

DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE RAPIDE DU SULFOTEP PAR UPLC-ESI-MS DANS LE CADRE DE LA TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

Auteurs

DIAKITE Aïssata<sup>1,3</sup>  
BOGUI Arnaud M.<sup>2</sup>  
GOULI BI Marc<sup>2</sup>  
BEDI Laetitia A.<sup>3</sup>  
AMESSAN Christian<sup>3</sup>  
N'GUESSAN Jean Marc<sup>4</sup>  
MALAN Anglade<sup>3,5</sup>  
DANO Djédjé S.<sup>1</sup>

Services

1- Laboratoire de Toxicologie et Hygiène Agro-Industrielle (LTHAI). UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologique. Université Félix Houphouët-Boigny, BP V34 Abidjan, Côte d'Ivoire

2- Laboratoire de Chimie-Physique, UFR Sciences des Structures de la Matière et Technologie, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, BP V34, Côte d'Ivoire

3- Laboratoire National de la Santé Publique. 52, Boulevard de Marseille, 18 B.P. 2403 ABIDJAN 18, Côte d'Ivoire

4- Laboratoire de Biochimie Alimentaire et Technologies des Produits Tropicaux, UFR STA, Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

5- Laboratoire de Chimie Analytique, Chimie Minérale et Chimie Générale. UFR Sciences Pharmaceutiques – Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan Cocody, B.P. V34, Côte d'Ivoire.

Correspondance

DIAKITE A.,  
16 BP 1086 Abidjan 16,  
Tél : + 225 47 21 21 21,  
Email : a\_diak@hotmail.fr

RÉSUMÉ

Le sulfotep est une impureté hautement toxique contenue dans les formulations de chlorpyrifos, insecticide organophosphoré largement utilisé en Côte d'Ivoire. L'objectif de notre étude était de valider une méthode rapide, sensible et fiable de détection et de quantification du sulfotep par Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse.

L'identification du sulfotep a été réalisée par détermination du temps de rétention à partir d'un standard en mode MS Scan, puis l'extraction du spectre de masse en mode SIR a permis de confirmer la masse du sulfotep et de quantifier la molécule à partir d'une droite d'étalonnage. La validation a été réalisée selon la procédure du Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec.

La méthode mise au point a démontré une très bonne linéarité ( $R^2 > 0,99$ ) pour une gamme de concentrations allant de 0,5 à 200 µg/L. La fidélité était acceptable (CV = 8,95%) et l'exactitude était excellente avec un recouvrement de 98,4%. La limite de détection était de 1 µg/L et la limite de quantification égale à 2 µg/L. Au vu de ces performances, notre méthode pourrait aisément s'appliquer dans le domaine réglementaire pour le contrôle de la teneur en sulfotep dans les formulations à base de chlorpyrifos commercialisées en Côte d'Ivoire.

Mots-clés : Chlorpyrifos-éthyl ; Sulfotep ; Validation de méthode ; UPLC-ESI-MS ; Domaines d'application.

ABSTRACT

*Sulfotep is a highly toxic impurity present in chlorpyrifos which is an organo phosphorus insecticide widely used in the agricultural field in Côte d'Ivoire.*

*The aim of our study was to develop and validate a fast, sensitive and reliable method for detection and quantification of sulfotep using high resolution liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-ESI-MS). Sulfotep was first identified by the determination of the retention time ( $T_r$ ) of the molecule after injection of a diluted standard operating in MS Scan mode. Then, the mass spectrum obtained in SIR mode allowed*

to confirm the monoisotopic mass of sulfotep ( $m/z$ ) and to quantify it using a calibration curve. Analytical performances parameters for validation study were determined using the method described by the Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec.

Our results indicated that the linearity of the calibration curve was good with  $R^2$  greater than 0.99 and the curve was tested to be linear between  $0.1 \mu\text{g/L}$  and  $200.0 \mu\text{g/L}$ . The precision of the quantification method was acceptable as confirmed by a  $RSD = 8,95\%$ . The accuracy was excellent with a mean recovery percentage of  $98,4\%$ . Finally, the limit of detection (LOD) was  $1 \mu\text{g/L}$  and the limit of quantification (LOQ) was  $2 \mu\text{g/L}$ . In the light of these analytical performances, our method could readily apply to the national regulatory field for the determination of the level of sulfotep as relevant impurity in chlorpyrifos formulations marketed in Côte d'Ivoire. Also, the method could be expanded to environmental and occupational monitoring, especially in cottonfield workers.

