



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE,
DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE ET DES AFFAIRES RURALES

Direction générale de l'alimentation Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments Sous-direction de la réglementation, de la recherche et de la coordination des contrôles Bureau de la recherche et des laboratoires d'analyses Adresse : 251, rue de Vaugirard 75 732 PARIS CEDEX 15 Dossier suivi par : Lilian PUECH Tél. : 01 49 55 47 78 Réf. interne :	NOTE DE SERVICE DGAL/SDSSA/SDRRCC/N2003-8141 Date : 13 AOÛT 2003 Classement :
---	---

Date de mise en application : immédiate

Abroge et remplace :

Date limite de réponse :

■ Nombre d'annexes : 2

Degré et période de confidentialité :

Objet : Méthodes de dosage des pesticides organochlorés, pyrèthrinoïdes et PCB (polychlorobiphényles) dans les aliments gras et des pesticides organophosphorés dans le lait entier et la graisse

MOTS-CLES : Méthode d'analyse – pesticides organochlorés – pyrèthrinoïdes – PCB – pesticides organophosphorés

Résumé : La présente note de service référence les méthodes officielles de dosage des pesticides organochlorés, pyrèthrinoïdes et PCB (polychlorobiphényles) dans les aliments gras, d'une part, et des pesticides organophosphorés dans le lait entier et la graisse, d'autre part.

Destinataires	
Pour exécution : - Directeurs départementaux des services vétérinaires - Laboratoires vétérinaires départementaux	Pour information : - Préfets - Inspecteurs généraux de la santé publique vétérinaire - Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires - Directeurs des Ecoles nationales vétérinaires - Directeur de l'Ecole nationale des services vétérinaires - Directeur de l'INFOMA - Directeur général de l'AFSSA - LERHQA, AFSSA site de Maisons-Alfort

J'ai l'honneur de vous faire parvenir les références et protocoles des méthodes d'analyses officielles pour le dosage des pesticides organochlorés, pyrèthrinoïdes et PCB (polychlorobiphényles) dans les aliments gras, d'une part, et des pesticides organophosphorés dans le lait entier et la graisse, d'autre part.

Méthode	Référence
Dosage des pesticides organochlorés, pyrèthrinoïdes et PCB (polychlorobiphényles) dans les aliments gras	AFSSA-LERHQA-CENPOP/01 (Révision 02 - 15 avril 2002)
Dosage des pesticides organophosphorés dans le lait entier et la graisse	AFSSA-LERHQA-CENPOP/02 (Révision 00 - octobre 2002)

Ces méthodes ont été développées par le laboratoire national de référence pour la recherche et le dosage des pesticides (Laboratoire d'études et de recherches sur l'hygiène et la qualité des aliments - LERHQA – AFSSA, site de Maisons-Alfort).

L'adjoint au Directeur Général
Jean-Jacques RENAULT

ANNEXE 1 : DOSAGE DES PESTICIDES ORGANOCHLORES, PYRETHRINOÏDES ET PCB (Polychlorobiphényles) DANS LES ALIMENTS GRAS

Responsables : F. Bordet (Rédacteur), D. Inthavong (Approbateur)

15 avril 2002

Laboratoire d'études et de recherches sur l'hygiène et la qualité des aliments
AFSSA
10, rue Pierre Curie
94704 Maisons-Alfort Cedex

Tél : 01 49 77 27 37
Fax : 01 49 77 26 95

1- AVERTISSEMENT ET PRECAUTION DE SECURITE

Les vapeurs de certains solvants volatils sont très toxiques. Beaucoup de ces derniers pénètrent par la peau. Utiliser un dispositif d'aspiration de fumée efficace pour éliminer les vapeurs dès leur dégagement.

La préparation des solutions de travail contenant des pesticides nécessite la manipulation de substances actives pures ou très concentrées. Eviter tout contact avec la peau et le risque d'inhalation de particules par le port de blouse, de gants, de lunettes et/ou d'un masque.

