



**Utilisation de la LC/MS/MS pour l'identification
et la quantification des contaminants.
Domaine d'applications : Pesticides / Antibiotiques**

Mr Jean Patrick IDOUMBIN (Ingénieur R&D)

Dr Jimmy CHANE-MING (Responsable de l'Unité)

Sommaire

I. Présentation de la LC/MS/MS

II. Application Pesticides

III. Application Antibiotiques

IV. Perspectives et projets

V. Conclusion

La LC/MS/MS

1. LCMSMS

2. Pesticides

3. Antibio.

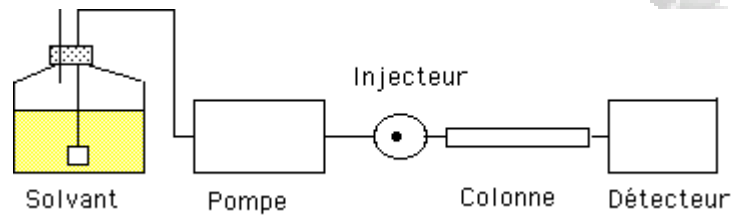
4. Perspectives

5. Conclusion

Qu'est ce que la LC/MS/MS ?

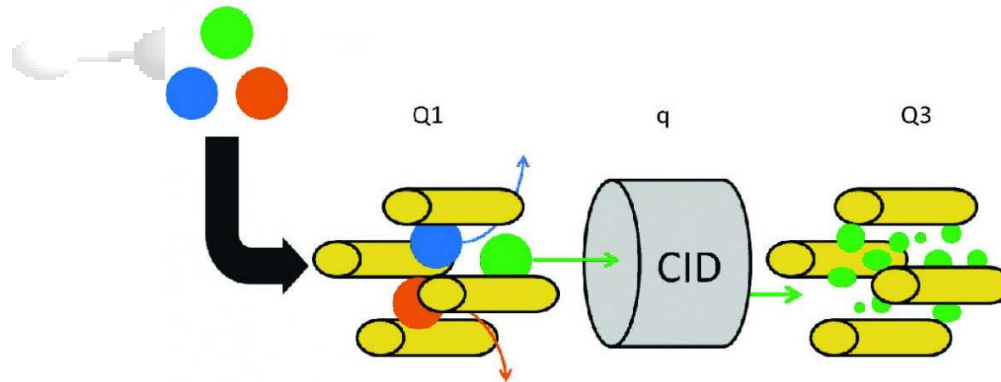
LC : Chromatographie Liquide

Séparation de contaminants d'un mélange complexe



