

DIRECTIVES SUR L'UTILISATION DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE (SM) POUR L'IDENTIFICATION, LA CONFIRMATION ET LE DOSAGE DES RÉSIDUS

CAC/GL 56 - 2005

TESTS DE CONFIRMATION

Lorsque les analyses sont effectuées à des fins de contrôle ou de réglementation, il est particulièrement important que des données confirmatoires soient générées avant de signaler des échantillons contenant des résidus de pesticides qui ne sont pas normalement associés avec ces produits ou lorsque les LMR semblent avoir été dépassées. Les échantillons peuvent contenir des produits chimiques interférents pouvant être identifiés à tort comme des pesticides. En chromatographie gazeuse, les exemples incluent les réactions des détecteurs à capture d'électrons aux esters de phtalate et des détecteurs sélectifs de phosphore aux composés contenant du soufre et de l'azote.

Les analyses de résidus de pesticides effectuées au moyen de méthodes multirésidus consistent en général en deux phases: dépistage et confirmation. Ce procédé est décrit schématiquement à la figure 2. La première phase consiste à établir la présence des résidus de pesticides probables à partir de l'interprétation des données brutes, en évitant autant que possible les faux négatifs. La seconde phase est la confirmation, qui se concentre sur les pesticides détectés dans la première phase. L'utilisation des résultats à signaler et les décisions de gestion qui en découlent détermineront son importance et les efforts à y consacrer au cours du processus de confirmation. La technique utilisée pour la confirmation sera choisie en fonction de sa disponibilité, de son coût et du temps dont on dispose. Il s'agira soit d'interpréter de manière plus poussée les données chromatographiques et spectrométriques de masse, soit de recourir à des méthodes utilisant différentes propriétés physico-chimiques du composé, ou de combiner différentes méthodes de séparation et de détection. D'autres procédures de confirmation figurent au tableau 6.

Lorsque des techniques chromatographiques sont utilisées pour le dépistage ou la confirmation, il est essentiel de fixer correctement les intervalles de temps de rétention. Il importe de veiller à ce que l'instrument soit ajusté correctement avant de commencer l'analyse et de tester la validité du système avant chaque lot d'analyse¹. La base de données sur les temps de rétention doit être adaptée aux circonstances². Dans la phase 1, des intervalles de tolérance de 1,5 à 3 pour cent du temps de rétention absolu peuvent être appliqués pour la chromatographie sur colonne capillaire en fonction de la forme du pic. Pour la confirmation du temps de rétention, les intervalles de tolérance absolus augmentent avec le temps de rétention. L'intervalle de tolérance devrait être inférieur à 1 s pour un TR inférieur à 500 s. Pour des temps de rétention situés entre 500 et 5 000 s, un intervalle de 0,2 pour cent du TR est recommandé. Pour des temps de rétentions supérieurs, un intervalle de 6 s est approprié.

Les tests de confirmation peuvent être quantitatifs et/ou qualitatifs mais, dans la plupart des cas, les deux types d'informations sont exigés. Des problèmes particuliers surviennent quand des résidus doivent être confirmés au seuil de détermination ou à proximité; toutefois, bien qu'il soit difficile de quantifier les résidus à ce niveau, il est essentiel de fournir une confirmation adéquate tant du niveau que de l'identité du résidu.

L'utilité des tests de confirmation peut dépendre du type d'échantillons et des faits antérieurs connus. Certains résidus sont associés à des cultures ou produits spécifiques. Pour une série d'échantillons d'origine similaire contenant des résidus du même pesticide, il peut suffire de confirmer l'identité des résidus sur une petite portion des échantillons choisis au hasard. De même, lorsque l'on sait qu'un pesticide déterminé a été appliqué au produit échantillonné, la confirmation de l'identité du résidu peut être superflue, même s'il vaut mieux confirmer quelques résultats choisis au hasard. Si l'on dispose d'échantillons à blanc, on s'en servira pour déceler la présence éventuelle d'interférents.

¹ Soboleva E. Ambrus A., Application of system suitability test for quality assurance and performance optimization of a gas chromatographic system for pesticide residue analysis, J. Chromatogr. A. 1027. 2004. 55-65. (Application d'un système de test approprié pour la garantie de qualité et l'optimisation des systèmes chromatographiques gazeux pour l'analyse des résidus de pesticides).

