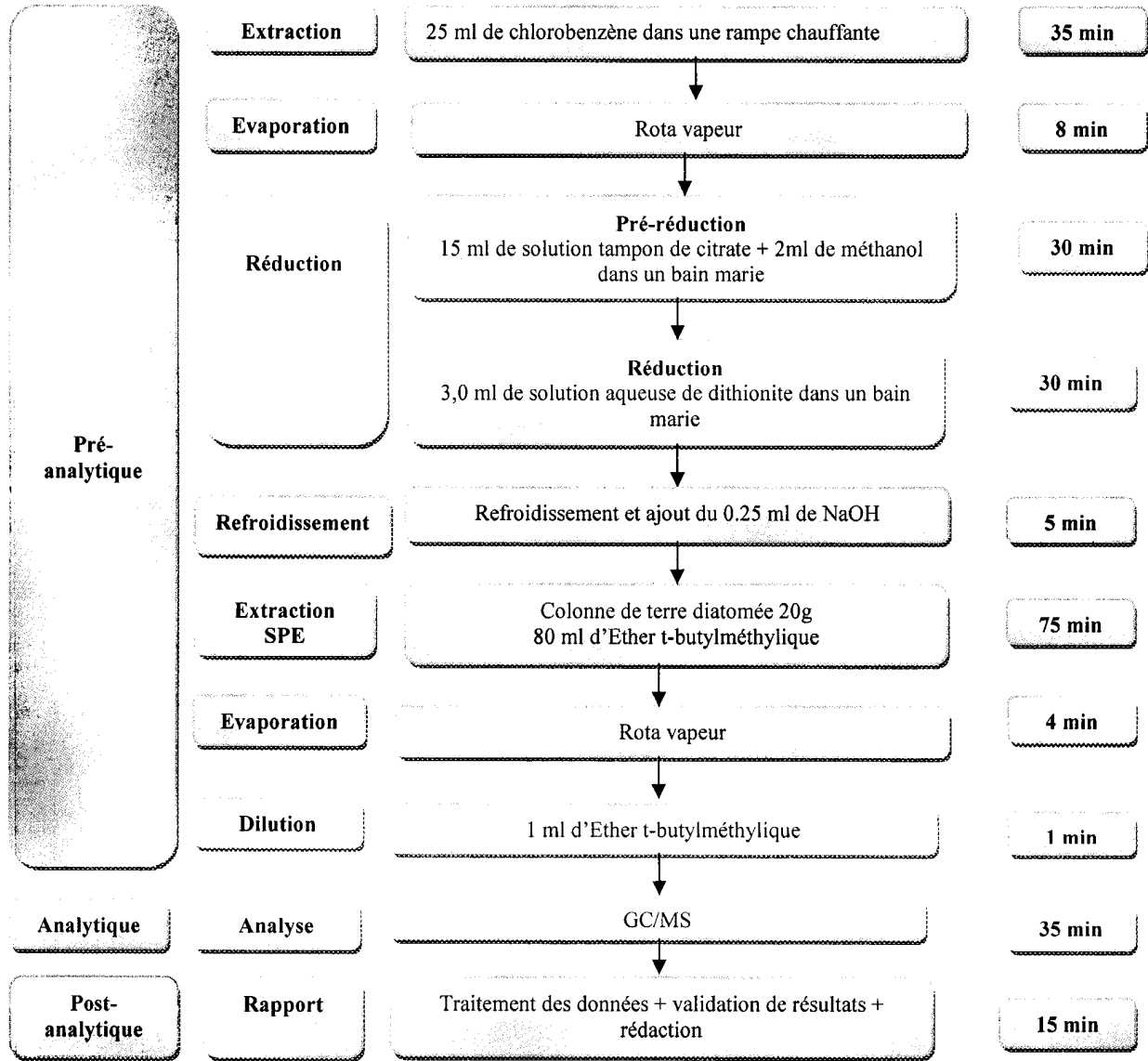


Fig. 2

3/5

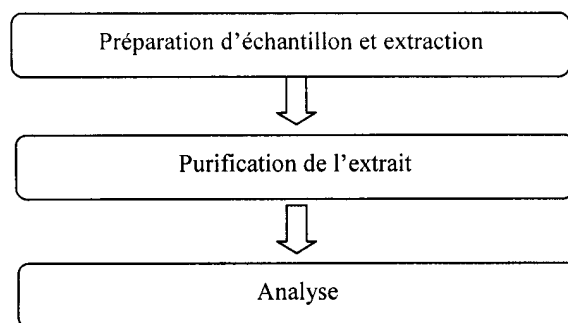


Fig. 3

4/5

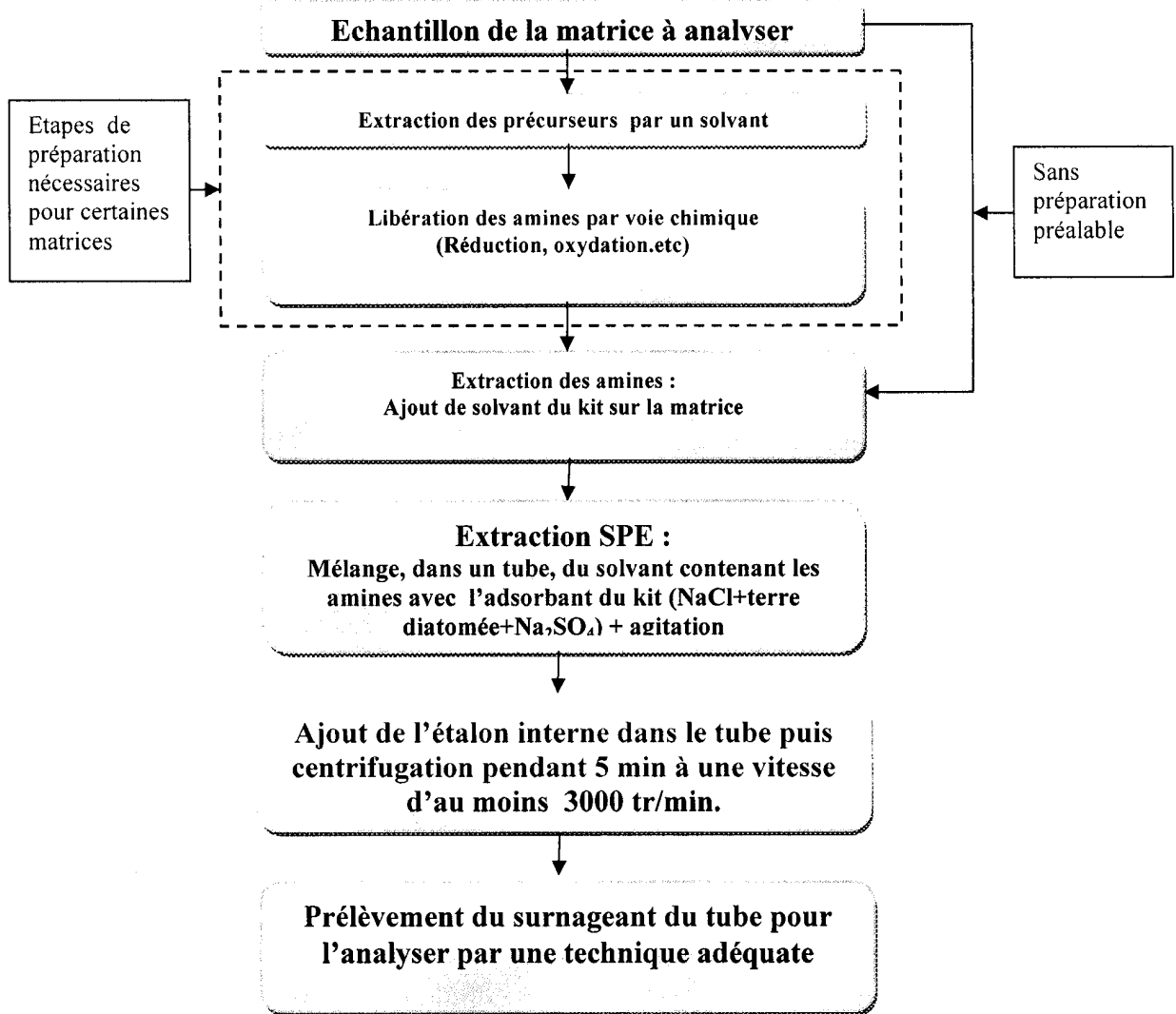


Fig. 4

5/5

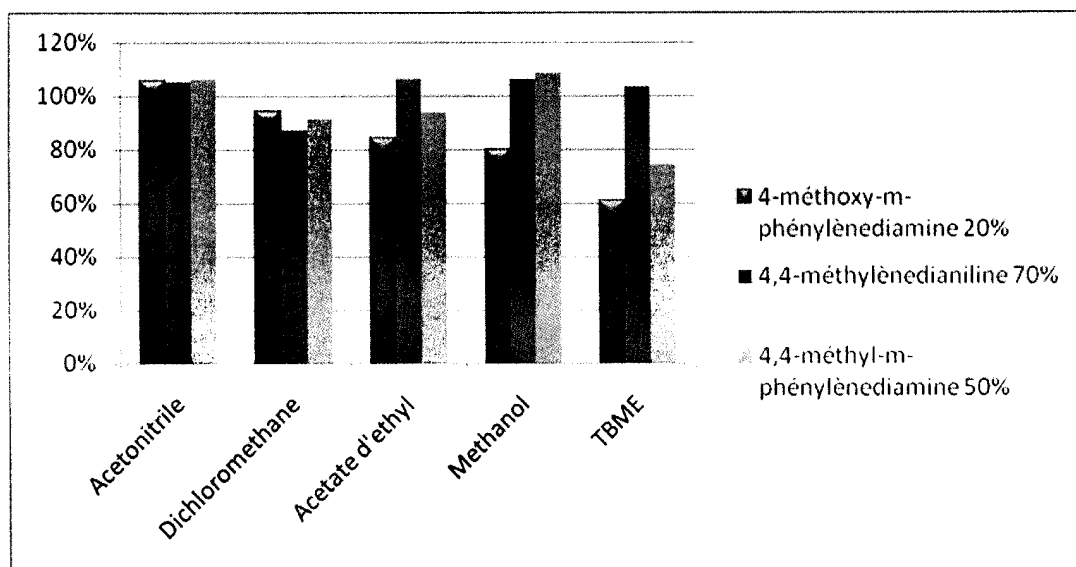


Fig. 5



**RAPPORT DE RECHERCHE  
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**  
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la  
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et  
complétée par la loi 23-13)

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 39649	Date de dépôt : 30/12/2016
Déposant : UNIVERSITE HASSAN II CASABLANCA & ECOLE SUPERIEURE DES INDUSTRIES DU TEXTILE ET DE L'HABILLEMENT (ESITH)	
Intitulé de l'invention : METHODE ET KIT D'EXTRACTION POUR LA DETERMINATION DES TENEURS EN AMINES AROMATIQUES ET ALIPHATIQUES DANS DIFFERENTES MATRICES	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site <a href="http://worldwide.espacenet.com">http://worldwide.espacenet.com</a> , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée <input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: A. BRINI	Date d'établissement du rapport: 28/07/2017
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	





<b>Partie 1 : Considérations générales</b>		
<i>Cadre 1 : base du présent rapport</i>		
Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Description</u> 14 Pages</li> <li>• <u>Revendications</u> 10</li> <li>• <u>Planches de dessin</u> 5 Pages</li> </ul>		
<b>Partie 2 : Rapport de recherche</b>		
<b>Classement de l'objet de la demande :</b>		
CIB : G01N1/28, G01N1/40		
CPC : G01N1/405		
Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :		
EPOQUE, Orbit		
<b>Catégorie*</b>	<b>Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents</b>	<b>N° des revendications visées</b>