MS/MS : Spectromètre de Masse

Identification et quantification du contaminant



Fonctionnement de la LC/MS/MS

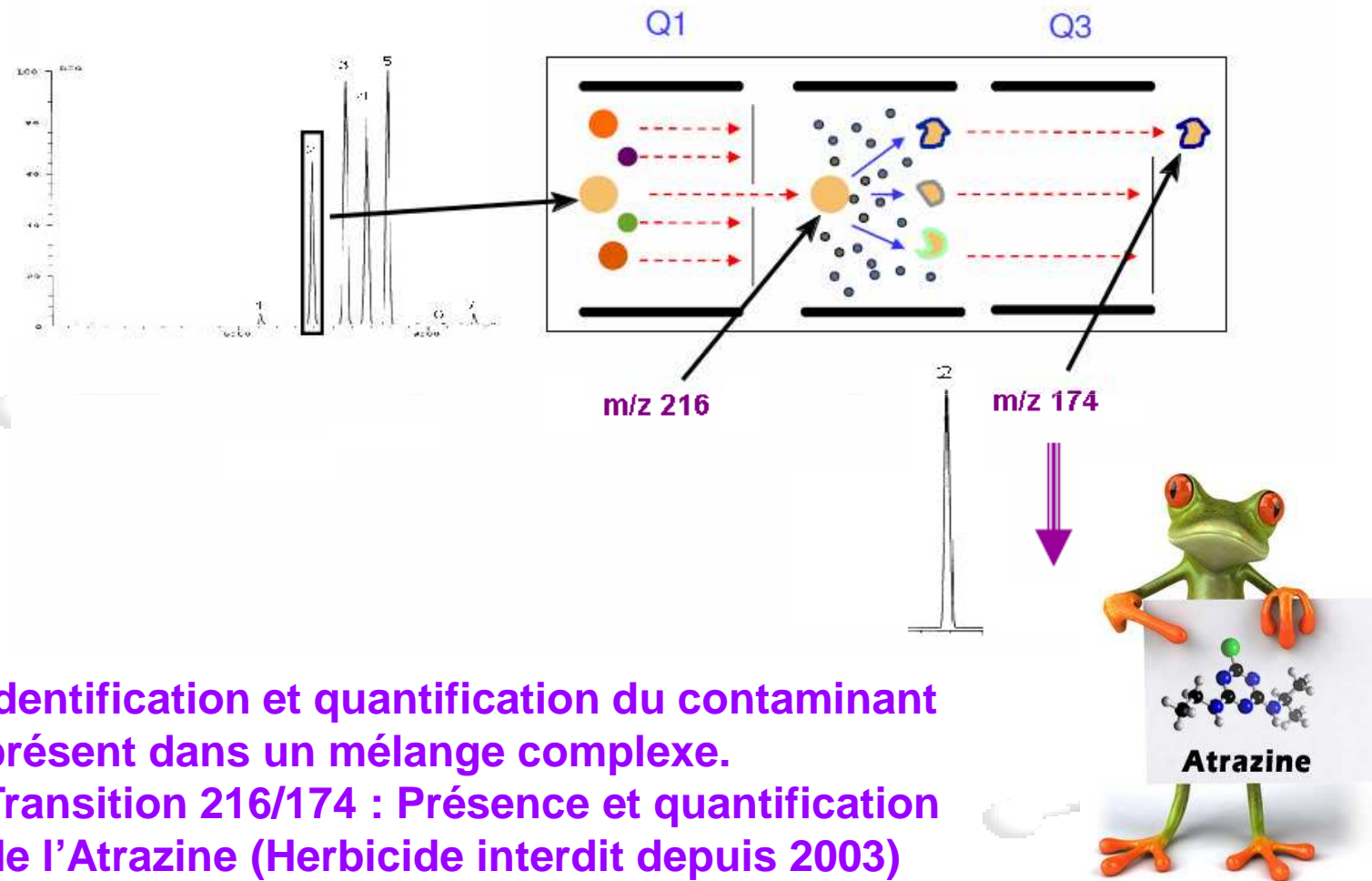
1. LCMSMS

2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion



Identification et quantification du contaminant présent dans un mélange complexe.
Transition 216/174 : Présence et quantification de l'Atrazine (Herbicide interdit depuis 2003)

Domaine d'application

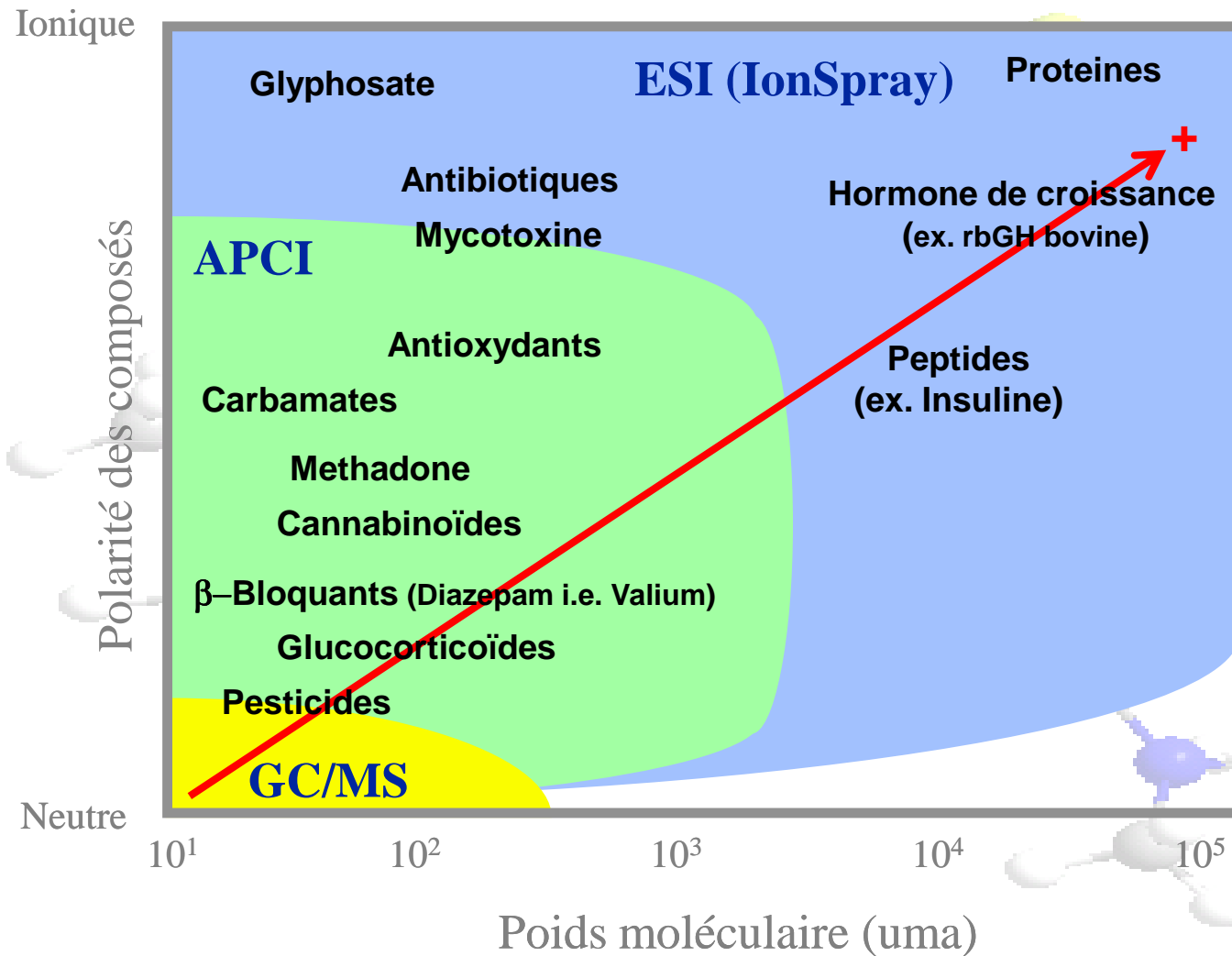
1. LCMSMS

2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion



Développement de méthodes multirésidus

Premier Procédé : Extractions par SPE (Solide Phase Extraction) développée en laboratoire