**Keywords :** Chlorpyrifos-ethyl ; Sulfotep ; Method validation ; UPLC-ESI-MS ; Regulatory and environmental applications.

## INTRODUCTION

Les pesticides encore désignés sous le terme de produits phytosanitaires sont des substances destinées à éliminer les ennemis des cultures et des récoltes. Ces pesticides occupent une place toute particulière parmi les nombreux produits chimiques auxquels les populations pourraient être exposées, car ils sont délibérément disséminés dans l'environnement par l'homme dans le but de protéger les cultures ou combattre des vecteurs de maladie. Les pesticides organophosphorés, molécules organiques de synthèse, utilisés essentiellement comme insecticides, occupent de nos jours une place de choix dans l'arsenal des pesticides disponibles en Côte d'Ivoire. En effet, du fait de leur faible rémanence, les pesticides organophosphorés ont remplacé progressivement les pesticides organochlorés très persistants dans l'environnement et très toxiques pour l'humain (Moses, 2010 ; Singh, 2016). Parmi les pesticides organophosphorés homologués en Côte d'Ivoire, l'on retrouve le chlorpyrifos-éthyl ( $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$ ) utilisé dans l'agriculture intensive du coton et du palmier à huile, de la banane et des cultures maraîchères et vivrières (Ministère de l'Agriculture, 2016). Cependant, les différentes formulations contenant le chlorpyrifos-éthyl contiennent également une impureté pertinente, le sulfotep ( $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_5\text{P}_2\text{S}_2$ ), dont la teneur est strictement réglementée à  $0,3\%$  (FAO, 2004). En effet, le sulfotep possède une toxicité hautement plus élevée que le chlorpyrifos par voie orale, dermale et par inhalation (FAO/OMS, 2016). La dose létale par voie orale du sulfotep est de  $5 \text{ mg/kg}$  de poids corporel (pc), alors que celle du chlorpyrifos est de  $229 \text{ mg/kg pc}$  (FAO/OMS, 2016). En conséquence, il apparaît très important de s'assurer que les teneurs en sulfotep dans les formulations de chlorpyrifos commercialisées en Côte d'Ivoire sont conformes aux normes en vigueur. En outre, la surveillance des niveaux de sulfotep dans l'environnement, la chaîne alimentaire et chez les humains constitue une priorité dans le cadre de la prévention des risques sanitaires liés à l'usage répété des pesticides organophosphorés.

L'objectif de notre travail était de développer et de valider une méthode rapide, fiable et sensible d'identification et de quantification du sulfotep par UPLC-ESI-MS pour des applications en toxicologie environnementale.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Réactifs et standards

- Méthanol grade HPLC (pureté 99,9%) obtenu auprès de LiChrosolv®
- Acide formique grade analytique (pureté 98-100%) de Merck®
- Eau ultra pure fournie par un système milli-Q integral 5 pour purification d'eau fabriqué par MerckMillipore™
- Mix de pesticides organophosphorés (EPA 8270), 1×1ml, 2000 µg/mL contenant du sulfotep, préparé dans de l'hexane : acétone (80 : 20), acheté auprès de Supelco (USA)(lot no XA 10626V – 4846S)

### 2. Préparation des solutions de travail

La solution standard (Mix EPA 8270) a été diluée avec un mélange méthanol : eau (50 : 50) afin d'obtenir une solution mère de sulfotep (SM) à 10 µg/mL qui a été utilisée pour la réalisation de la gamme d'étalonnage.

### 3. Préparation de la gamme d'étalonnage

À partir de la SM à 10 µg/mL soit 10 000 µg/L, une gamme de solutions filles (SF) a été préparée par dilutions successives pour obtenir des concentrations décroissantes de 200, 100, 50, 2, 1 et 0,5 µg/L.

### 4. Conditions d'analyse

Toutes les analyses ont été réalisées au Laboratoire National de la Santé Publique à Abidjan d'Août à Novembre 2017.