A	WO2016204854; AGILENT TECHNOLOGIES INC [US]; 22-12-2016 Document en entier	1-10
A	WO2010120371; RESTEK CORPORATION [US]; 21-10-2010 Document en entier	1-10
A	WO2015028643 ; BIOTAGE AB [SE] ; 05-03-2015 Document en entier	1-10
<b>*Catégories spéciales de documents cités :</b>		
<p>-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>-« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs</p> <p>-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté</p>		

**Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité**

*Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle*

Nouveauté (N)	Revendications 1-10	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-10	Oui
	Revendications aucune	Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-10	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1: WO2016204854

D2: WO2015028643

D3: WO2010120371

**1. Nouveauté (N) :**

Aucun des documents susmentionnés ne divulgue les mêmes caractéristiques techniques telles que décrites dans les revendications 1-10, d'où celles-ci sont nouvelles conformément à l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

**2. Activité inventive (AI) :**

Le document D1 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 divulgue un procédé et un système de préparation d'échantillons analytiques. Dans certains modes de réalisation, le système comprend un récipient comprenant, une composition de traitement d'échantillon analytique comprenant de l' $\alpha$ -cyclodextrine et/ou un co-polymère d' $\alpha$ -cyclodextrine. Dans certains modes de réalisation, le procédé consiste à : mettre en contact un échantillon comprenant un agent interférant avec la matrice et un analyte avec une composition de cyclodextrine afin de