

# MÉTHODES DE DOSAGE DES PESTICIDES DANS LES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES EN POPULATION WALLONNE

**Corinne CHARLIER (1), Arnaud GIUSTI (2), Suzanne REMY (2), Catherine PIRARD (1)**

*(1) Service de Toxicologie, CHU de Liège, avenue de l'Hôpital 1, 4000 LIEGE (Belgique)  
c.charlier@chu.ulg.ac.be - c.pirard@chu.ulg.ac.be*

*(2) Institut Scientifique de Service Public, rue du Chéra 200, 4000 LIEGE (Belgique)  
a.giusti@issep.be - s.remy@issep.be*

# Projet EXPOPESTEN

(Exposition de la popopulation wallonne aux pesticides environnementaux)

## OBJET

Fournir une première évaluation  
de l'exposition environnementale (non alimentaire)  
de la population wallonne aux pesticides

## TROIS ETAPES

### ETAPE 1

Analyse intégrée des données disponibles  
en Wallonie

Mesures dans l'air ambiant  
des pesticides sélectionnés

### ETAPE 2

### ETAPE 3

Evaluation de la contamination  
de populations d'enfants  
situés dans zones d'exposition contrastées

# Projet EXPOPESTEN

## Répartition géographique des cultures

### ETAPE 1

Analyse intégrée des données disponibles en Wallonie

Pesticides utilisés :  
types de pesticides et  
quantité/hectare/culture  
→ 300 substances actives

Sélection des pesticides  
sur base de leur volatilité  
et de leur toxicité

→ 46 pesticides sélectionnés

# Projet EXPOPESTEN

2 stations « de référence »  
(utilisation faible voire nulle de pesticides)

1 station à proximité  
de zones d'élevage

2 stations urbaines

## ETAPE 2

Mesure dans l'air ambiant  
des 43 pesticides sélectionnés.

Prélèvements d'air  
entre le 28 mai 2015 et le 9 juin 2016,  
4 m<sup>3</sup>/heure pendant 14 jours  
→ 1344 m<sup>3</sup> d'air filtré.

1 station culture fruitière

2 stations usage non agricole  
(pépinières, parcs, jardins)

4 stations usage agricole  
(maïs, betteraves et céréales, pommes de terre, légumes)

12 stations d'échantillonnage  
pour établir la cartographie de la contamination atmosphérique  
par les pesticides en Région Wallonne

# Projet EXPOPESTEN

3 zones d'exposition sélectionnées :  
contamination faible, moyenne, élevée

## ETAPE 3

Evaluation de la contamination  
de populations d'enfants situés  
dans zones d'exposition contrastées

Echantillons urinaires  
récoltés chez 259 enfants

Questionnaire relatif  
aux habitudes de vie des enfants

Trois techniques analytiques ont été développées selon le degré de volatilité des pesticides et la nécessité ou non d'une dérivation

**GC-MS  
sans dérivation**

Aclonifen  
Benfluraline  
Captane  
Chlorpyrifos éthyl  
Cyhalothrine  
Cyprodinil  
Diméthénamide  
Ethoprophos  
Krésoxim-méthyl  
Métolachlore  
Oxadiazon  
Pendiméthaline  
Prosulfocarbe  
Triallate

**GC-MS  
avec dérivation**

2,4-D et 2,4-DB  
MCPA  
5,6-Trichloro-2-pyridinol  
Tetrahydrophthalimide  
Pyréthroïdes:  
3-PBA, cis-DCCA,  
trans-DCCA, 4-F-3-PBA,  
DBCA  
  
Organophosphorés:  
diméthylthiophosphate  
diméthylldithiophosphate  
diéthylthiophosphate  
diéthylldithiophosphate

**LC-MS en mode  
electrospray positif**

Boscalid  
Cypraconazole  
Difenconazole  
Diméthoate  
Epoconazole  
Fénoxy-carbe  
Fenpropidine  
Linuron  
Métribuzine  
Penconazole  
Propiconazole  
Propyzamide  
Spiroxamine  
Tébuconazole  
Tétraconazole  
Terbutylazine + déséthyl

**Technique GC-MS sans dérivation**

**PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON**

**HYDROLYSE**

4 ml urine  
+ 2 ml tampon NaAc 0,2 M  
+ 20 µl β-glucuronidase  
+ 20 µl sulfatase  
+ 50 µl standard interne à 200 µg/L