#### *Conditions chromatographiques*

Les analyses chromatographiques ont été réalisées à l'aide d'un système Acquity UPLC-MS de Waters équipé d'un système de pompes binaires (Intelligent Intake Valve), d'un gestionnaire d'échantillons (96 positions) et d'un gestionnaire de colonnes avec four intégré. La colonne était une BEH C18 (1.7 µm, 2.1 x 50 mm). La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une phase mobile aqueuse composée de méthanol : eau (2 : 98) avec de l'acide formique 0,1% (phase A) et d'une phase mobile organique composée de méthanol 100% + acide formique 0,1% (phase B) à un débit de 0,45 ml/min. La durée d'analyse était de 10 minutes et le volume d'injection de 10 µL.

#### *Conditions spectrométriques*

Les analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées à l'aide d'un détecteur à spectrométrie de masse Triple Quadripole TQD (Waters). La détection s'est faite en mode électrospray (ESI) et en mode ion positif (MH<sup>+</sup>). L'acquisition des données a été réalisée à l'aide du logiciel MassLynx (version 4.1). Les paramètres de la source ont été optimisés en mode infusion : Tension du capillaire 3 kV; Tension de cône 30V; T°C source 120°C; T°C de désolvatation 450°C; débit de désolvatation 1000 L/h.

## 1. Développement et optimisation de la méthode d'analyse

Dans un premier temps, nous avons identifié le sulfotep par la détermination de son temps de rétention ( $T_r$ ) et par la confirmation de sa masse molaire monoisotopique ( $m/z$ ) respectivement en modes MS Scan (50 à 400 amu) et SIR (Single Ion Recording) à l'aide d'une solution standard de sulfotep diluée à 10  $\mu\text{g/L}$ . Le gradient d'élution et la température de la colonne ont été optimisés pour obtenir des pics chromatographiques avec la meilleure résolution et une intensité optimale.

## 2. Validation de la Méthode

La validation de notre méthode était basée sur la procédure pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie du Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ, 2015).

### *Linéarité*

Pour la détermination de la linéarité, les dilutions des standards de sulfotep aux concentrations de 0,5; 1; 2; 50; 100 et 200  $\mu\text{g/L}$  ont été injectés en mode SIR. Le coefficient de détermination  $R^2$  a été évalué afin d'apprécier la qualité de la droite d'étalonnage

### *Justesse et précision*

La justesse de notre méthode a été évaluée par injection d'un standard de concentration connue (50  $\mu\text{g/L}$ ) en triplicata ( $n = 3$ ). La différence entre la concentration théorique du standard et celle mesurée à partir de la courbe de calibration rapportée à la concentration théorique détermine la justesse. La répétabilité de la méthode exprimée par le coefficient de variation (CV), a été évaluée à partir de l'analyse des 3 réplicats.

### *Limite de détection et limite de quantification*

Elles ont été déterminées à partir des chromatogrammes obtenus pour chaque dilution de la gamme d'étalonnage. La limite de détection (LD) correspondait à la concentration pour laquelle le rapport signal-sur-bruit (S/N) était supérieur ou égal à 3. La concentration pour laquelle le S/N était supérieur ou égal à 10 correspondait à la limite de quantification (LQ).

## RÉSULTATS

### 1. Identification du sulfotep

Trois injections successives d'une solution mère de sulfotep à 10  $\mu\text{g/ml}$  en mode MS Scan (balayage : 50 à 400 amu) ont permis d'identifier le pic du sulfotep à  $T_r = 2,93$  min (Figure 1). Les temps de rétention étaient reproductibles sur 3 injections.

