



Méthodes

Dosage des résidus de néonicotinoïdes dans les abeilles par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

A.-C. Martel (anne-claire.martel@anses.fr), C. Lair

Anses, Laboratoire de Sophia-Antipolis (France)

A.-C. Martel, C. Lair (2012). Dosage des résidus de néonicotinoïdes dans les abeilles par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), EuroReference, N° 6, ER06-12M01.

<http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PN8001.htm>



La méthode de détermination des résidus de néonicotinoïdes dans les abeilles a été mise au point et validée en 2008 par le Laboratoire de Sophia-Antipolis (Laboratoire national de référence associé (LNR) sur les pesticides dans les denrées alimentaires d'origine animale et produits à forte teneur en matière grasse et LNR associé pour les résidus de pesticides selon les méthodes monorésidus). Le laboratoire dispose ainsi d'une méthode très sensible et rapide pour la recherche d'une éventuelle implication de ces insecticides dans les cas d'affaiblissements et de pertes de colonies d'abeilles.

Principe de la méthode

Les pesticides recherchés (thiaméthoxam, clothianidine, acétamipride, thiaclopride et imidaclopride) sont des substances chimiques utilisées en agriculture et font partie de la famille des néonicotinoïdes (Figure 1). L'enrobage des semences à l'aide de pesticides de contact ou systémiques est employé en agriculture pour lutter contre les ravageurs du sol et pour protéger les plantules et les plantes contre les parasites. D'autres pesticides sont appliqués sur les cultures par pulvérisation foliaire. Des résidus de néonicotinoïdes peuvent se retrouver dans les différents compartiments de l'environnement. Par conséquent, les abeilles, bio-marqueurs de l'environnement, peuvent entrer en contact avec ces résidus (Rapport Afssa, 2008).

La méthode de dosage de ces cinq insecticides toxiques pour l'abeille (Tableau 1) repose sur une extraction avec l'acétonitrile et une séparation liquide/liquide avec l'hexane suivie d'une purification en phase solide sur cartouche Florisil®. L'extrait obtenu après évaporation est récupéré avec de l'eau ultrapure afin d'être injecté et analysé en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-ESI-MS/MS). Cette méthode d'analyse multirésidus permet d'identifier et de quantifier les résidus de néonicotinoïdes dans la matrice « abeilles ». La limite de quantification (LQ) est de 0,05 ng/abeille pour tous les pesticides sauf pour l'acétamipride dont la LQ est de 0,1 ng/abeille.

Appareillage et réactifs

L'appareillage spécifique consiste, en, (1) un homogénéiseur type Ultra-Turrax® T25 (IKA) pour le broyage des abeilles; (2) une station d'évaporation sous flux gazeux type TurboVap II (Caliper LifeSciences) pour concentrer les extraits; (3) un chromatographe en phase liquide avec injecteur automatique et boucle d'injection de 20 µl (Surveyor HPLC System, ThermoFinnigan) couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle équipé d'une source ESI (TSQ Quantum, ThermoFinnigan).

Tous les solvants utilisés (acétone, hexane, éther de pétrole et dichlorométhane) sont de qualité « pour analyse de traces ».

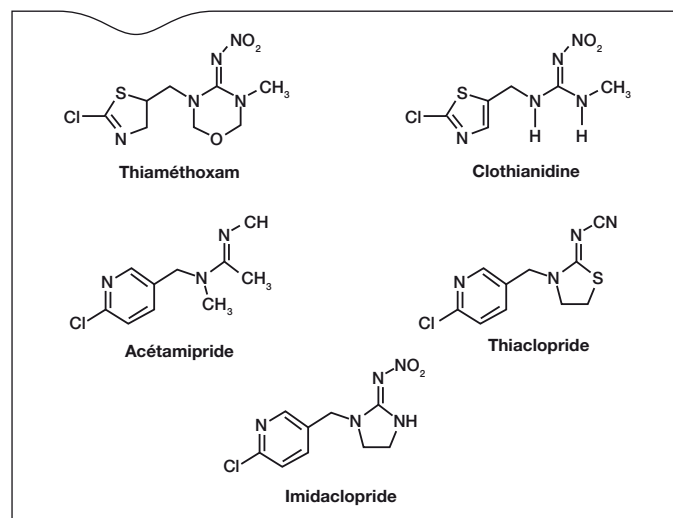


Figure 1. Structures chimiques des pesticides étudiés

Tableau 1. Toxicité des pesticides étudiés vis-à-vis des abeilles (Agritox, 2011)