**INCUBATION**

1 nuit à 40°C

**EXTRACTION**

Sur cartouche Waters® Oasis HLB 6 cc (200 mg)  
conditionnée au MeOH et à l'eau  
Elution sur cartouche Chromafix® Dry Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
par 2 x4 ml Hexane/Dichlorométhane (95:5)

**EVAPORATION**

A 40°C, volume final = 500 µL

## Technique GC-MS sans dérivation

### CONDITIONS OPÉRATOIRES

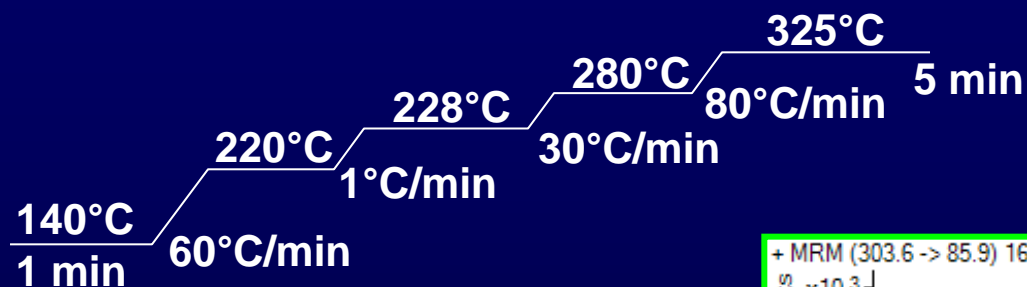
**GC-MS/MS**

Agilent® 7890A GC/7000A GC Triple Quad mass spectrometer

**Colonne**

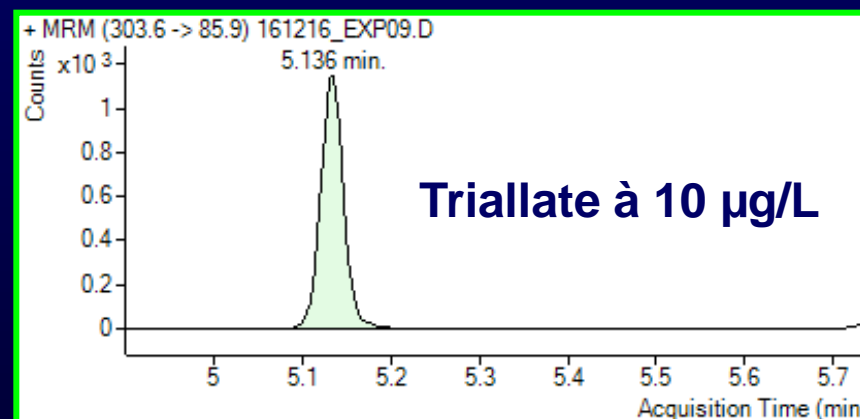
HP5-MS 30 m x 0,25 mm (ID) x 0,25 µm (épaisseur film)