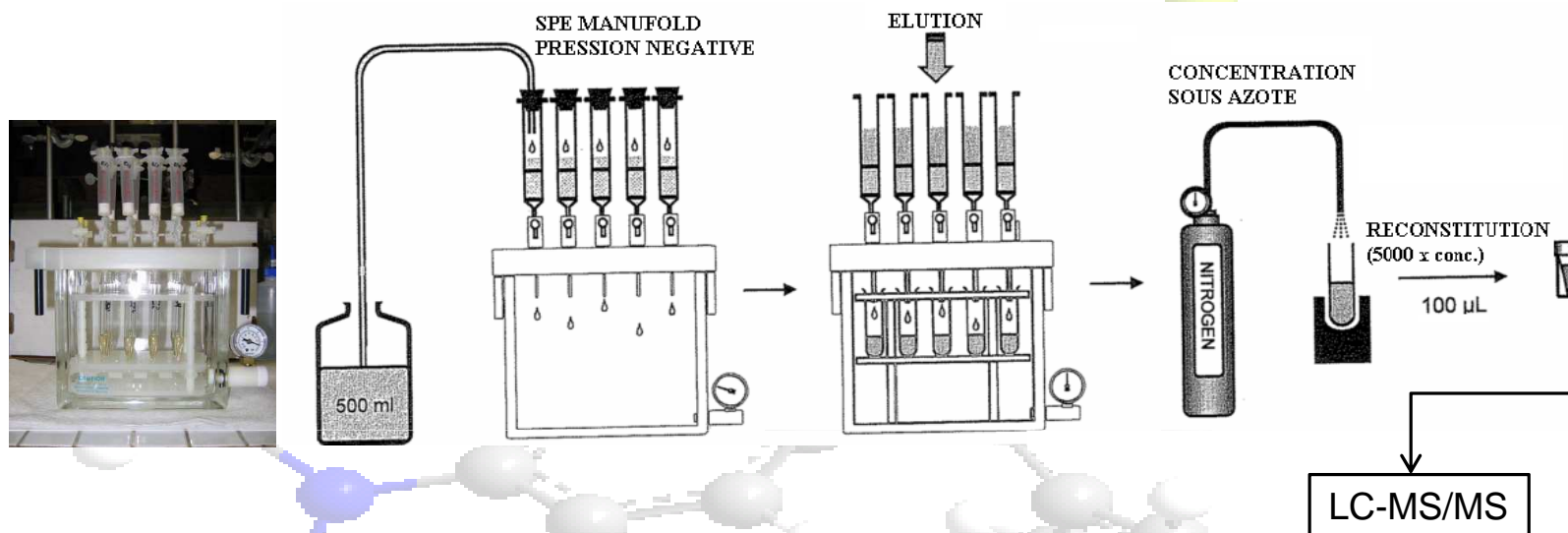
1. LCMSMS

2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion



Avantages :

- ✓ Extraction de 12 échantillons simultanément
- ✓ Volume d'échantillon extrait 20-500ml
- ✓ Utilisation de peu de solvant (5-15mL)
- ✓ Meilleur rendement comparé à l'extraction Liquide-Liquide (LLE)

Inconvénients :

- ✓ Cartouches non adaptées pour tous les familles de composés
- ✓ Composés non extraits à 100%
- ✓ Préparation de l'échantillon coûteuse en temps (toute une journée) et en consommables

Développement de méthodes multirésidus

Deuxième Procédé: Couplage en ligne de l'extraction SPE/LC-MS développée en laboratoire