2- INTRODUCTION

La méthode est destinée à extraire purifier et doser des pesticides organochlorés des pyrèthrinoides et des PCB à partir d'aliments gras. Les trois familles de résidus sont analysées simultanément. Cette méthode constitue un progrès par rapport à la norme NF-EN-1528 ; son champ d'application est élargi à d'autres pesticides organochlorés ainsi qu'à la famille des pyrèthrinoides. Cette méthode propose une technique de préparation nouvelle par rapport à la NF-EN-1528, basée sur la chromatographie liquide-solide en cartouches prêtes à l'emploi (Solid Phase Extraction ou SPE). Les techniques d'extraction de la matière grasse ne sont pas différentes de celles décrites dans la norme ni les techniques de dosage basées sur la chromatographie en phase gazeuse.

3- OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrite permet le dosage de pesticides organochlorés de PCB et de pyrèthrinoides dans le lait liquide, la graisse animale, les poissons et les œufs.

Les pesticides qui peuvent être dosés par cette méthode sont les suivants :

Tableau 1 : liste des pesticides entrant dans le champs d'application de la méthode

Pesticides organochlorés		Polychlorobiphényles
HCB	Endrine	PCB congénères
HCH α	TDE pp'	28
HCH β	DDT op'	52
HCH γ	DDT pp'	101
Heptachlore	Dicofol op'	118
Aldrine	Dicofol	153
Heptachlore-epoxy		138
Oxychlordane		180
Chlordane γ		
DDE op'		Pyrèthrinoides
α Endosulfan (1)		λ Cyalothrine
Chlordane α		Permethrine
DDE pp'		Cyfluthrine
Dieldrine		Cypermethrine
TDE op'		Fenvalerate
		Deltamethrine

(1) le beta endosulfan et l'endosulfan sulfate sont analysés avec les résidus organophosphorés.

4- REFERENCES NORMATIVES

La méthode décrite fait appel à certaines parties de la norme européenne NF-EN-15 28 (1997) Aliments gras - dosage des pesticides et des polychlorobiphényles (PCB). Partie 1 : généralités. Partie 2 : extraction de la matière grasse, des pesticides et des PCB et détermination de la teneur en matière grasse. Partie 3 : méthodes de purification. Partie 4 : détermination, essais de confirmation, divers.

5- PRINCIPE

Cette méthode comprend des techniques d'extraction de la matière grasse, d'extraction des pesticides, des PCB et des pyrèthrinoides ainsi que des techniques de purification pour le lait liquide, la graisse animale, le poisson et les œufs.

Les techniques d'extraction des pesticides de la matière grasse sont issues de la norme NF-EN-1528 partie 2, « extraction par centrifugation cryogénique ».

Pour le lait, l'extraction AOAC de la matière grasse est appliquée (EN 1528 partie 2).

Pour les œufs, la norme NF-EN-1528 ne propose pas d'extraction cryogénique. Cette technique est appliquée dans cette méthode.

En ce qui concerne la purification, la méthode interne utilise une même technique applicable à toutes les matrices. C'est une chromatographie solide-liquide sur cartouche prête à l'emploi (SPE ou Solid Phase Extraction). Deux types de phase sont utilisés successivement : C18 puis Florisil®.

6- REACTIFS ET PRODUITS

Les solutions d'étalonnage ont été fabriquées à partir de solutions concentrées de pesticides. Une solution standard contient 24 pesticides aux concentrations d'environ 20 $\mu\text{g/g}$ pour la majorité des composés (40 $\mu\text{g/g}$ dans le cas du Dicofol op').

Un mélange de PCB contient sept congénères de PCB à environ 10 µg/ml : 28, 52, 101, 118, 153, 138, 180.

Un mélange de six pyrèthrinoïdes est fabriqué à partir de solutions concentrées de deltaméthrine, perméthrine, cyperméthrine, fenvalérate, cyfluthrine, λ cyhalothrine.

Etalon interne, par exemple transnonachlore.

Les solvants utilisés sont de qualité analytique pour chromatographie : acétone, diéthyl éther, éther de pétrole, n-hexane, acétonitrile, méthanol, dichlorométhane.

Le dodécane, est utilisé comme rétenteur des résidus lors des évaporations.

Les cartouches apolaires d'extraction en phase solide sont des cartouches C18 de 1 g.