**Gradient T°**



**Gaz vecteur**

Hélium



**Injection**

2 µL en mode « pulsed splitless » sous une pression de 30 psi à 250°C

**Conditions MS**

ionisation chimique positive (PCI) avec méthane comme gaz réactif



# Projet EXPOPESTEN – Etape 3

## Technique GC-MS sans dérivation TRANSITIONS SUIVIES

Composés	Segment	Temps (min)	Ion parent (m/z)	Ion fille (m/z)	Collision (eV)
Benfluraline	1	3-4.9	335.6	231.9	18
Benfluraline	1	3-4.9	335.6	70.4	20
Ethoprosfos	1	3-4.9	242.9	130.8	22
Ethoprosfos	1	3-4.9	242.9	96.8	40
<b>Triallate</b>	<b>2</b>	<b>4.9-5.75</b>	<b>305.6</b>	<b>85.9</b>	<b>18</b>
<b>Triallate</b>	<b>2</b>	<b>4.9-5.75</b>	<b>303.6</b>	<b>85.9</b>	<b>18</b>
Chlorpyrifos ethyl	3	5.75-6.9	349.0	90.0	40
Metolachlor	3	5.75-6.9	283.7	252	18
Metolachlor	3	5.75-6.9	251.7	176.1	25
Prosulfocarb	3	5.75-6.9	252.0	128.0	10
Prosulfocarb	3	5.75-6.9	252.0	90.9	25
Pendimethaline D5	4	6.9-8.9	286.1	255.1	5
Pendimethaline D5	4	6.9-8.9	286.1	213.0	5
Pendimethaline	4	6.9-8.9	281.8	212.0	10
Pendimethaline	4	6.9-8.9	263.7	56.8	28
Captane	4	6.9-8.9	265.8	237.9	8
Captane	4	6.9-8.9	263.7	235.9	8
Cyprodinil D5	4	6.9-8.9	258.7	229.0	45
Cyprodinil D5	4	6.9-8.9	231	231	5
Cyprodinil	4	6.9-8.9	254.0	226.0	25
Cyprodinil	4	6.9-8.9	226.0	92.9	45
Oxadiazon	5	8.9-10.1	346.9	221.8	20
Oxadiazon	5	8.9-10.1	344.9	219.8	20
Kresoxy-methyl	5	8.9-10.1	206.0	131.0	20
Kresoxy-methyl	5	8.9-10.1	206.0	116.0	10
Aclonifen D5	6	10.1-11.8	269.7	253.0	20
Aclonifen D5	6	10.1-11.8	269.7	198.0	20
Aclonifen	6	10.1-11.8	264.8	248.0	20
Aclonifen	6	10.1-11.8	264.8	182.0	20
Cyhalothrine	7	11.8-13.5	449.37	224.8	12
Cyhalothrine	7	11.8-13.5	224.8	140.9	20

# Projet EXPOPESTEN – Etape 3

## Technique GC-MS sans dérivation

### PERFORMANCES ANALYTIQUES

Molécule	Standard interne	LLOQ (µg/L)	ULOQ (µg/L)	Justesse		Répétabilité		Reproductibilité	
				Inexactitude (%)		CV (%)		CV (%)	
				à la LLOQ	à la ULOQ	à la LLOQ	à la ULOQ	à la LLOQ	à la ULOQ
Aclonifen	Aclonifen D5	0,18	20	-4,4	14,4	5,8	3,1	15,4	6,4
Benfluraline	Aclonifen D5	0,45	10	3,9	16,4	11,6	2,6	21,2	2,6
Captan	Pendimethaline D5	0,5	20	3,8	7,4	12,3	2,8	12,3	9,4
Chlorpyrifos ethyl	Dimethenamide D3	0,29	20	6,9	7,2	8	8,8	8	8,8
Cyhalothrine	Aclonifen D5	0,92	20	-1,8	-1,6	13	13,6	13	15
Cyprodinil	Cyprodinil D5	0,21	20	-0,9	3,4	10	11,4	14,4	13
Dimethenamide	Dimethenamide D3	0,2	20	-23,9	5,3	9,3	5,1	14,6	5,1
Ethoprofos	Dimethenamide D3	0,2	20	5,5	2,8	5,5	13,1	22,4	13,1
Kresoxim-Methyl	Pendimethaline D5	0,72	20	4,8	1	5,8	13,1	7,7	13,9
Metolachlor	Pendimethaline D5	0,19	20	2,1	-4,2	13,1	8	17,3	8
Oxadiazon	Pendimethaline D5	0,23	20	-9,2	-0,7	14,5	8,3	20,6	11,3
Pendimethaline	Pendimethaline D5	0,12	20	-11,8	0,44	19	3,9	19	11,9
Prosulfocarb	Dimethenamide D3	0,14	20	-1,8	6,4	14,4	6	22,4	7,8
Triallate	Dimethenamide D3	0,24	20	4,7	3,3	12,5	9,1	20,8	9,1

**Technique GC-MS avec dérivation**  
**PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON**

**HYDROLYSE**

3 ml urine  
+ 300 µl HCl 3 M  
+ 50 µl standard interne à 1 mg/L

**EXTRACTION**

Sur cartouche Waters® Oasis WAX 3 cc (60 mg)  
conditionnée au MeOH et à l'eau  
Elution par 2 x3 ml MeOH/NH<sub>3</sub> (95/5)

**EVAPORATION**

A 40°C, à sec

**DÉRIVATION**

Résidu  
+ 1 ml ACN  
+ 50 µl 1-chloro-3-iodopropane  
+ 50 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
2 h à 65°C