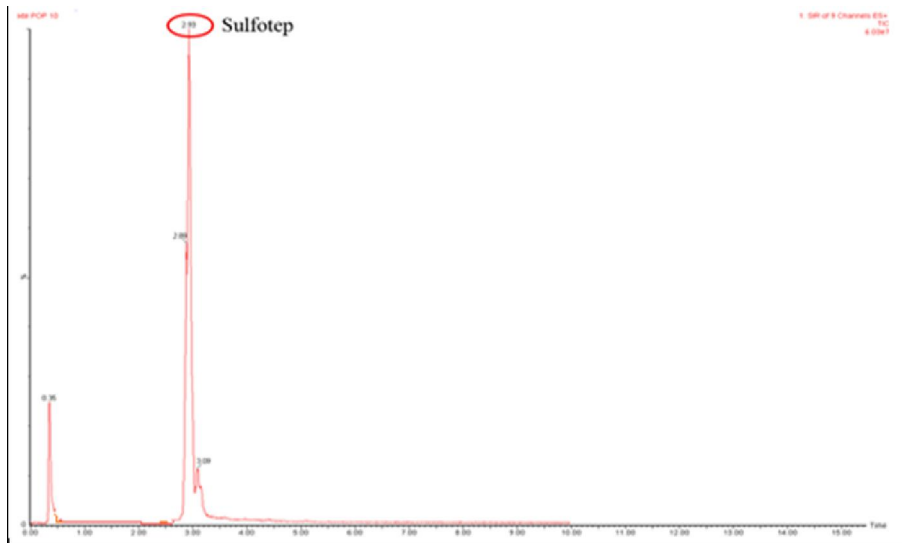


Figure 1 : Chromatogramme obtenu après injection d'un standard contenant du sulfotep à 10 µg/L en mode MS Scan par UPLC-ESI-MS

L'extraction du spectre de masse à partir du chromatogramme en mode SIR a permis de confirmer qu'il s'agissait bien du sulfotep grâce à sa masse molaire monoisotopique ( $m/z = 323,0$ ) comme indiqué sur la **figure 2**.

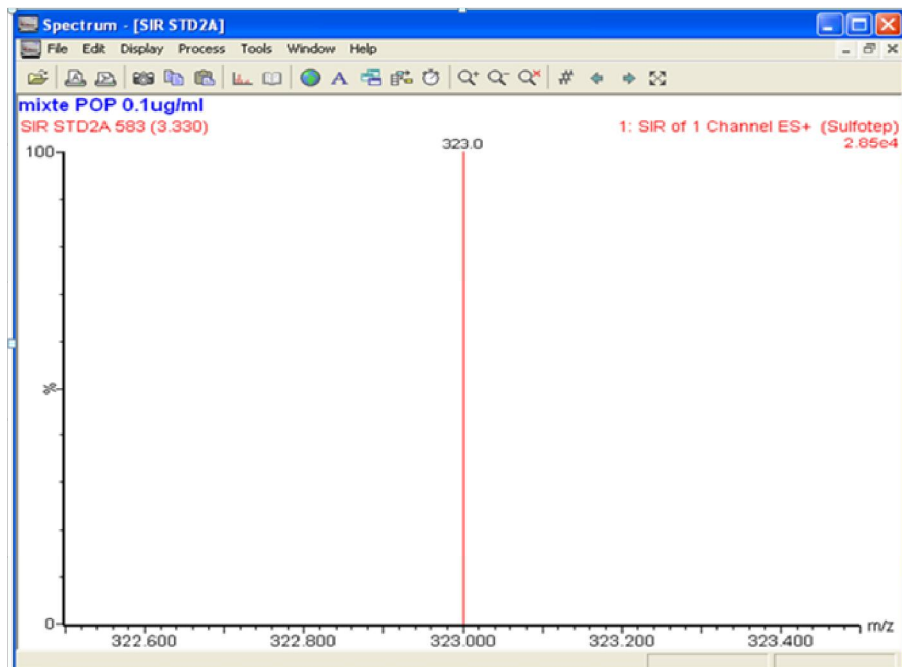


Figure 2 : Spectre de masse extrait à partir du pic chromatographique du sulfotep (Tr : 2,93 min)

## 2. Optimisation des paramètres chromatographiques

La programmation du gradient d'éluion retenue après plusieurs séquences d'optimisation était la suivante : A (80%) / B (20%) 1 min, A (50%) / B (50%) 2 min, A(20%) / B (80%) 7 min. Le temps d'analyse total était de 10 minutes. La température de colonne optimale retenue était de 40°C après test d'une gamme de températures allant de 25 à 45°C. La **figure 3** présente un chromatogramme du sulfotep à la concentration de 50 µg/L avec les paramètres optimisés en mode SIR et MH<sup>+</sup>.

