

Herbicides, fongicides et insecticides Méthode d'analyse dans les biofilms

Généralités

Nom de la famille de substances	Pesticides (herbicides, insecticides et fongicides).																																
Nom des substances individuelles	azoxystrobine (AZS), carbendazime (CBZ), chlorfenvinphos (CFV), chlortoluron (CTU), dimétomorphe (DMM), diuron (DIU) et son métabolite dichlorophenylméthyl urée (DCPMU), fenitrothion (FNT), flumioxazine (FMX), isoproturon (IPU), linuron (LINU), norflurazon (NFZ) et son métabolite norflurazon-desmethyl (NFZD), procymidone (PCM), et tébuconazole (TBZ)																																
Code SANDRE des substances individuelles	<table border="0"> <tr> <td>Azoxystrobine</td> <td>1951</td> <td>Fénitrothion</td> <td>1187</td> </tr> <tr> <td>Carbendazime</td> <td>1129</td> <td>Flumioxazine</td> <td>2023</td> </tr> <tr> <td>Chlorfenvinphos</td> <td>1464</td> <td>Isoproturon</td> <td>1208</td> </tr> <tr> <td>Chlortoluron</td> <td>1136</td> <td>Linuron</td> <td>1209</td> </tr> <tr> <td>Diméthomorphe</td> <td>1403</td> <td>Norflurazon</td> <td>1669</td> </tr> <tr> <td>Diuron</td> <td>1177</td> <td>Procymidone</td> <td>1664</td> </tr> <tr> <td>Norflurazon-desmethyl</td> <td>2737</td> <td>Tébuconazole</td> <td>1694</td> </tr> <tr> <td>3-(3,4-dichlorophenyl)-1-méthyl urée</td> <td>1929</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Azoxystrobine	1951	Fénitrothion	1187	Carbendazime	1129	Flumioxazine	2023	Chlorfenvinphos	1464	Isoproturon	1208	Chlortoluron	1136	Linuron	1209	Diméthomorphe	1403	Norflurazon	1669	Diuron	1177	Procymidone	1664	Norflurazon-desmethyl	2737	Tébuconazole	1694	3-(3,4-dichlorophenyl)-1-méthyl urée	1929		
Azoxystrobine	1951	Fénitrothion	1187																														
Carbendazime	1129	Flumioxazine	2023																														
Chlorfenvinphos	1464	Isoproturon	1208																														
Chlortoluron	1136	Linuron	1209																														
Diméthomorphe	1403	Norflurazon	1669																														
Diuron	1177	Procymidone	1664																														
Norflurazon-desmethyl	2737	Tébuconazole	1694																														
3-(3,4-dichlorophenyl)-1-méthyl urée	1929																																
Matrice analysée [code SANDRE du (des) support(s)]	Biote [8] : végétal																																
Principe de la méthode	<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvement des biofilms sur le support - Congélation et lyophilisation de l'échantillon - Dopage avec un traceur analytique (linuron ou isoproturon D6) - Extraction aux ultrasons - Purification sur cartouche SPE - Reprise dans solvant d'injection et ajout étalon interne d'injection (diuron D6) - Dosage par HPLC/MSMS 																																
Acronyme	Ultrasons/SPE/LC/MS/MS																																
Domaine d'application	<p>Les limites de quantification sont comprises entre 15 et 350 ng/g poids sec, pour une prise d'essai de 50 mg poids sec.</p> <p>Les concentrations maximales testées sont de 2 µg/g poids sec.</p>																																
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	Toute la verrerie doit être maintenue dans un parfait état de propreté. Pour cela, après lavage à la machine, rincer la verrerie à l'acétone pestipur.																																
Interférents (préciser la matrice)	<p>Aucun interférent identifié</p> <p>Matrice testée : biofilm collecté en milieu naturel non contaminé ou développé en laboratoire sur lame de verre.</p>																																

AVERTISSEMENT : Il convient que l'utilisateur de cette méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Cette méthode n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur. Certains des solvants utilisés dans le mode opératoire sont toxiques et dangereux. Les manipuler avec précaution.

Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément à cette méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation adéquate.

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :

Biote : Biofilm

Conditionnement et conservation des échantillons

- Protocole :

Biofilms développés sur supports (cailloux) en milieu naturel : Les cailloux collectés en milieu aqueux sont transférés au laboratoire dans l'eau. Chaque caillou est brossé à l'aide d'une brosse à dents préalablement nettoyée à l'eau savonneuse et soigneusement rincée. De l'eau du milieu non contaminée (site amont d'un bassin versant par exemple) est utilisée pour rincer les cailloux et la brosse. Environ 200 mL d'eau sont nécessaires pour une prise d'essai.

Biofilms développés sur lame de verre au laboratoire : Les lames de verre sont raclées avec une spatule en inox. Les plaques et spatules sont rincées avec un peu d'eau du milieu dans lequel se sont développés les biofilms. En moyenne, une lame de verre de 3 cm² permet de collecter environ 10 mg de biofilm sec.