**EVAPORATION**

A 30°C, changement de solvant (50 µl de nonane)

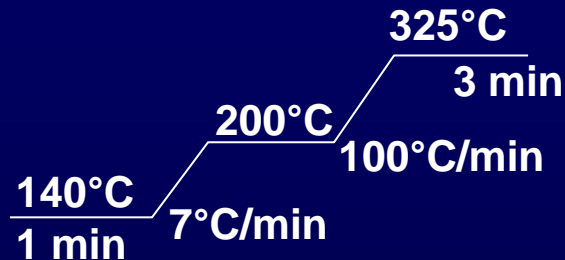
# Projet EXPOPESTEN – Etape 3

## Technique GC-MS avec dérivation CONDITIONS OPÉRATOIRES

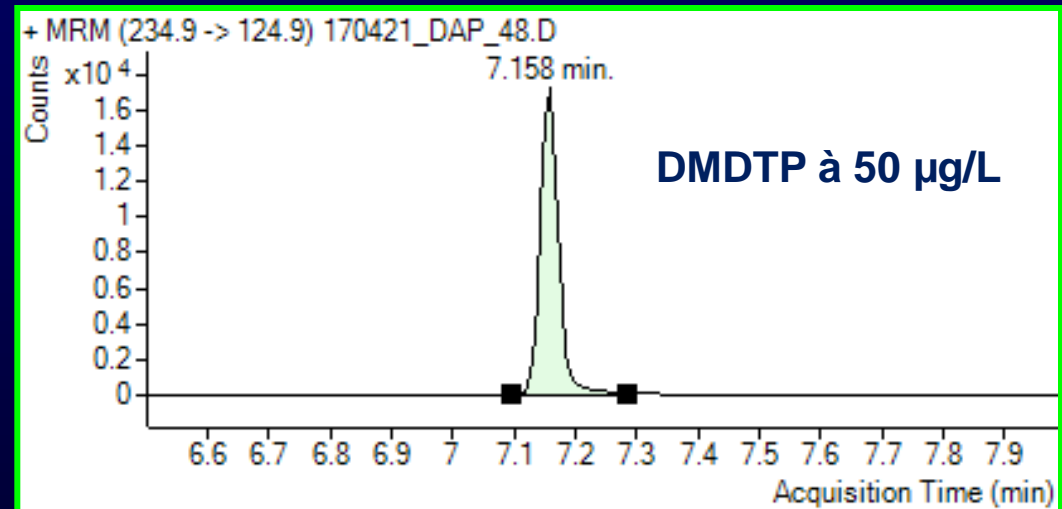
**GC-MS/MS** Agilent® 7890A GC/7000A GC Triple Quad mass spectrometer

**Colonne** HP5-MS 30 m x 0,25 mm (ID) x 0,25 µm (épaisseur film)

**Gradient T°**



**Gaz vecteur** Hélium



**Injection** 2 µL en mode « pulsed splitless » sous une pression de 30 psi à 250°C

**Conditions MS** ionisation chimique positive (PCI) avec méthane comme gaz réactif

**Projet EXPOPESTEN – Etape 3**  
**Technique GC-MS avec dérivation**  
**TRANSITIONS SUIVIES**

Composés	Segment	Temps (min)	Ion parent (m/z)	Ion fille (m/z)	Collision (eV)
Diéthylphosphate	1	4.8-5.6	233.0	98.7	25
Diéthylphosphate	1	4.8-5.6	230.9	98.7	25
Diéthylphosphate D10	1	4.8-5.6	243.0	101	25
Diéthylphosphate D10	1	4.8-5.6	240.9	101	25
Diméthylthiophosphate	2	5.6-6.5	221.0	142.9	12
Diméthylthiophosphate	2	5.6-6.5	219.0	142.9	12
Diméthylthiophosphate D6	2	5.6-6.5	227.0	148.7	12
Diméthylthiophosphate D6	2	5.6-6.5	224.9	148.8	12
Diéthylthiophosphate	3	6.5-8.0	248.9	192.8	15
Diéthylthiophosphate	3	6.5-8.0	246.9	190.8	15
Diéthylthiophosphate D10	3	6.5-8.0	258.9	194.5	15
Diéthylthiophosphate D10	3	6.5-8.0	256.9	192.9	15