² Lantos J., Kadenczki L., Zakar F., Ambrus A. Validation of gas chromatographic Databases for qualitative identification of active ingredients of pesticide residues in Fajgelj A. Ambrus A. (eds) Principles of Method Validation, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000, pp 128-137. (Validation de la base de données chromatographique pour identification des ingrédients actifs de résidus de pesticides).

L'analyste doit décider de la marche à suivre pour identifier un résidu de façon certaine; il aura tout intérêt à choisir une méthode sur laquelle les interférents auront peu d'effet. Dans le choix de la (des) technique(s), il faudra tenir compte du matériel et de l'expertise dont dispose le laboratoire.

CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE / SPECTROMETRIE DE MASSE (CG/SM)

Les données sur les résidus obtenues à l'aide de la spectrométrie de masse peuvent être déterminantes et, si l'on dispose du matériel approprié, cette technique de confirmation est préférable à toute autre. Cette technique est également communément utilisée pour le dépistage des résidus (phase 1). La spectrométrie de masse pour la détermination des résidus est généralement appliquée conjointement avec une technique de séparation chromatographique pour obtenir simultanément des données sur le temps de rétention, le rapport masse/charge des ions et l'abondance. La transmission quantitative d'analytes labiles dans le système chromatographique pose des problèmes similaires à ceux rencontrés avec d'autres détecteurs. Pour la quantification, les ions surveillés devraient être ceux qui sont les plus spécifiques à l'analyte, et les moins sujets à des perturbations tout en offrant un bon rapport signal-bruit.

Lorsque l'on utilise la surveillance d'ions déterminés (SID), les intervalles de tolérance pour les proportions d'ions et les temps de rétention fondés sur l'injection de pesticide étalon dans un solvant pur à une concentration proche du niveau critique doivent avoir été établis à ce stade. Les intervalles de tolérance pour les proportions d'ions doivent être de +/- 30 pour cent de la proportion ionique absolue. Lorsque 2 (ou 3) proportions d'ions déterminés se situent dans les intervalles de tolérance établis, le résidu est confirmé³. Pour un petit nombre de pesticides, le spectre de masse peut ne montrer qu'un ion spécifique. Dans ce cas, il faut rechercher une autre confirmation.

Lorsque les ions détectés continuent d'indiquer la présence éventuelle d'un résidu, le résultat peut être signalé comme provisoirement identifié. Cependant, si le résultat doit conduire à une action réglementaire, ou si le résultat doit être utilisé dans un but différent, (par exemple, estimation de l'apport alimentaire), il faut rechercher une autre confirmation de l'identité de l'analyte. Ceci peut se faire avec le même équipement CG/SM, en injectant des étalons correspondant à la matrice de l'analyte supposé afin de compenser l'influence de la matrice sur la proportion d'ions. Dans ce cas, il faut faire des injections répétées de l'étalon correspondant à la matrice et de l'échantillon suspect. L'écart entre le TRT de l'analyte dans l'étalon et le pic présumé dans l'échantillon doit normalement être inférieur à 0,1 pour cent. Deux proportions d'ions mesurées dans un même échantillon devraient se situer dans l'intervalle de tolérance calculé sur la base des proportions d'ions dans l'étalon correspondant à la matrice. Le résidu est considéré comme confirmé s'il est conforme à la règle générale énoncée ci-dessus. Si les proportions d'ions ne se situent pas au sein des intervalles de tolérance, une confirmation supplémentaire de l'identité peut être obtenue en utilisant d'autres techniques d'analyse dont des exemples sont cités dans le tableau 6.

Une autre confirmation par spectrométrie de masse peut être réalisée en obtenant « le spectre de masse complet moyennant ionisation par impact électronique » (dans la pratique généralement de m/z 50 à un niveau dépassant la région des ions moléculaires). L'absence d'ions perturbateurs joue un rôle important pour confirmer l'identité. On aura une confirmation supplémentaire de l'identité i) en utilisant une autre colonne chromatographique; ii) en utilisant une autre technique d'ionisation (par exemple, ionisation chimique); iii) en surveillant d'autres produits de réaction d'ions déterminés par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM ou SMⁿ); ou iv) en surveillant certains ions à une résolution de masse accrue.

Les déterminations par spectrométrie de masse devraient satisfaire aux critères de contrôle de la qualité de l'analyse appliqués aux autres systèmes.