- Nature du contenant de stockage :

Les biofilms collectés et l'eau sont regroupés dans un ou plusieurs flacons en verre brun col large de 100 mL, bouchés par un film plastique inerte ou du papier aluminium.

- Lavage du contenant :

Rinçage à l'acétone « pour analyse de résidus ».

- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :

Biofilms prélevés en milieu naturel : 24h au réfrigérateur dans l'eau du milieu.
Biofilms développés au laboratoire sur lame de verre : traités immédiatement après prélèvement.

Pré-traitement des échantillons liquide ou solide

L'échantillon est congelé à environ -18°C pendant au moins 24h, de manière à assurer une parfaite congélation, puis lyophilisé pendant au moins 24h.

Ajout du traceur analytique : Une prise d'essai connue de biofilm lyophilisé (100 mg en général) est prélevée dans un tube en verre BOREX® 16*100 mm. 100 µL d'une solution de linuron ou de IPU D6 (traceur analytique) à 0.5 mg/L dans l'eau milliQ est ajouté au biofilm, pour obtenir une concentration de dopage de 0,5 µg/g poids sec pour une prise d'essai de 100mg de biofilms sec. L'ensemble est laissé en contact à l'air libre pendant une heure.

Analyse

Volume ou masse de la prise d'essai (mL or mg selon la phase analysée)

Biote : végétal 30 à 100 mg poids sec

Extraction

Extraction aux ultrasons :

10 mL d'un mélange acétone/dichlorométhane (20/80, V/V) sont ajoutés dans le tube contenant les biofilms. Une première extraction au bain à ultrasons est réalisée pendant 30 min. Le surnageant est collecté à l'aide d'une pipette pasteur verre, filtré sur un tampon de laine de verre qualité longue préalablement rincé à l'acétone pestipur® et retenu dans un petit entonnoir, puis récupéré dans un ballon en verre à col rodé de 250 mL.

L'extraction des biofilms est renouvelée une deuxième fois dans les mêmes conditions et les extraits sont regroupés dans le même ballon. Suite à la 2^{nde} extraction, le tube contenant les biofilms, ainsi que la pipette pasteur sont rincés avec quelques mL de mélange acétone/dichlorométhane transvasés dans le ballon.

Le solvant contenu dans chaque ballon est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif (température du bain marie = 40°C). L'extrait est repris dans 6 mL d'eau ultrapure, puis passé au vortex et aux ultrasons pendant 2 min pour assurer la redissolution des composés. L'extrait est collecté à l'aide d'une pipette pasteur verre dans une seringue de 10 mL munie d'un filtre en polyester de porosité 0,20 µm et transféré dans un tube verre BOREX® 16*100 mm.

Purification

(type de purification, paramètres de purification, méthode de concentration)

Purification par SPE :

Sur cartouches Oasis® HLB, 60 mg, 3 mL.

Conditionnement : 3 mL d'acétonitrile puis 3 mL de méthanol et enfin 3 mL d'eau ultrapure.

5 mL de l'échantillon sont prélevés à 1 mL/min.

Rinçage : 10 mL d'eau ultra pure

Séchage de la cartouche : la placer sur un support manuel relié à une pompe à vide. Sécher pendant 10 min.

Elution : 3 mL d'acétonitrile à 1 mL/min.

Evaporation sous azote de l'extrait. Reprise dans 240 µL d'un mélange eau/acétonitrile (80/20, V/V). Ajout de 10 µL de solution de diuron D6 dans l'acétone à 25 µg/L. Le tube est vortexé pendant 1 min puis passé au bain à ultrasons pendant 5 min.

Conservation de l'extrait

Si le dosage peut être réalisé dans les 48h, l'extrait est stocké au réfrigérateur avec la gamme étalon correspondante.

Sinon l'ensemble est conservé au congélateur jusqu'à analyse.

Volume ou masse finale avant analyse :

250 µL

Méthode analytique utilisée :

- Volume d'injection : 10 µL
- Température du four : (30 ± 5)°C
- Débit de la phase mobile : 0,3 mL/min
- Colonne Purospher® STAR RP-18 5 µm endcapped (Merck) 250*2 mm
- Phase mobile : Eau 0,1% acide formique (A) et acétonitrile 0,1% acide formique (B)

- Gradient de phase mobile :

Temps (min)	Composition (%)
0 - 6	85(A)/15(B) → 62(A)/38(B)
6 - 20	62(A)/38(B)
20 - 21	62(A)/38(B) → 55(A)/45(B)
21 - 25	55(A)/45(B) → 30(A)/70(B)
25 - 32	30(A)/70(B)
32 - 38	30(A)/70(B) → 85(A)/15(B)
38 - 50	85(A)/15(B)

- Paramètres de la MS/MS pour la détection, la quantification et la confirmation des composés.