	Segment	Temps (min)	Ion parent (m/z)	Ion fille (m/z)	Collision (eV)
<b>DMDTP</b>	<b>3</b>	<b>6.5-8.0</b>	<b>236.9</b>	<b>124.9</b>	<b>15</b>
<b>DMDTP</b>	<b>3</b>	<b>6.5-8.0</b>	<b>234.9</b>	<b>124.9</b>	<b>15</b>
Diéthylldithiophosphate	4	8-9	264.9	96.8	28
Diéthylldithiophosphate	4	8-9	262.9	96.8	28
Diéthylldithiophosphate D10	4	8-9	274.9	98.9	28
Diéthylldithiophosphate D10	4	8-9	272.9	98.9	28

## Technique LC-MS

### PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

#### HYDROLYSE

4 ml urine  
+ 2 ml tampon NaAc 0,2 M  
+ 20 µl β-glucuronidase  
+ 20 µl sulfatase  
+ 50 µl standard interne à 200 µg/L

#### INCUBATION

1 nuit à 40°C

#### EXTRACTION

Sur cartouche Waters® Oasis HLB 6 cc (200 mg)  
conditionnée au MeOH et à l'eau

Récupération fraction GC par élution sur  
cartouche Chromafix® Dry Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
par 2 x4 ml Hexane/Dichlorométhane (95:5)

**Retrait de la cartouche Chromafix®  
et élution par 3 ml dichlorométhane**

#### EVAPORATION

A 30°C, à sec, puis reprise par 100 µL MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50)

# Projet EXPOPESTEN – Etape 3

## Technique LC-MS

### CONDITIONS OPÉRATOIRES

**UPLC-MS/MS**

Waters® Acquity UPLC system Quattro Premier XE MS

**Colonne**

Acquity UPLC BEH C18 (Waters®)  
100 mm x 2,1 mm (ID) x 1,7 µm (épaisseur film)

**T° colonne**

40°C

**Phases mobiles**

A : H<sub>2</sub>O (LC/MS grade) - acide formique 0,1 %  
B : acétonitrile (LC/MS grade)

**Gradient phase mobile**

19,5 minutes

Temps (min)	Débit	A (%)	B (%)
0	0.4	85	15
1	0.4	85	15
5.5	0.4	60	40
13	0.4	55	45
15	0.4	45	55
15.1	0.4	5	95
16.5	0.4	5	95
16.6	0.4	85	15
19.5	0.4	85	15