Pesticide	DL ₅₀ (contact)	DL ₅₀ (orale)
Thiaméthoxam (N° CAS: 153719-23-4)	24 ng/abeille	5 ng/abeille
Clothianidine (N° CAS: 210880-92-5)	44,26 ng/abeille	3,79 ng/abeille
Acétamipride (N° CAS: 135410-20-7)	8,09 µg/abeille	14,53 µg/abeille
Thiaclopride (N° CAS: 111988-49-9)	38,82 µg/abeille	17,32 µg/abeille
Imidaclopride (N° CAS: 138261-41-3)	81 ng/abeille	3,7 ng/abeille



Méthodes

Pour l'analyse en LC-ESI-MS/MS, le méthanol de qualité LC-MS et l'acide formique (98 %) sont utilisés. Les étalons sont préparés à partir des matières actives certifiées commandées chez CIL Cluzeau Info Labo : thiaméthoxam (99 % de pureté), clothianidine (99,5 %), acétamipride (99 %), thiaclopride (99,5 %) et imidaclopride (98 %). La solution certifiée de diméthoate-D6 (99,8 % de pureté, 100 mg/l dans l'acétone) provient également de CIL Cluzeau Info Labo.

Mode opératoire

Extraction

L'échantillon d'abeilles (2 g, soit 20 insectes) est pesé dans un tube à centrifuger de 50 ml et 100 µl de l'étalon interne d'extraction (diméthoate-D6) sont ajoutés dans l'échantillon d'abeilles. L'échantillon d'abeilles est ensuite homogénéisé avec 30 ml d'acétonitrile à l'aide d'un Ultra-Turrax®. L'extrait est filtré sur Büchner. L'échantillon est ré-extrait avec 30 ml d'acétonitrile et filtré. L'extrait final est transféré dans une ampoule à décanter de 500 ml. La séparation liquide/liquide est réalisée en ajoutant 50 ml d'hexane dans l'ampoule à décanter. Après agitation, deux phases sont obtenues : la phase inférieure (acétonitrile) est récupérée dans la fiole à vide et la phase supérieure (hexane) est éliminée. La séparation liquide/liquide est renouvelée sur la phase inférieure en ajoutant à nouveau 50 ml d'hexane. Après agitation, la phase acétonitrile est récupérée dans un tube Zymark (200 ml) et évaporée à sec à 40 °C, sous flux d'air, à l'aide de la station d'évaporation (TurboVap II). L'extrait est repris par 2 ml de dichlorométhane pour la purification.

Purification

La cartouche de Florisil® (1 g, 6 ml, Phenomenex) est conditionnée avec 10 ml de dichlorométhane. L'échantillon est ensuite déposé puis un lavage avec 20 ml d'un mélange éther de pétrole/dichlorométhane 80:20 (v/v) est appliqué. L'élution des pesticides est réalisée avec 20 ml d'un mélange acétonitrile/dichlorométhane 95:5 (v/v). L'éluat est transféré dans un tube Zymark et évaporé jusqu'à 0,2 ml à 40 °C, sous flux d'air, à l'aide du TurboVap II. Le volume de l'extrait final est ajusté à 1 ml avec de l'eau ultra-pure. Après agitation au vortex, l'extrait est filtré sur un filtre Millex (PVDF, 0,45 µm, Millipore) puis injecté en LC-ESI-MS/MS.