Les cartouches polaires d'extraction en phase solide sont des cartouches Florisil® de 1 g.

Autres produits réactifs : laine de verre et sable marin, sulfate de sodium anhydre. Filtres papier, azote, hélium.

7- APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire en particulier :

Pour l'extraction de la matière grasse et des résidus :

Centrifugeuse réfrigérée pouvant tourner à 3000 tours par minute.

Evaporateur rotatif avec dispositif de mise sous vide (pompe à eau) et condenseur réfrigéré (éventuellement).

Ampoules à décanter, ballons, et verrerie usuelle de laboratoire

Platine ou bain d'évaporation sous azote.

Pour la purification SPE :

Cuve hermétique d'extraction sous vide pour cartouche, munie d'une fuite d'air. Pompe à vide. Un automate peut être utilisé.

Pour le dosage par Chromatographie en Phase Gazeuse :

Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un injecteur approprié (avec éventuellement un système d'injection automatique), d'un four et d'un détecteur à capture d'électrons.

Les caractéristiques de pré-colonne et de colonne sont présentées à titre d'exemple dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques de pré-colonne et de colonne de chromatographie.

	Pré-colonne	Colonne capillaire
Longueur en m	1.5	50
Diamètre interne en mm	0.32	0.32
Composition pré-colonne	Silice fondue désactivée	
Composition du film		Diméthyle-polysiloxane (100 %)
Epaisseur du film en µm		0.25
polarité		100 % apolaire

Exemple de programmation de la chromatographie, tableau 3.

Tableau 3 : Conditions chromatographiques utilisées

Détecteur	ECD
Gaz vecteur	Hélium
Débit en PSI	23
Gaz additionnel détecteur	Azote
Colonne	Cf tableau 2
Volume d'injection en µl	1
T °C détecteur	320
Programmation injecteur	
T °C initiale	50
Pente en °C / min	150
T °C seuil	250
Durée en min	52
Programmation du four	
T °C initiale	100
Plateau en min	2
Pente en °C / min	7
T °C seuil	220, 10 min
Pente en °C / min	3
T °C seuil	285, 5 min

Les chromatogrammes sont enregistrés et traités par un logiciel d'acquisition et de traitement des données.

8- ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée.

9- MODE OPERATOIRE

9.1- Extraction de la matière grasse

Utiliser l'une des méthodes d'extraction de la matière grasse de la norme NF EN 1528 (partie 2, § 6) :

lait : extraction AOAC, procéder comme en 6.1.1.

graisse animale : procéder comme en 6.4.6.2.

poissons : procéder comme en 6.4.6.1.

œufs : Procéder comme en 6.5.1 (ne pas évaporer totalement le solvant hexane/acétone).

9.2- Extraction des pesticides et des PCB

Procéder à la centrifugation cryogénique décrite en 6.4.1.2. de la norme.

9.3- Purification

La méthode de purification est commune à toutes les matrices.

PURIFICATION SUR CARTOUCHE DE C18 (1g)

Conditionnement : déposer successivement sans assécher la cartouche entre chaque solvant : 5 ml d'éther de pétrole, 5 ml d'acétone, 2 fois 5 ml de méthanol, et laisser s'écouler le méthanol à sec. Reprendre l'extrait par 2ml d'acétonitrile, le déposer sur la cartouche et éluer jusqu'au ménisque. Laisser en contact 3 min au moins. Rincer le tube avec 10 ml d'acétonitrile et les

déposer sur la cartouche. Eluer l'acétonitrile à un débit de 1 goutte/seconde environ. Evaporer l'éluat sous vide à 35 °C environ (en présence de 100 µl de dodécane) et reprendre dans 1 ml d'hexane.

PURIFICATION SUR CARTOUCHE DE FLORISIL® (1g)

Conditionnement : déposer 10 ml d'hexane (éluer jusqu'au ménisque, ne pas assécher la cartouche). Déposer l'extrait obtenu après purification sur cartouche C18 (1 ml) et l'éluer jusqu'au ménisque. Laisser en contact 3 min au moins et éluer par 10 ml d'ether de pétrole/ether éthylique (EP/EE) 98/2, débit 1 goutte/seconde environ. Eluer ensuite par 12 ml EP/EE 85/15, débit 1 goutte/sec (les 2 éluats sont mélangés). Evaporer les éluats à 35°C environ (en présence de 100 µl de dodécane) et reprendre dans 1 ou 2 ml d'hexane. Conserver une partie de cet extrait pour des dilutions éventuelles.