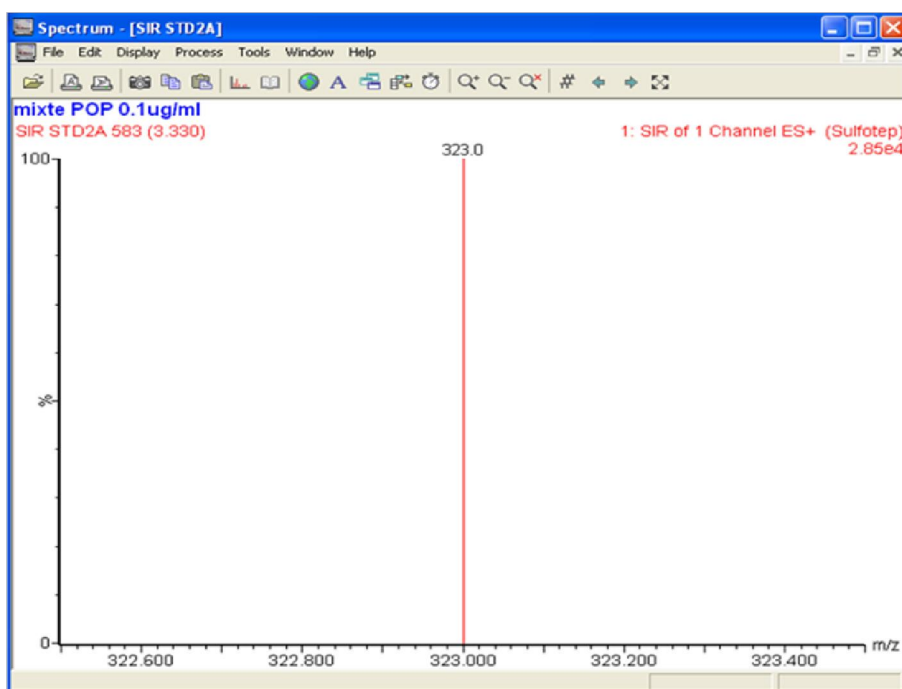


Figure 3 : Chromatogramme obtenu après injection d'un standard de sulfotep à 50 µg/L en mode SIR

## 3. Validation de la méthode

Le domaine de linéarité de notre méthode était compris entre 0,5 et 200 µg/L pour le sulfotep et la linéarité exprimée par le R<sup>2</sup> était de 0,9907 (**figure 4**). La limite de détection (LD) déterminée par le rapport signal-sur-bruit était de 1 µg/L et la limite de quantification (LQ) de 2 µg/L pour le sulfotep. La justesse et la précision de la méthode instrumentale ont été évaluées pour une concentration de 50 µg/L. La justesse était de 98,4%, alors que la fidélité exprimée par le coefficient de variation était de 8,95 %.