Composés	Transitions quantifiantes (u.m.a.)	Transitions qualifiantes (u.m.a.)
AZS	404/372	404/344
CBZ	192/160	192/132
CFV	359/155	359/99
CTU	213/72	213/140
DMM	388/301	388/165
DIU	233/72	233/46
DIU D6*	239/78	239/52
DCPMU	219/162	219/127
FNT	278/125	278/109
FMX	355/327	355/77
IPU	207/72	207/165
LINU	249/160	249/182
LINU D6**	255/160	255/185
NFZ	304/284	304/88
NFZD	290/270	290/145
PCM	284/256	-
TBZ	308/70	308/125

Equipements¹ (modèles utilisés) :

Chromatographie liquide haute performance Agilent 1100®.
Spectromètre de masse Applied Biosystem API 4000® (triple quadrupole linéaire).

Type d'étalonnage

Interne

Modèle utilisé

Linéaire

Etalons / Traceurs utilisés Domaine de concentration

Traceur d'injection : diuron D6 à 1 µg/L

Les concentrations de la gamme d'étalonnage peuvent s'étendre de 0,2 à 200 µg/L (AZS), 0,4 à 400 µg/L (CBZ, DMM et PCM), de 5 à 200 µg/L (DIU, DCPMU et TBZ) ou de 10 à 400 µg/L (DCA et LINU) suivant la sensibilité des composés

¹ Les matériels cités ici constituent des exemples d'application satisfaisante. Ces mentions ne constituent pas une recommandation exclusive, ni un engagement quelconque de la part du rédacteur ou d'AQUAREF

(solvant : phase mobile à 85(A)/15(B).)

Méthode de calcul des résultats

Rendement

Utilisation du rendement : correction avec le rendement obtenu pour le traceur analytique dans l'échantillon et avec le rendement obtenu lors de la validation de la méthode.

Blancs

Des blancs réactifs sont analysés : Cet essai consiste à effectuer tout le protocole analytique sans échantillon de biofilm. Il est essentiel pour vérifier la pureté des solvants, des réactifs et la propreté du matériel et de toute la verrerie utilisée. Il est réalisé au minimum lors de la validation de la méthode, puis contrôlé régulièrement.

Soustraction du blanc : Oui si contamination >LQ

Références de la méthode

La méthode est dérivée de la publication suivante

En cours de rédaction.

Norme dont est tirée la méthode

S/O

Niveau de validation selon Norman

Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée

NFT90-210 (2009)

Domaine de validation

De LQ à 2 µg/g poids sec

Matériaux de référence utilisés

S/O

Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)

Des blancs solvants (85(A)/15(B)) sont injectés en début de série d'analyse pour s'assurer de la stabilité de la ligne de base et de la propreté du système, puis régulièrement au cours de l'analyse.

Rendement

Les rendements moyens obtenus après extraction d'une matrice biofilm dopée à 3 niveaux de concentrations (LQ, 20 et 80% du domaine, n=10 pour chacun) sont compris entre 36 et 122 % (CV < 17%). Les rendements les plus faibles (< 50 %) sont obtenus pour le FNT.

- par molécule

Analyte	20% du niveau haut de la gamme		80% du niveau haut de la gamme	
	Rendement (%)	CV (%)	Rendement (%)	CV (%)
AZS	100	11	89	5
CBZ	52	8	54	7
CFV	83	7	62	6
CTU	54	12	77	5
DCPMU	85	6	75	4
DIU	115	6	123	4
DMM	79	6	77	3
FMX	63	6	71	6
FNT	41	13	48	10
IPU	98	7	77	4
LINU	84	13	69	4
NFZ	120	7	122	6
NFZD	117	8	88	4
PCM	55	10	53	5
TBZ	57	13	56	6
LINU-D6*	3	8	76	3

**Limite de quantification(LQ)
Limite de détection (LD)**

Analyte	niveau bas (LQ)		
	LQ (ng/g), poids sec = 50mg	Rendement (%)	CV (%)
AZS	15	71	16
CBZ	70	64	9
CFV	90	80	8
CTU	85	59	8
DCPMU	50	71	6
DIU	65	96	8
DMM	70	62	9
FMX	170	64	13
FNT	355	36	14
IPU	65	82	5
LINU	70	69	7
NFZ	35	95	9
NFZD	40	95	5
PCM	165	55	5
TBZ	35	56	17

Incertitudes (%) sur les résultats

Incertitudes élargies (k=2) déterminées expérimentalement dans des biofilms à 3 niveaux de concentration (LQ, 20% et 80% du domaine)

- par niveau de concentration et par molécule

analyte	incertitude à la LQ (%)	incertitude à 20% (%)	incertitude à 80% (%)
AZS	35	20	10
CBZ	20	15	15
CFV	15	15	15
CTU	15	25	10
DCPMU	10	10	10
DIU	15	10	10
DMM	20	10	10
FMX	25	10	10
FNT	30	25	20
IPU	10	15	10
LINU	15	30	10
NFZ	15	15	15
NFZD	10	20	10
PCM	10	20	10
TBZ	35	30	15

Contacts

Auteurs

Christelle Margoum

Institut

Irstea (Cemagref) Lyon

Contact

christelle.margoum@irstea.fr