CLHP ET CLHP-SM

La confirmation des résidus détectés après séparation par CLHP pose généralement plus de problèmes que la chromatographie gazeuse. Si la détection se fait par absorption de rayons UV, la production d'un spectre complet peut fournir une bonne preuve de l'identité. Toutefois, les spectres UV de certains pesticides ne sont pas très utiles pour le diagnostic, étant semblables à ceux produits par de nombreux autres composés possédant des groupes ou structures fonctionnels semblables, et la coélution de composés perturbateurs peut

³ Soboleva E. Ahad K. Ambrus A. Applicability of some MS criteria for the confirmation of pesticide residues (Applicabilité de certains critères SM à la confirmation des résidus de pesticide), *Analyst*, 129, 1123-1129, 2004.

créer des problèmes supplémentaires. Les données obtenues par absorption d'UV à des longueurs d'ondes multiples peuvent appuyer ou réfuter l'identification, mais en général elles ne sont en soi pas suffisamment caractéristiques. Les données obtenues par fluorescence peuvent être utilisées pour appuyer celles obtenues par l'absorption de rayons UV. La CL-SM peut fournir de bonnes preuves, mais du fait que les spectres produits sont généralement très simples et ne montrent que peu de fragmentation caractéristique, les résultats obtenus avec cette technique n'ont guère de chances d'être définitifs. La technique CL-SM/SM est plus efficace, associant sélectivité et spécificité, qui fournit souvent de bonnes preuves de l'identité d'un pesticide. Les techniques CL-SM tendent à être sujettes aux effets de matrices, en particulier la suppression, et dès lors la confirmation de la quantité peut donc exiger le recours à l'addition d'étalons ou à des étalons isotopiquement marqués. La production de dérivés peut aussi être utilisée pour la confirmation de résidus détectés par la CLHR (tableau 6).

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE (CCM)

Dans certains cas, l'analyse chromatographique en couche mince (CCM) est le moyen le plus commode pour confirmer les résultats de la chromatographie gazeuse. L'identification repose sur deux critères, la valeur Rf et la réaction de visualisation. Les méthodes de détection fondées sur les titrages biologiques (par exemple, enzymes, moisissures, inhibition des chloroplastes) sont particulièrement adaptées à la confirmation qualitative car elles sont spécifiques de certains types de composés, sensibles et normalement très peu affectées par les coextraits^{4,5}. La documentation scientifique existante contient de nombreuses références à cette technique⁶. Sur le plan quantitatif toutefois, la chromatographie en couche mince donne des résultats limités. Un prolongement de cette méthode consiste à retirer la partie de la plaque correspondant à la valeur Rf du composé, puis à procéder à une élution de la substance à analyser à partir du support, afin de poursuivre la confirmation par analyse chimique ou physique. Il convient de toujours déposer sur la plaque à côté de l'extrait d'échantillon à analyser une tache du pesticide de référence afin d'éviter tout problème de non répétitivité de la valeur Rf. Le dépôt d'une tache de pesticide de référence sur l'extrait peut aussi donner des informations utiles. Les avantages de la chromatographie en couche mince sont : sa rapidité, son faible coût et son applicabilité à des produits sensibles à la chaleur. Ses inconvénients sont: (généralement) une sensibilité et une capacité de séparation inférieures à celles des techniques de détection chromatographiques au moyen d'instruments et la nécessité d'une purification plus efficace dans le cas de détections fondées sur des réactions chromatiques des substances chimiques.

DERIVATISATION

Lors de la sélection d'ions pour confirmation par CG/SM fondée sur un dérivé, les ions sélectionnés doivent être structurellement pertinents pour le résidu et ne pas représenter que des fragments de l'agent de dérivatisation. Si la dérivatisation peut être utile pour confirmer l'identité d'un résidu, il ne faut oublier qu'elle ajoute un élément supplémentaire d'incertitude à la confirmation quantitative.

Ces méthodes de confirmation peuvent être réparties en trois groupes principaux.

a) Réactions chimiques

On a souvent eu recours à des réactions chimiques de faible ampleur pour obtenir des produits de dégradation, d'addition ou de condensation des pesticides, qui sont ensuite réexaminés par des techniques chromatographiques. Les réactions donnent des produits présentant des temps de rétention et des réactions aux détecteurs différents du composé d'origine. Un échantillon du pesticide de référence doit être traité parallèlement au résidu présumé, de façon à permettre une comparaison directe des résultats. Un extrait enrichi doit être également inclus afin de prouver que la réaction s'est produite en présence d'un échantillon

⁴ Ambrus^{1*} Á., Füzesi² I., Susán² M., Dobi³ D., Lantos⁴ J., Zakar⁵ F., Korsós⁴ I., Oláh³ J., Beke³ B.B. et L. Katavics⁵ A cost effective screening methods for pesticide residue analysis in fruits, vegetables and cereal grains, *J. Environ Sci. Health B40*, 297-339, 2005 (Méthodes de séparation rentables pour l'analyse des résidus de pesticides dans les fruits, les légumes et les céréales).