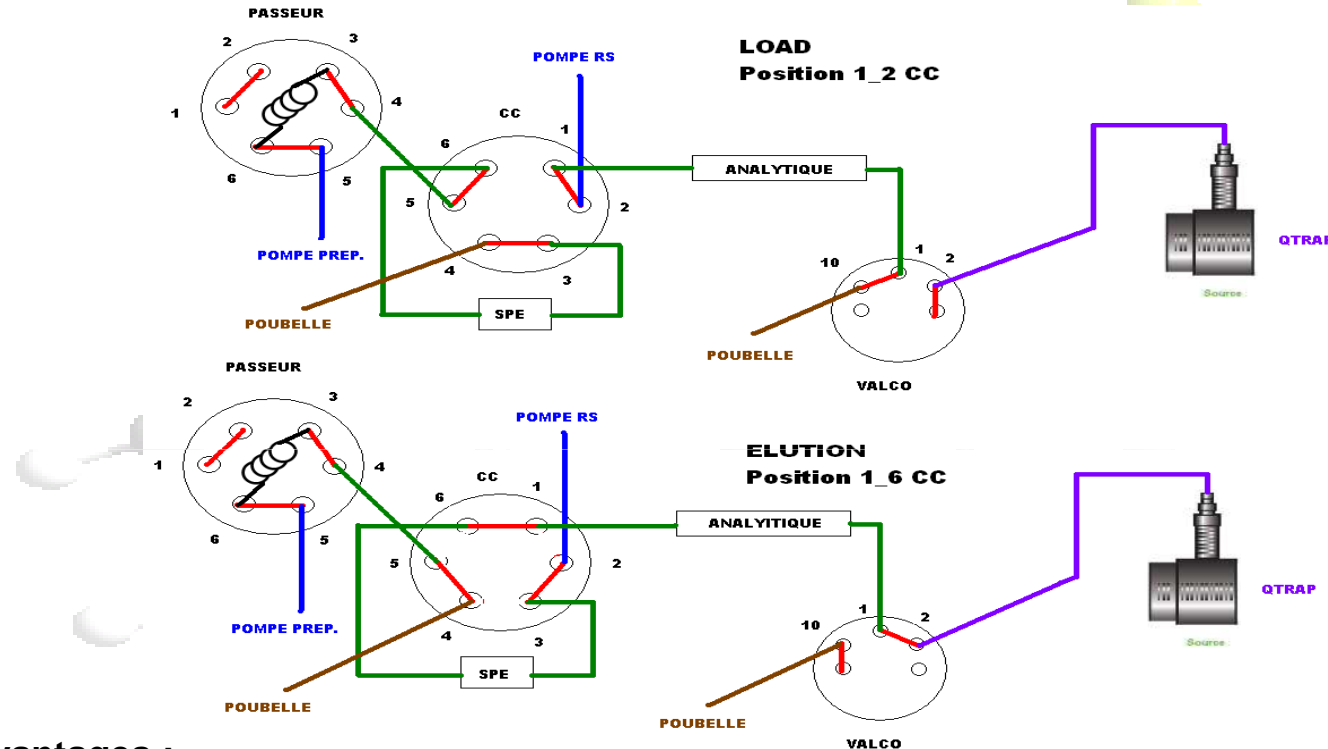
1. LCMSMS

2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion



Avantages :

- ✓ Peu de préparation d'échantillon
- ✓ Minimum de volume d'injection (2.5mL)
- ✓ Rendement d'extraction 100%
- ✓ Temps d'analyse court (10min/échantillon)

Inconvénients :

- ✓ Cartouche en ligne non adaptée pour tous les composés
- ✓ Difficultés à évaluer les suppressions d'ions pour tous les interférents dans les différents types d'eau

Méthode sélectionnée en cours de validation (ref. NF T90-210 et XP T90-220)

Molécules Analysées : 55 Pesticides (liste non exhaustive)

1. LCMSMS

Familles analysées : Triazines, Phénylurées, Organophosphorés, Carbamates, Acétanilides, Aryloxyacides...

Matrices : Eau alimentaire, Eau de Surface, Eau Minérale, Eau Souterraine

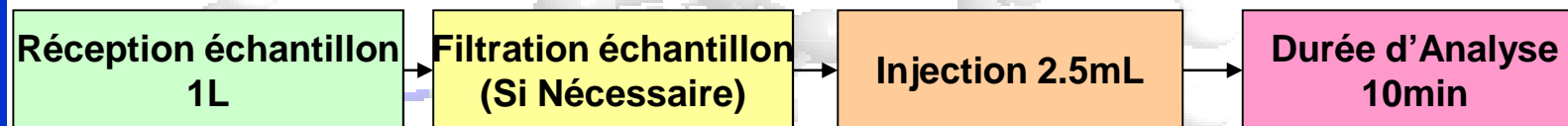
2. Pesticides

Extraction : Extraction sur Cartouche SPE en ligne

Colonne Analytique : C18 50x2mm 5 μ m

Débit : 0.3mL/min

3. Antibio.



Peu de préparation est nécessaire avant la mise en analyse

4. Perspectives

Temps d'analyse court et faible consommation de solvant (**1.44mL / échantillon**)

Traitement et rendu des résultats : **1 semaine comparé à 2 mois minimum** si l'échantillon est envoyé en Métropole (source Client)

5. Conclusion

Limites de Détection et Quantification de la méthode : **LD = 3ng/L (3ppt) LQ = 10ng/L (10ppt)**

Limite de qualité de l'eau : inférieure à **0.1 μ g/L** par pesticide individuel (Arrêté du 11/01/2007)