Dosage

Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La séparation chromatographique est réalisée sur colonne chromatographique Pursuit PFP, 100 x 3 mm (3 µm) (Varian). La phase mobile est composée d'eau ultra-pure (A) et de méthanol (B), chaque solution étant acidifiée avec 0,02 % d'acide formique. Les insecticides sont séparés à l'aide d'un gradient d'élution dont le programme est le suivant : gradient linéaire de 80 % A (à t=0 min) à 0 % (à t=13 min), puis gradient linéaire de 0 % A (à t=13 min) à 80 % (à t=16 min) et palier à 80 % A pendant 9 min. La colonne et le passeur d'échantillons sont thermostatés à 25 °C, le débit est de 0,4 ml/min et le volume d'injection est de 20 µl.

Spectrométrie de masse

La source d'ionisation utilisée est l'électrospray en mode positif (ESI +). La vanne de dérivation (divert valve) est réglée pour permettre l'admission de la phase mobile dans la source entre 4,50 min et 12 min. L'analyseur de masse est un triple quadripôle

et le gaz de collision est l'argon. Le mode d'acquisition mis en œuvre est le mode SRM (Selected Reaction Monitoring). Les transitions ainsi que les temps de rétention sont présentés dans le Tableau 2 et les chromatogrammes obtenus en Figure 2.

Résultats et conclusion

L'étalonnage est réalisé au moyen d'une gamme extraite dans la matrice « abeilles » (échantillons témoin et supplémentés). Le domaine de linéarité est défini comme étant le domaine d'étalonnage et a été validé jusqu'à 20 µg/l pour chaque pesticide et jusqu'à 40 µg/l pour l'acétamipride.

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont respectivement de 0,015 ng/abeille (0,15 µg/kg) et 0,05 ng/abeille (0,5 µg/kg) pour le thiaméthoxam, la clothianidine, le thiaclopride et l'imidaclopride. Les LD et LQ sont respectivement de 0,03 ng/abeille (0,3 µg/kg) et 0,1 ng/abeille (1 µg/kg) pour l'acétamipride.

En l'absence de matériau de référence, le taux de récupération a été déterminé à l'aide d'un échantillon d'abeilles (blanc matrice) supplémenté avec les analytes à doser à deux niveaux de concentration (LQ et 5LQ). Pour chaque niveau de concentration, cinq échantillons d'abeilles ont été extraits et analysés. Deux autres séries de cinq échantillons ont également été réalisées. Les taux d'extraction moyens obtenus sont satisfaisants au regard des exigences réglementaires (Document SANCO, 2010) car, à la LQ, ils sont compris entre 93,3 % et 102,7 %, et entre 94,7 % et 104,0 % pour les échantillons supplémentés à 5LQ (Martel, 2011). La méthode est répétable et reproductible car les coefficients de variation (CV) sont ≤ 20 % pour chaque niveau de concentration.

Une série d'analyses supplémentaires a été réalisée pour déterminer la valeur du taux de récupération « réel », valeur indépendante de la matrice. Ce test a été réalisé à 3 niveaux de concentration (LQ, 2LQ et 5LQ) en comparant la surface du pic de l'analyte et celle de l'étalon interne obtenues dans une série (série 1 correspondant à une supplémentation avant extraction) par rapport à celles obtenues dans une autre série (série 2 correspondant à une supplémentation après extraction des échantillons). Les rendements ont été déterminés par comparaison des rapports obtenus dans les séries 1 et 2 (Matuszewski, 2003). Les rendements d'extraction obtenus sont compris entre 70 et 120 %.

Cette méthode permet donc de quantifier des résidus à des niveaux inférieurs aux DL50 de chaque pesticide pour l'abeille. Elle peut ainsi être appliquée sur des échantillons d'abeilles prélevés lors des problèmes de pollution environnementale, d'affaiblissements et de mortalités de colonies.



Méthodes

Tableau 2: Transitions des pesticides étudiés et temps de rétention associés (à titre indicatif)

Pesticide	Temps de rétention (min)	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Énergie de collision (V)
Thiaméthoxam	6,39	291,9	210,9 180,9	20 31
Imidaclopride	8,16	256,2	208,9 175,0	22 23
Diméthoate-D6	8,39	236,0	177,1 131,0	17 32
Clothianidine	8,47	250,0	169,0 131,9	18 19
Acétamipride	9,38	222,9	125,9 99,1	28 43
Thiaclopride	10,57	252,9	126,0 90,1	28 44

Paramètres de la source d'ionisation et de l'analyseur de masse : électrospray en mode positif (ESI +); température du capillaire = 350 °C; sheath gas (azote) = 40; auxiliary gas (azote) = 20; spray voltage = 4000 V; pression gaz de collision (argon) = 1mTorr.