⁵ Ambrus Á., Füzesi I., Lantos J., Korsos I., Hatfaludi T. Repeatability and Reproducibility of Rf and MDQ Values with Different TLC Elution and Detection Systems. *J. Environ Sci. Health B39* 2004 *accepted for publication*. (Répétabilité et reproductibilité des valeurs Rf et MDQ avec différents systèmes CCM d'élution et de détection).

⁶ IUPAC Report on Pesticides (13) (Bátora, V., Vitorovic, S.Y., Thier, H.-P. and Klisenko, M.A.; *Pure & Appl. Chem.*, 53, 1981, 1039-1049 (Rapport sur les pesticides).

du produit à analyser. Il peut y avoir une interférence lorsque des dérivés sont détectés au moyen des propriétés du réactif dérivatisant. Un inventaire des réactions chimiques utilisées pour les épreuves de confirmation a été publié par Cochrane, W.P. (Chemical derivatisation in pesticide analysis, Plenum Press, NY (1981)). Les réactions chimiques ont l'avantage d'être rapides et faciles à effectuer, mais il peut être nécessaire d'acheter des réactifs spéciaux et de les purifier.

b) Réactions physiques

Une technique utile est l'altération photochimique d'un résidu de pesticide en vue d'obtenir un ou plusieurs produits ayant un chromatogramme reproductible. Un échantillon du pesticide de référence et un extrait enrichi doivent toujours être traités en parallèle. Si les échantillons contiennent plus d'un résidu de pesticide, l'interprétation des résultats peut être difficile. Dans ce cas, on peut au préalable séparer certains résidus par CCM, CLHP ou fractionnement de la colonne.

c) Autres méthodes

De nombreux pesticides sont susceptibles d'être dégradés/transformés par des enzymes. Contrairement aux réactions chimiques normales, ces processus sont très spécifiques et consistent en général en oxydation, hydrolyse ou de-alkylation. Les produits de conversion ont des caractéristiques chromatographiques différentes du pesticide initial et peuvent servir à la confirmation si on les compare aux produits de réaction obtenus avec des pesticides de référence.

Tableau 6. Méthodes de détection appropriées pour le dépistage (phase 1) et la confirmation (phase 2) des résidus

		Phase 1 – Dépistage							
		CG avec colonne capillaire – ECD, NPD, FPD, PFPD	CG-SM	CL-SM	CL-DAD ou dépistage UV	CL-UV/VIS (longueur d'ondes simple)	CL-Fluorescence	CG avec colonne emballée – ECD, NPD, FPD	CCM – enzyme, croissance fongique ou inhibition des chloroplastes
Phase 2 - Confirmation	CG – colonne capillaire – ECD, NPD, FPD, PFPD	x ¹	x ¹	x	x	x	x	x	x
	CG-SM	x	x ^{1,2}	x	x	x	x	x	x
	CL-SM	x	x		x	x	x	x	x
	Techniques de balayage complet	x	x	x	x	x	x	x	x
	(MS) ⁿ , HRMS, autres techniques d'ionisation	x	x	x	x	x	x	x	x
	CL-DAD ou balayage UV	x	x	x		x	x	x	x
	CL-UV/VIS (longueur d'ondes simple)	x	x				x	x	x
	CL- Fluorescence	x	x		x	x		x	x
	CCM – enzyme, croissance fongique ou inhibition chloroplaste	x	x	x	x	x	x	x	x ^{2,3}
	Dérivatisation	x	x	x	x	x	x	x	x
Profil d'isomères spécifiques	x	x	x	x	x	x	x		

1 – Utiliser la colonne de polarité différente, qui aboutit à un ordre d'élution différent des résidus et des contaminants éluant à proximité du pic concerné, ou un autre détecteur spécifique.

2 – La même technique CG-SM peut être utilisée pour la phase 2 (confirmation) si des ions différents sont sélectionnés ou si des intervalles de tolérance sont établis à partir des solutions correspondant à la matrice.

3 – Utiliser la phase mobile ou stationnaire de polarité différente.