55 pesticides à 0.10 µg/L par couplage SPE/LC-MS pour les multirésidus

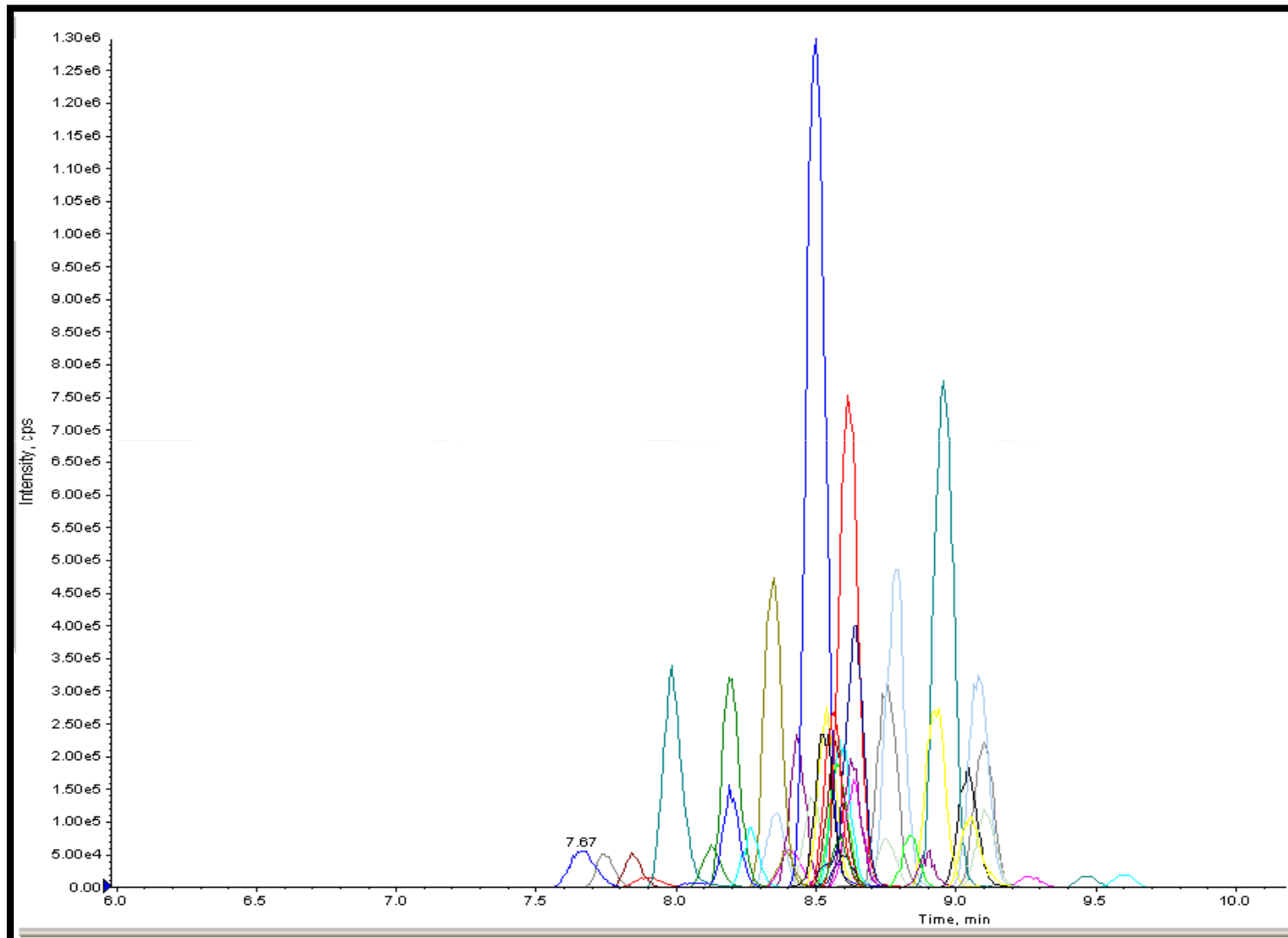
1. LCMSMS

2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion



Exactitude de la méthode d'analyse du couplage SPE/LC-MS/MS

Z-Scores aux Essais Inter-laboratoires BIPEA 59 Octobre et Novembre 2010

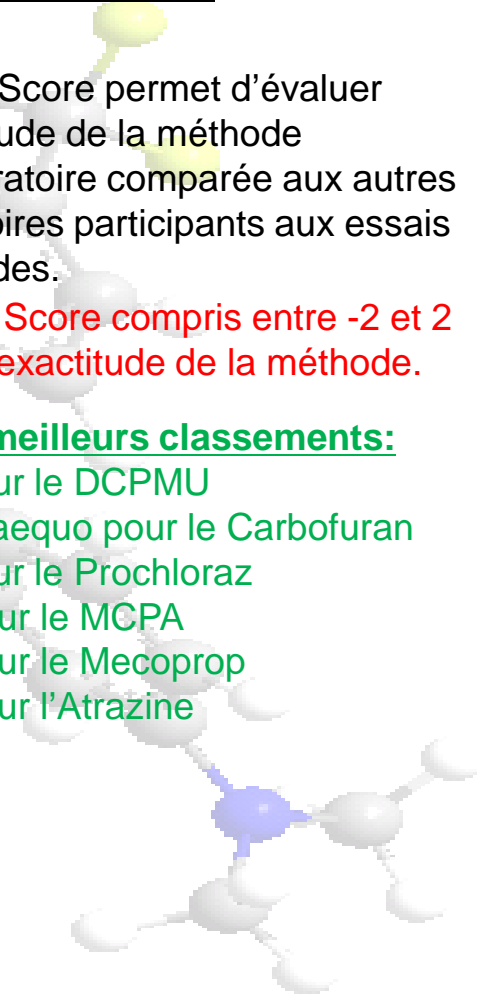
Paramètres	59-1	59-2	37-3
1-(3,4DCP)-3MU	0	-0.17	
2,4,5-T	-0.82	1.36	
2,4-D	1.07	1.5	
Atrazine	-0.57	-0.44	-0.06
Bentazone	-0.55	-1.72	
Carbofuran	0	-0.86	
Cyanazine	-0.57	0.71	0.27
DEA (Desethyl Atrazine)	-0.43	-0.85	-0.39
Dichlorprop	-0.27	1.33	
Diuron			-0.47
DNOC	-0.33	-1	
Imidachloprid	-1.23	-0.35	
Ioxynil	-0.67	-1.56	
isoproturon			-1.14
Linuron			-0.76
MCPA	-0.23	0.92	
Mecoprop	-1.09	0.09	
Metalaxyl	-1.14	-1.1	
Methazachlor	-0.56	-1	-1.03
Metoxuron			-1.76
Monolinuron			-1.57
Monuron	0.38	-1.17	
Norflurazon			0.6
Oxadixyl	-0.43	-1.07	
Prochloraz	-0.71	0	
Propyzamide	-0.6	-0.82	
Simazine	-0.75	-1.1	-1.7
Terbumeton			-0.89
Terbutylazine	-0.8	0.6	
Thiabendazole	-0.75	-0.86	0.52
Trichlopyr	-0.78	0.37	

❑ Le Z Score permet d'évaluer l'exactitude de la méthode du laboratoire comparée aux autres laboratoires participants aux essais d'aptitudes.