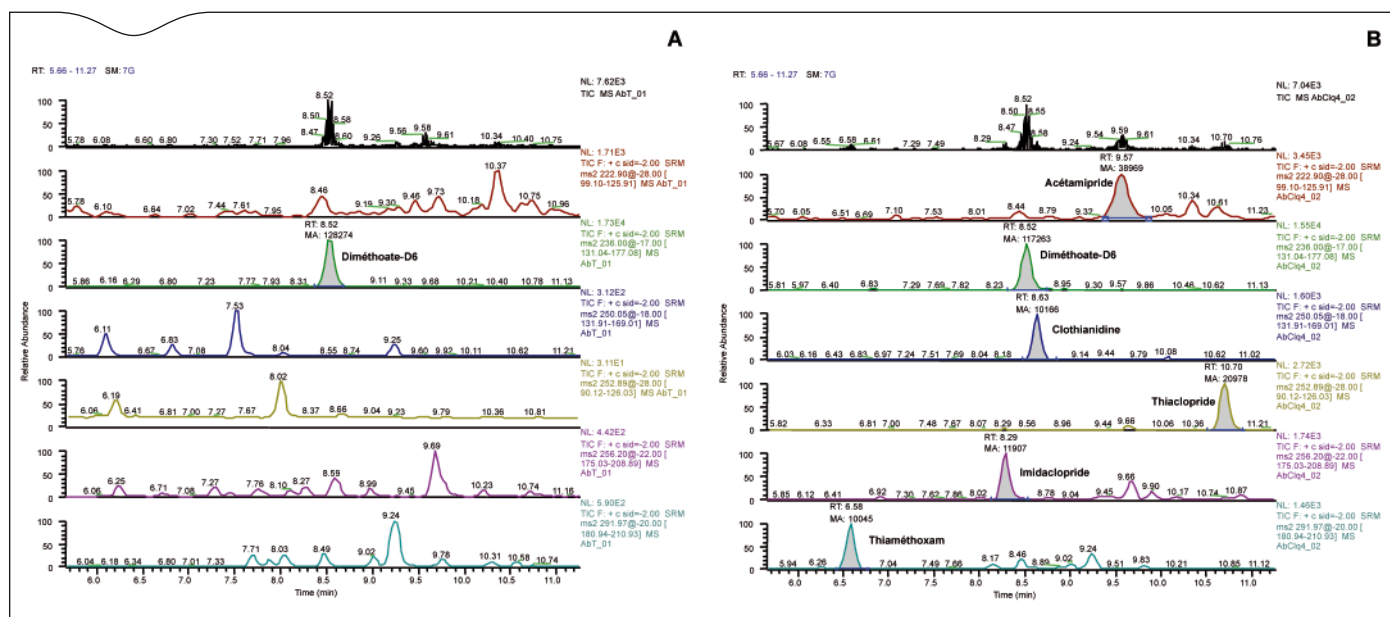


Figure 2. Chromatogrammes (courant ionique total et ions extraits) obtenus en LC-MS/MS pour (A) l'échantillon d'abeilles témoin et pour (B) l'échantillon d'abeilles supplémenté avec les pesticides à la LQ

Références bibliographiques

Afssa. 2008. Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles. Rapport, France: 218 p. [consulté le 13 mai 2011]. <http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/094000076/0000.pdf>

AGRITOX, 2011, Base de données sur les substances actives phyto-pharmaceutiques. [consulté le 13 mai 2011] <http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php>

European Commission. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document N° SANCO/10684/2009 (01/01/2010). [consulté le 13 mai 2011] http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf

Martel A.C., Lair C. 2011. Validation of a highly sensitive method for the determination of neonicotinoid insecticides residues in honeybees by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 91 (10): 978-988.

Matuszewski B.K, Constanzer M.L, Chavez-Eng C.M. 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry, 75: 3019-3030.