produire un complexe matrice-cyclodextrine, ladite composition de cyclodextrine comprenant une  $\alpha$ -cyclodextrine et/ou un co-polymère d' $\alpha$ -cyclodextrine; séparer le complexe de l'échantillon avec lequel il a été mis en contact afin de produire une composition à matrice réduite; et détecter l'analyte dans la composition à matrice réduite. Le document D1 concerne également des kits et des compositions destinés à être utilisés dans ledit système et ledit procédé.

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce que le kit d'analyse comprend une composition différente.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme étant la fourniture d'un kit d'analyse pour la détection et la quantification des amines aromatiques ou aliphatiques selon la méthode QuEChERS.

La solution proposée n'est pas évidente pour la raison suivante :

Aucun document de l'art antérieur ne divulgue ni suggère un kit d'analyse pour la détection des amines aromatiques ou aliphatiques comprenant une composition identique à celle divulguée dans la présente demande.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive conformément à l'article 28 de la

loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications indépendantes 7 et 10 concernent une méthode et une utilisation dudit kit d'analyse et reprennent les mêmes caractéristiques techniques telles que décrites dans la revendication 1. Par suite, Les revendications indépendantes 7 et 10 impliquent une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications dépendantes 2-6 et 8-9 satisfont donc en tant que telles aux exigences concernant l'activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

### **3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.