❑ Un Z Score compris entre -2 et 2 vérifie l'exactitude de la méthode.

❑ **Les meilleurs classements:**

- ✓ 1^{er} pour le DCPMU
- ✓ 1^{er} exaequo pour le Carbofuran
- ✓ 1^{er} pour le Prochloraz
- ✓ 2nd pour le MCPA
- ✓ 2nd pour le Mecoprop
- ✓ 2nd pour l'Atrazine



1. LCMSMS

2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion

Exactitude de la méthode d'analyse du couplage SPE/LC-MS/MS

Exemples de Z-scores aux essais interlaboratoires (résultats BIPEA 59 de Novembre 2010)

1. LCMSMS

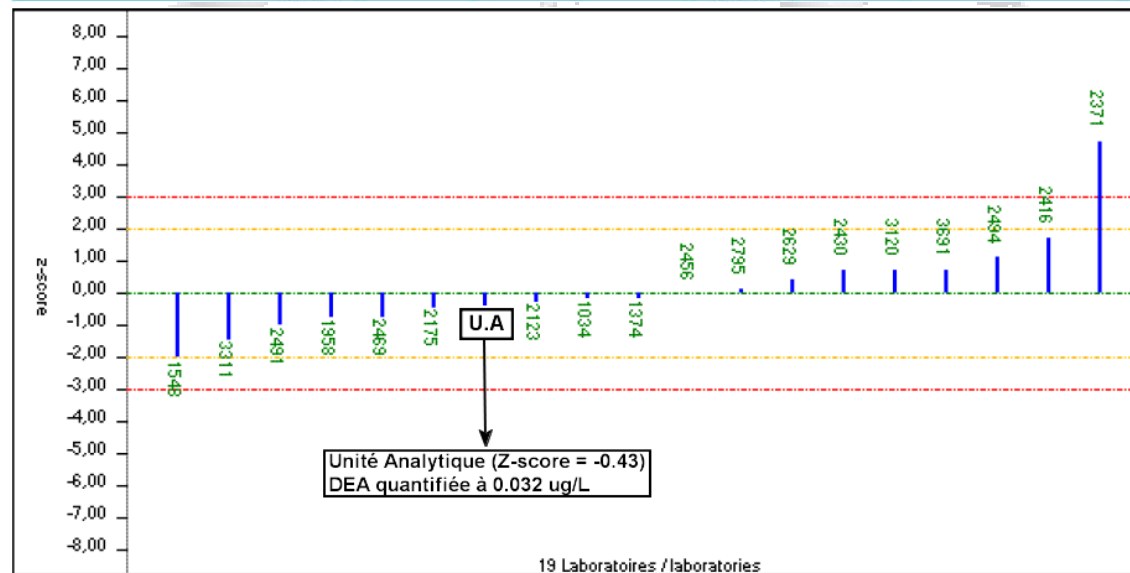
2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

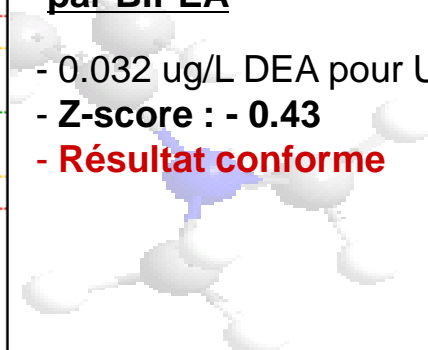
5. Conclusion

Nombre de résultats	19	1	2	4	5	4	1	1	1	19	Total of results
Effectif	5				1034					5	Number of results
	4			1958	1374	2430				4	
	3			2175	2123	2629				3	
	2		2491	2469	2456	3120				2	
	1	1548	3311	U.A	2795	3691	2494	2416	2371	1	
Numéro de classe	<	1	2	3	4	5	6	7	>		Class number
Intervalle de classe		0,021	0,025	0,029	0,033	0,037	0,041	0,045	0,049		Class Interval
		$\hat{X}-VT$ 0,014				\hat{X} 0,035				$\hat{X}+VT$ 0,056	



DEA dopée à 0.035ug/L dans l'eau alimentaire par BIPEA

- 0.032 ug/L DEA pour U.A
- Z-score : - 0.43
- **Résultat conforme**



Exactitude de la méthode d'analyse du couplage SPE/LC-MS/MS

1. LCMSMS

2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion



Une du Journal de l'île du 04 Avril 2011

« Sur les vingt-six prélèvements réalisés dans les eaux souterraines au dernier trimestre 2010, quinze forages révèlent d'ailleurs une contamination variable... »

« **L'Atrazine Deséthyl** reste la plus détectée (15/27 détections) avec des teneurs variables. »