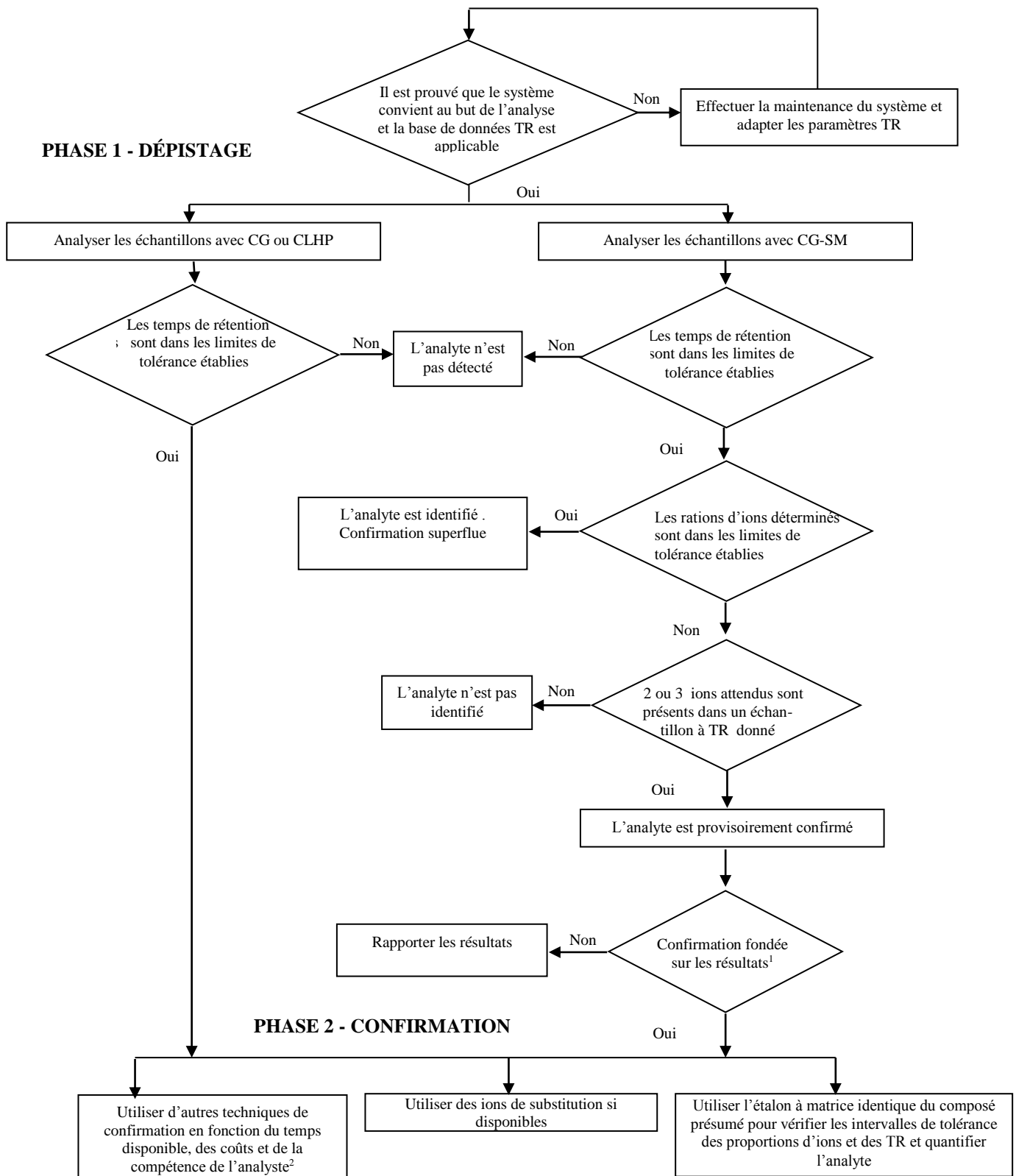


Figure 2. Représentation schématique des phases de dépistage et de confirmation (Phase 1 et Phase 2) pour les résidus de pesticides

1 – Valeurs inhabituelles: substances interdites, infraction aux LMR ou études supplémentaires requises comme l'évaluation de l'exposition

2 – Se rapporter au tableau 6 pour d'autres moyens de confirmation

3 – Pour un petit nombre de pesticides, le spectre de masse peut ne montrer qu'un seul ion spécifique. Dans ce cas, il faut changer de méthode de confirmation.