**Injection**

10 µL

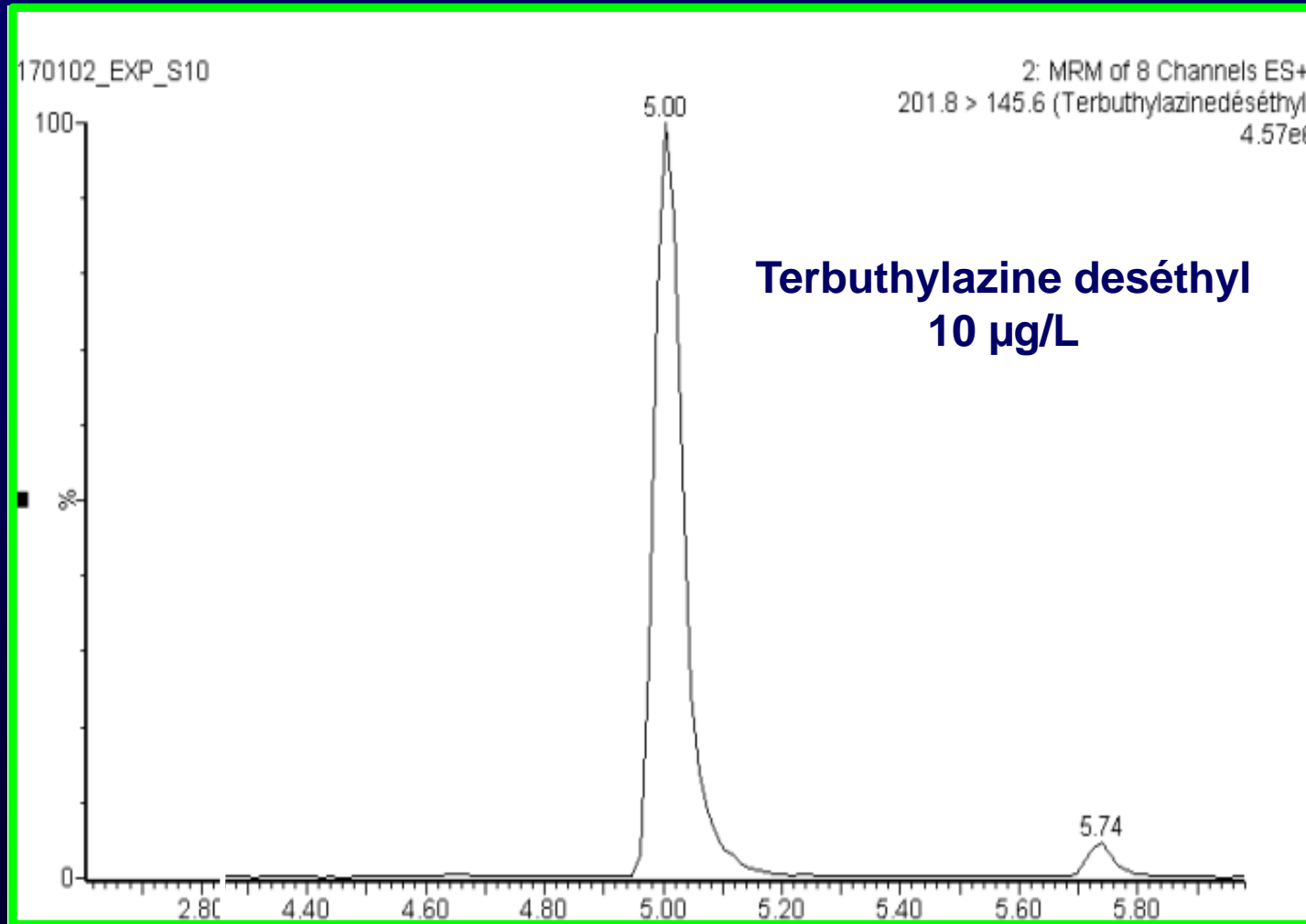
**Conditions MS**

- Capillaire 4 kV
- T° de la source : 120°C - T° désolvatation : 350°C
- Gaz de désolvatation et de cône : N<sub>2</sub> à 800 L/h et 50 L/h
- Gaz de collision : Ar à 0,15 ml/min

# Projet EXPOPESTEN – Etape 3

## Technique LC-MS

### CONDITIONS OPÉRATOIRES





# Projet EXPOPESTEN – Etape 3

## Technique LC-MS TRANSITIONS SUIVIES

Composés	Segment	Temps (min)	Ion parent (m/z)	Ion fille (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
Dimethoate	1	2.5-4	229.6	124.6	20	22
Dimethoate	1	2.5-4	229.6	229.6	20	5

	Segment	Temps (min)	Ion parent (m/z)	Ion fille (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
<b>Terbutylazine desethyl</b>	<b>2</b>	<b>4-6</b>	<b>201.8</b>	<b>145.6</b>	<b>25</b>	<b>15</b>
<b>Terbutylazine desethyl</b>	<b>2</b>	<b>4-6</b>	<b>203.8</b>	<b>147.6</b>	<b>25</b>	<b>15</b>
Metribuzin	2	4-6	201.8	145.6	25	15
Metribuzin D3	2	4-6	201.8	145.6	25	15
Metribuzin D3	2	4-6	201.8	145.6	25	15
Terbuthylazine	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Terbuthylazine	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Terbuthylazine D5	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Terbuthylazine D5	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Linuron	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Linuron	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Linuron D6	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Linuron D6	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Fenpropidine	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Fenpropidine	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Fenpropidine D10	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Fenpropidine D10	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Cypraconazole	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Cypraconazole	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Spiroxamine	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Spiroxamine	3	6-8.9	201.8	145.6	25	15
Propiconazole D3	4	8.9-10.1	200.8	154.8	20	15
Epoxiconazole	4	8.9-10.1	329.8	120.6	25	22
Epoxiconazole	4	8.9-10.1	329.8	122.5	25	22
Boscalide	4	8.9-10.1	342.8	139.6	30	20
Boscalide	4	8.9-10.1	344.8	141.6	30	20
Penconazole	5	10.1-11.6	283.8	69.6	25	15
Penconazole	5	10.1-11.6	285.8	69.6	25	15
Tebuconazole	5	10.1-11.6	307.9	69.6	28	22
Tebuconazole	5	10.1-11.6	309.9	69.6	28	22
Tebuconazole D6	5	10.1-11.6	314.0	71.6	28	22
Tebuconazole D6	5	10.1-11.6	316.0	71.6	28	22
Tetraconazole	5	10.1-11.6	371.8	69.6	32	22
Tetraconazole	5	10.1-11.6	371.8	158.6	32	30
Fenoxycarbe	6	11.6-13.2	301.9	87.5	25	18
Fenoxycarbe	6	11.6-13.2	301.9	115.6	25	12
Propiconazole	6	11.6-13.2	341.8	68.7	30	20
Propiconazole	6	11.6-13.2	341.8	158.6	30	32
Propiconazole D5	6	11.6-13.2	346.9	73.7	30	20
Propiconazole D5	6	11.6-13.2	346.9	160.6	30	32
Difenconazole	7	13.2-16.0	405.9	250.8	32	25
Difenconazole	7	13.2-16.0	407.9	252.8	32	25
Difenconazole D6	7	13.2-16.0	412.0	250.8	32	25
Difenconazole D6	7	13.2-16.0	413.9	252.8	32	25