Auteur : *Juliane Ponin-Ballom*

Exactitude de la méthode d'analyse du couplage SPE/LC-MS/MS

Comparaison Inter-Laboratoires : Analyse de la **DesethylAtrazine**
(produit de dégradation de l'**Atrazine**)

Ech-1		Ech-2		Ech-3	
U.A.	I.L.	U.A.	I.L.	U.A.	I.L.
0.02	0,02	<0.01(LQ)	Traces	0.12	0,14
Ech-4		Ech-5		Ech-6	
U.A.	I.L.	U.A.	I.L.	U.A.	I.L.
0.03	0,03	0.04	0,04	<0.003(LD)	<LD
Ech-7		Ech-8		Ech-9	
U.A.	I.L.	U.A.	I.L.	U.A.	I.L.
0.02	0,02	<0.01(LQ)	Traces	<0.01(LQ)	Traces
Ech-10		Ech-11		Ech-12	
U.A.	I.L.	U.A.	I.L.	U.A.	I.L.
0.03	0,03	0.03	0,03	0.02	0,03
Ech-13		Ech-14		Ech-15	
U.A.	I.L.	U.A.	I.L.	U.A.	I.L.
<0.003(LD)	<LD	<0.003(LD)	<LD	<0.003(LD)	<LD

Résultats en µg/L (ppb)

Analyses sur 15 échantillons d'eaux (Surface et Forage) de la Réunion en Nov 2010

1. LCMSMS

2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion

Surveillance des résidus d'antibiotiques dans le sérum animal

Même processus de développement effectué pour l'analyse des pesticides

1. LCMSMS

Molécules Analysées : Sulfanilamide, Amoxicilin, ampicilin, Tetracyclin, Enrofloxacin, Cephalothin, Chloramphenicol, Colistin A, Colistin B

Matrice : Sérum Animal

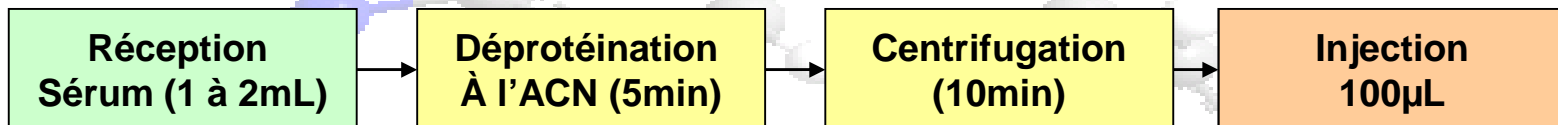
2. Pesticides

Extraction : Extraction sur Cartouche SPE en ligne

Colonne Analytique : C18 50x2mm 5 μ m

3. Antibio.

Débit : 0.3mL/min



4. Perspectives

Faible temps de préparation des échantillons (15min/Echantillon)

Temps d'analyse court (15min/Echantillon)

Durée d'Analyse
15min

5. Conclusion

Limite de Quantification : **LQ = 10 μ g/L** (10ppb) (méthode en cours de validation)

Test à 10µg/L dans le sérum de porc

1. LCMSMS

Méthode testée sur du sérum de porc exempt d'antibiotiques dopé à 10µg/L.



2. Pesticides

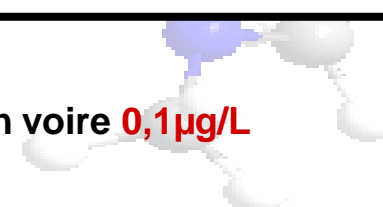
3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion

Target Analyte	RT (min)	Area (cps)	Height (cps)	Signal to Noise
Sulfanilamide	9.18	97300	19900.00	446.00
Chloramphenicol	11.50	818000	185000.00	48300.00
Ampicillin	9.45	663000	245000.00	19300.00
Enrofloxacin	9.75	448000	155000.00	8740.00
Amoxicillin	8.81	207000	69200.00	2450.00
Cephalothin-H2O	11.90	332000	75200.00	2540.00
Tetracyclin	9.84	1240000	399000.00	643.00
Colistin B	9.00	6550	1660.00	129.00
Colistin A	9.17	18500	5120.00	191.00

Possibilité d'atteindre 1µg/L en Limite de Quantification voire 0,1µg/L



Test à 10 μ g/L dans le sérum de porc

1. LCMSMS

Méthode testée sur du sérum de porc exempt d'antibiotiques dopé à 10 μ g/L.