9.4- Analyse chromatographique

Injecter 1 à 2 µl de l'extrait obtenu précédemment en chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur ECD, en présence d'un standard interne (par exemple le transnonachlore).

10- EXPRESSION DES RESULTATS

FORMULE DE CALCUL :

Ht : hauteur du pic

STr : solution de travail

Slnt : standard interne

Tx : taux de récupération ou rendement

Ech : échantillon

C : concentration en ng/ml (ou en ng/g)

M : masse en g

Vol : volume final en ml (ou Masse en g)

Fd : facteur de dilution éventuel

$$\text{Taux de récupération} = \frac{[\text{Ht STr après florisil}] / [\text{Ht Slnt STr après florisil}]}{[\text{Ht STr avant florisil}] / [\text{Ht Slnt STr avant florisil}]} \times 100$$

Les résultats des essais sont calculés par le logiciel qui utilise la formule suivante :

$$\text{quantité de résidu en ng/g} = \frac{\frac{[\text{Ht Ech}]}{[\text{Ht Slnt Ech}]} \times \frac{[\text{C STr}]}{[\text{M Ech}]}}{\frac{[\text{Ht STr}]}{[\text{Ht Slnt STr}]}} \times \text{Vol (ou Masse)} \times \text{Fd}$$

REGLE D'ARRONDISSEMENT

Les règles générales d'arrondissement sont décrites dans les normes NF X 02 003 et NF X 02 006.

Les résultats sont donnés au ng/g, sans décimale,
ou toute autre unité dans un rapport de 10⁻⁹.

ANNEXE 2 : DOSAGE DES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES DANS LE LAIT ENTIER ET LA GRAISSE**Responsables :** F. Bordet (Rédacteur), D. Inthavong (Approbateur)

octobre 2002

Laboratoire d'études et de recherches sur l'hygiène et la qualité des aliments
AFSSA
10, rue Pierre Curie
94704 Maisons-Alfort Cedex

Tél : 01 49 77 27 37
Fax : 01 49 77 26 95

1- AVERTISSEMENT ET PRECAUTION DE SECURITE

Les vapeurs de certains solvants volatils sont très toxiques. Beaucoup de ces derniers pénètrent par la peau. Utiliser un dispositif d'aspiration de fumée efficace pour éliminer les vapeurs dès leur dégagement.

La préparation des solutions de travail contenant des pesticides nécessite la manipulation de substances actives pures ou très concentrées. Eviter tout contact avec la peau et le risque d'inhalation de particules par le port de blouse, de gants, de lunettes et/ou d'un masque.

2- INTRODUCTION

La méthode décrite est destinée à extraire, purifier et doser des pesticides organophosphorés dans le lait entier et dans la graisse animale. Cette méthode constitue une amélioration de la norme NF EN 1528, pour permettre l'analyse de molécules qui n'étaient pas citées dans le champs d'application de cette norme. Cette méthode propose une technique de préparation nouvelle par rapport à la NF EN 1528, basée sur la chromatographie solide-liquide en cartouches prêtes à l'emploi (Solid Phase Extraction ou SPE).

3- OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrite permet le dosage de pesticides organophosphorés dans le lait entier cru ou pasteurisé, l'huile de beurre et dans la graisse d'animaux de boucherie, et de certains pesticides organochlorés dont la polarité se rapproche de celle des pesticides organophosphorés. Les pesticides pour lesquels la méthode a été testée sont :

Tableau 1 : liste des pesticides entrant dans le champ d'application de la méthode

Pesticides organophosphorés	
Phorate	Chlorpyrifos ethyl
Phorate oxon	Chlorpyrifos methyl
Phorate sulfone	
Diazinon	Pesticides organochlorés
Disulfoton	Chlorothalonil
Disulfoton sulfone	Beta endosulfan
Pirimiphos methyl	Endosulfan sulfate
Triazophos	
Methidathion	

4- REFERENCES NORMATIVES

La méthode décrite fait appel à certaines parties de la norme européenne NF-EN-1528 (1997) Aliments gras – dosage des pesticides et des polychlorobiphényles (PCB). Partie 1 : généralités. Partie 2 : extraction de la matière grasse, des pesticides et des PCB et détermination de la teneur en matière grasse. Partie 3 : méthodes de purification. Partie 4 : détermination, essais de confirmation, divers.