# Projet EXPOPESTEN – Etape 3

## Technique LC-MS

### PERFORMANCES ANALYTIQUES

Molécule	Standard interne	LLOQ (µg/L)	ULOQ (µg/L)	Justesse		Répétabilité		Reproductibilité	
				Inexactitude (%)		CV (%)		CV (%)	
				à la LLOQ	à la ULOQ	à la LLOQ	à la ULOQ	à la LLOQ	à la ULOQ
Boscalide	Terbuthylazine D5	0,05	20	8,89	6,32	20	9,02	23,41	9,02
Cypraconazole	Linuron D6	0,08	20	-0,74	-0,21	7,7	10,37	25,27	12,44
Difenconazole	Difenconazole D6	0,17	20	2,5	4,7	10	3,73	10	9,94
Dimethoate	Metribuzin D3	0,06	13	-0,74	4,4	20,4	14,1	21,5	14,1
Epoxiconazole	Propyzamide D3	0,17	20	0	4,4	6,5	7,6	17,4	10,1
Fenoxycarbe	Propiconazole D5	0,18	20	-2,5	-0,2	14	11,4	18,4	11,4
Fenpropidine	Fenpropidine D10	0,05	20	2,22	7,56	6,7	4,4	6,7	6,4
Linuron	Linuron D6	0,054	17,9	-20	9,4	22,1	8,5	22,4	14,3
Metribuzin	Metribuzin D3	0,2	20	-18,9	3,9	18,3	4,5	18,3	4,5
Penconazole	Tebuconazole D6	0,4	16	3,5	-5,4	9,4	13,8	10,2	13,8
Propiconazole	Propiconazole D5	0,14	20	-13,3	4,2	6,1	3,7	15,3	10,7
Propyzamide	Propyzamide D3	0,05	20	13,3	13,5	24,5	5,4	24,5	5,4
Spiroxamine	Fenpropidine D10	0,06	10	-8,9	-7,5	0,01	11,5	7,7	11,5
Tebuconazole	Tebuconazole D6	0,05	20	8,9	3,6	10,5	6,4	10,5	10,8
Tetraconazole	Tebuconazole D6	0,07	20	9,6	1	24,7	5,4	24,7	5,4
Terbuthylazine	Terbuthylazine D5	0,05	20	-22,2	1,3	9,4	6,7	12,8	6,7
Terbuthylazine desethyl	Terbuthylazine desethyl D9	0,052	20	-13,3	5,6	14,9	5,4	21,4	10,3

## CONCLUSIONS

- **Validation de trois méthodes utilisant une double extraction.**
- **Performances analytiques satisfaisantes pour 31 pesticides et 6 métabolites OP, à déterminer pour les 10 pesticides en cours de validation.**
- **Nécessité de compléter les méthodes pour permettre l'identification et le dosage des métabolites car les techniques proposées concernent les produits parents et non les métabolites (sauf OP).**
- **Analyse des échantillons biologiques en cours chez 259 enfants.**