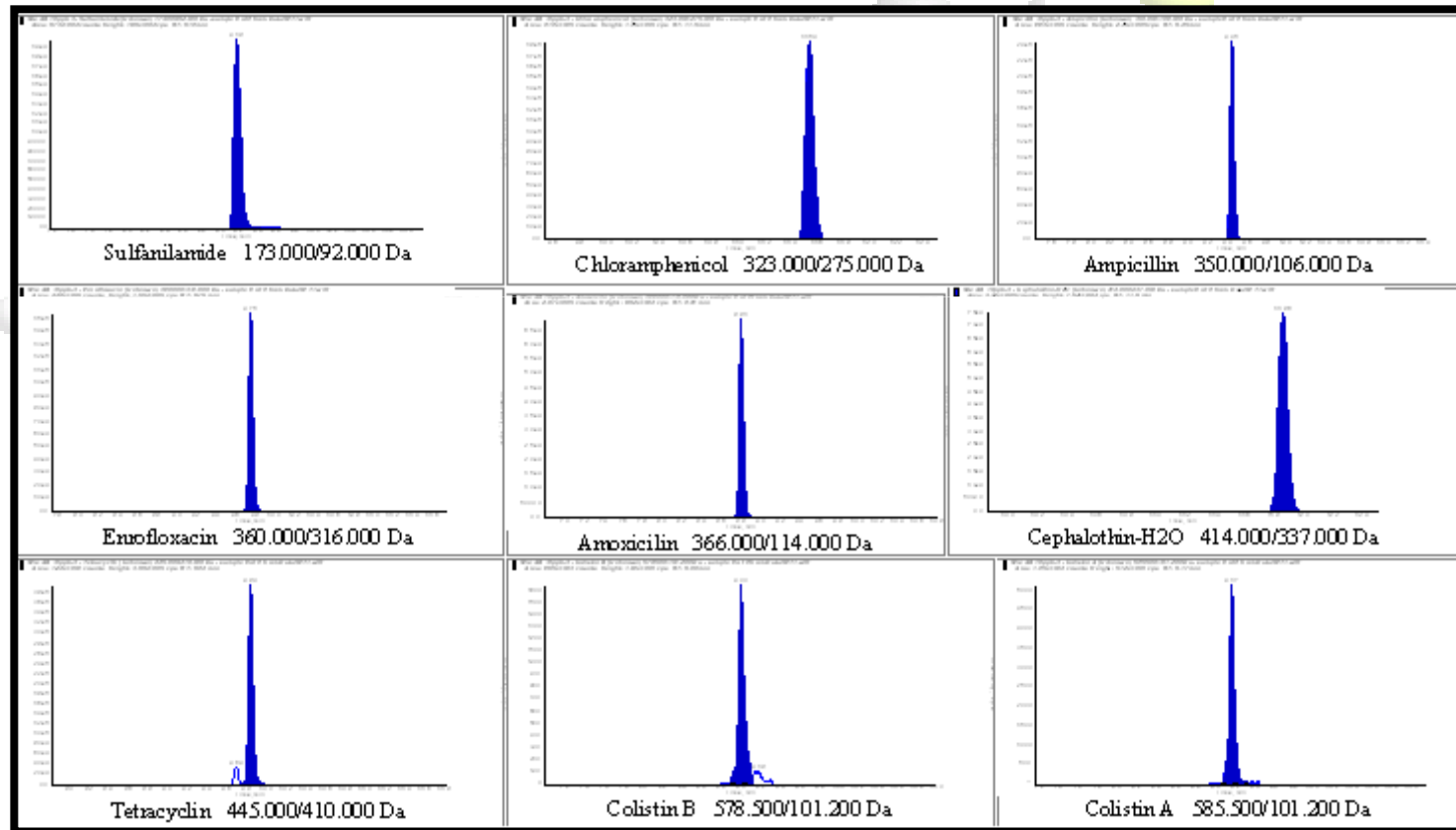


2. Pesticides

3. Antibio.

4. Perspectives

5. Conclusion



Pesticides/Antibiotiques/Autres

Mise en place de l'accréditation selon la norme NF EN ISO CEI 17025 (en cours)

1. LCMSMS

Augmenter la liste des pesticides analysés en fonction de **la demande du client**

Développement de deux méthodes spécifiques pour les composés ne pouvant se faire en multirésidus : **Glyphosate, AMPA, Glufosinate, Paraquat, Diquat, Mepiquat, Chlormequat**

2. Pesticides

Analyses sur les autres matrices : **Fruits/Légumes, produits agroalimentaires, miel...**
Recherche et Développement sur la méthode QueChers.

Finaliser la validation de la méthode multirésidus des antibiotiques dans le sérum

3. Antibio.

Réception des échantillons de sérum de Madagascar et mise en analyse

Finalisation de la Méthode Spécifique pour l'analyse des aminoglycosides : **Streptomycin** et **Gentamicin** (composés ne pouvant se faire en multirésidus)

4. Perspectives

Recherche et quantification **d'acides phénoliques et flavonoïdes** dans la vanille et produit de la canne à sucre (en cours d'étude)

Recherche et quantification des **Polluants Organiques Persistants** dans le poisson, et les œufs des oiseaux de l'Océan Indien (en cours d'étude)

5. Conclusion

Toxicologie : Développement d'une méthode multirésidus pour la détection de résidus de produits pharmaceutiques dans le sang (en cours de développement)

Conclusion

1. LCMSMS

Le couplage LC-MS/MS en tandem est une méthode d'analyse de plus en plus utilisée pour détecter, identifier et quantifier les différents constituants d'un mélange complexe (aliment, extrait végétal, eau, sang, salive, urine...)

2. Pesticides

Le Spectromètre de masse quadrupolaires tandem (MS/MS) permet les analyses qualitatives et quantitatives de composés présents à l'état de trace (exemple: sécurité alimentaire, surveillance environnementale, études toxicologiques...)

3. Antibio.

La technique LC-MS/MS s'adresse en particulier à des molécules peu volatiles et thermolabiles

4. Perspectives

L'utilisation de la LC-MS/MS permet de raccourcir le temps de l'analyse et simplifie la préparation de l'échantillon (pas de dérivation)

5. Conclusion



Merci de votre attention !

*Mr Jean Patrick IDOUMBIN : jp.idoumbin@cyroi.fr
Dr Jimmy CHANE-MING : j.chaneming@cyroi.fr*