5- PRINCIPE

Cette méthode comprend des techniques d'extraction de la matière grasse, d'extraction des pesticides ainsi que des techniques de purification pour le lait entier, l'huile de beurre et la graisse d'animaux de boucherie.

Les techniques d'extraction de la matière grasse sont issues de la norme NF-EN-1528 partie 2, « extraction par centrifugation cryogénique ». Pour le lait cru, le principe est le même que dans la partie 6.1.4.1.2, la mise en œuvre légèrement différente est décrite dans la présente méthode. Pour la graisse animale la partie 6.4.6.2 est utilisée.

En ce qui concerne la purification, la méthode décrite utilise une même technique applicable pour les différentes matrices. C'est une chromatographie solide-liquide sur cartouche prête à l'emploi (SPE ou Solid Phase Extraction), sur une phase apolaire, C18 ou polymère.

6- REACTIFS ET PRODUITS

Les solutions d'étalonnage ont été fabriquées à partir de solutions concentrées de pesticides. Une solution standard contient 11 pesticides organophosphorés aux concentrations d'environ 20 µg/g.

Etalon interne, par exemple le malathion.

Les solvants utilisés sont de qualité analytique pour chromatographie : acétone, n-hexane, acétonitrile, méthanol, dichlorométhane.

Le dodécane, est utilisé comme rétenteur des résidus lors des évaporations.

Les cartouches apolaires d'extraction en phase solide sont des cartouches de silice greffée de type C18 de 1g ou polymère de 500mg.

Autres produits réactifs : laine de verre, sulfate de sodium anhydre. Filtres papier, azote, hélium.

7- APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire en particulier :

Pour l'extraction de la matière grasse et des résidus :

Centrifugeuse réfrigérée pouvant tourner à 3000 tours par minute.

Évaporateur rotatif avec dispositif de mise sous vide (pompe à eau) et condenseur réfrigéré (éventuellement).

Ballons, et verrerie usuelle de laboratoire

Platine ou bain d'évaporation sous azote.

Pour la purification SPE :

Cuve hermétique d'extraction sous vide pour cartouche, munie d'une fuite d'air. Pompe à vide. Un automate peut être utilisé.

Pour le dosage par Chromatographie en Phase Gazeuse :

Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un injecteur approprié (avec éventuellement un système d'injection automatique), d'un four et d'un détecteur spécifique des molécules à doser. Les caractéristiques de pré-colonne et de colonne sont présentées à titre d'exemple dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques de pré-colonne et de colonne de chromatographie.

	Pré-colonne	Colonne analytique
Longueur en m	2	25
Diamètre interne en mm	0,32	0,22
Colonne	Silice fondue désactivée	
Composition du film		5% phényl, 95% méthyl
Epaisseur du film en µm		0,25
Polarité		apolaire

Exemple de programmation de la chromatographie, tableau 3.

Tableau 3 : Conditions chromatographiques possibles

Détecteur	PFPD (par exemple)
Gaz vecteur	Hélium
Débit en PSI	23
Gaz additionnel détecteur	air
Colonne	Cf tableau 2
Volume d'injection en µl	1
T °C détecteur	300
Programmation injecteur	
T °C initiale	50
Pente en °C / min	150
T °C seuil	250
Durée en min	19,5
Programmation du four	
T °C initiale	80
Plateau en min	2
Pente en °C / min	10
T °C seuil	280
Plateau en min	1

Les chromatogrammes sont enregistrés et traités par un logiciel d'acquisition et de traitement des données.

8- ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée.

9- MODE OPERATOIRE

9.1- Extraction de la matière grasse

Lait entier. Extraction de la crème

Si l'échantillon est congelé, le décongeler à température ambiante pendant quelques heures. Prélever 30 ml de lait dans un tube à centrifuger. Centrifuger deux fois 10 minutes à 3000 tpm. Récupérer la crème après chaque centrifugation, y ajouter 10 g de sulfate de sodium anhydre. Extraire la crème avec 30 ml de n-hexane en mélangeant à l'aide d'une spatule. Récupérer la phase organique et la filtrer sur sulfate de sodium dans un ballon pré-pesé. Extraire à nouveau la matière grasse avec 3 fois 10 ml de n-hexane, les filtrer sur le sulfate de sodium puis rincer celui-ci avec 10 ml de n-hexane. Evaporer l'extrait sous vide à 35 °C environ, jusqu'à 1 ml et terminer sous azote. Peser l'extrait. Prélever 500 mg de grasse pour l'étape de centrifugation cryogénique.

Graisse et huile de beurre

Se reporter au § 6.1.6.2 de la norme NF EN 1528.

9.2- Extraction cryogénique

Procéder à la centrifugation cryogénique décrite en 6.4.1.2. de la norme NF EN 1528.

9.3- Purification

La méthode de purification est commune à toutes les matrices. Le choix entre les différents types de cartouches apolaires dépend de la quantité de l'extrait déposée :

- une cartouche de silice greffée de type C18 de 1g a une capacité spécifique de 50 mg ;
- une cartouche polymère de 0.5g a une capacité spécifique de 100 mg.

Le protocole de purification est identique quel que soit le type de cartouche utilisé.

Conditionnement : déposer successivement sur la cartouche et éluer sans assèchement entre chaque solvant : 5 ml de méthanol, 5 ml d'acétone, 5 ml de mélange acétonitrile/dichlorométhane (AN/DCM) 95/5 et éluer jusqu'au ménisque. Reprendre l'extrait obtenu après extraction cryogénique dans 1 ml d'un mélange AN/DCM 95/5. Le déposer sur la cartouche, éluer jusqu'au ménisque, laisser en contact de 3 à 5 min. Eluer par 10 ml de méthanol, à sec à 1 goutte/3 secondes environ. Aspirer pour récupérer le volume retenu par la cartouche. Evaporer l'éluat à 35 °C environ sous un léger courant d'azote en présence de 100 µl de dodécane puis reprendre dans 1 ou 2 ml d'hexane.

9.4- Analyse par chromatographie en phase gazeuse

Injecter 1 à 2 µl de l'extrait obtenu précédemment en chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur spécifique du phosphore, PFPD, FPD ou NPD, en présence d'un étalon interne (par exemple le malathion).

10- EXPRESSION DES RESULTATS**FORMULE DE CALCUL :**

Rendement de purification :

$$Tx = \frac{\left[\frac{[Ht.STr]}{[Ht.SInt.STr]} \right]_{après.C18}}{\left[\frac{[Ht.STr]}{[Ht.SInt.STr]} \right]_{avant.C18}} \times 100$$

Les résultats des essais sont calculés par le logiciel qui utilise la formule suivante :

$$Q = \frac{\left[\frac{[Ht.Ech]}{[Ht.SInt.Ech]} \right]}{\left[\frac{[Ht.STr]}{[Ht.SInt.STr]} \right]} \times \frac{[C.STr]}{[M.Ech]} \times Vol(Masse) \times Fd$$

Ht : hauteur du pic

STr : solution de travail

SInt : standard interne

Tx : taux de récupération ou rendement

Ech : échantillon

C : concentration en ng/ml (ou en ng/g)

M : masse en g

Vol : volume final en ml (ou Masse en g)

Fd : facteur de dilution éventuel

Q : quantité de résidu en ng/g

REGLE D'ARRONDISSEMENT

Les règles générales d'arrondissement sont décrites dans les normes NF X 02 003 et NF X 02 006.

Les résultats sont donnés au ng/g, sans décimale,
ou toute autre unité dans un rapport de 10⁻⁹.