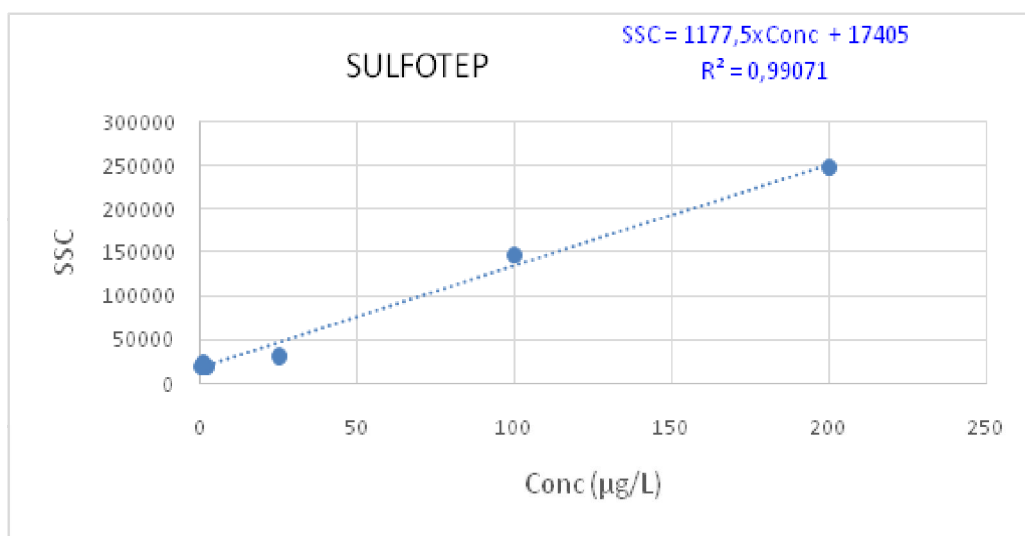


Figure 4 : droite de calibration du sulfotep

## DISCUSSION

Le sulfotep constitue une impureté pertinente qui se forme au cours du procédé de formulation du chlorpyrifos, mais qui peut également se former par dégradation photochimique à partir d'insecticides thiophosphorés incluant le chlorpyrifos (Plimmer, 2001; Emara, 2010). Il s'agit d'une impureté très toxique, relativement stable et capable de s'accumuler dans l'environnement et d'entraîner des problèmes sanitaires et écologiques imprévisibles (Tahany et al, 2015). Dans le cadre de la surveillance des risques sanitaires et environnementaux en Côte d'Ivoire, nous avons initié une procédure de développement d'une méthode instrumentale de détection et de quantification du sulfotep par UPLC-ESI-MS. La méthode que nous avons développée a montré une bonne linéarité ( $R^2 > 0,99$ ) pour une gamme de concentrations relativement étendue allant de 0,5 à 200 µg/L. La fidélité de notre méthode analytique était acceptable et l'exactitude quant à elle était excellente. La méthode mise au point permettait de détecter le sulfotep à partir d'une concentration de 1 µg/L correspondant à la limite de détection (LD), alors que la limite de quantification (LO) était de 2 µg/L. Cette limite de détection est largement en dessous des 0,003 mg/ml obtenus par Plonka (2016) qui a validé une méthode de détermination du sulfotep par CPG-FID dans des formulations commerciales de chlorpyrifos (Plonka et al, 2016). En plus, notre méthode a l'avantage d'être rapide avec un temps d'analyse de seulement 10 minutes. Les performances analytiques observées à l'issue de la validation de notre méthode, permettent d'envisager son application dans divers domaines.

Premièrement, la méthode pourrait s'appliquer dans un cadre réglementaire pour le contrôle du sulfotep en tant qu'impureté majeure dans le processus d'homologation conduit par le Ministère de l'Agriculture en Côte d'Ivoire (MINAGRI). La FAO et l'OMS recommandent que le niveau de sulfotep dans les formulations de chlorpyrifos ne dépasse pas 0,3% afin de protéger la population des risques d'intoxication (FAO, 2008). Toutefois, à l'heure actuelle l'évaluation des dossiers de demande ou de renouvellement des homologations pour les différentes formulations de chlorpyrifos,

n'exige pas la caractérisation ni le dosage du sulfotep. À titre d'exemple, en Côte d'Ivoire le chlorpyrifos est homologué pour le PYRINEXQUICK 324 EC (Chlorpyrifos-éthyl 300 g/L + Deltaméthrine 24 g/L) utilisé dans la culture du coton. La teneur en sulfotep ne devrait donc pas dépasser 0,9 g/L dans cette formulation et la méthode que nous avons validée permettrait aisément de quantifier ce niveau d'impureté après extraction par sonication. Ambrus et collaborateurs (2003) ont montré que certaines formulations de chlorpyrifos produites en Asie pouvaient contenir jusqu'à 17% de sulfotep (Ambrus, 2003). Ces pesticides en provenance de l'Asie pourraient être introduits légalement ou illégalement sur le territoire ivoirien, d'où l'importance de disposer d'une méthode de dosage permettant l'application de la réglementation au niveau national. Il convient, en outre, de préciser que le sulfotep (en tant que pesticide) fait partie de la liste des pesticides interdits conformément à l'article 7.5 du code de conduite de la FAO portant interdiction des substances présentant un risque inacceptable (FAO/OMS, 2010). Ce pesticide est considéré comme obsolète, d'où l'intérêt de notre méthode afin d'identifier cette substance en cas d'utilisation illicite dans notre pays.

Le second domaine d'application de notre méthode serait celui de l'évaluation de l'impact environnemental de l'utilisation du chlorpyrifos pour la culture intensive du coton. En effet, la Côte d'Ivoire est le troisième producteur africain de coton avec une production cotonnière prévisionnelle de 350,000 tonnes pour la campagne 2017/2018. Le dosage du sulfotep dans les eaux souterraines pourrait servir de marqueur de contamination des eaux due à l'activité agricole intensive dans les plantations de coton.

Enfin, la méthode développée pourrait également s'appliquer dans le cadre de la surveillance biologique de l'exposition des ouvriers agricoles dans les champs de coton. Ce volet relève de la toxicologie professionnelle et aurait pour objectif de détecter les niveaux de sulfotep dans les urines des épandeurs de pesticides, notamment ceux qui manipulent des formulations à base chlorpyrifos. La méthode que nous avons mis au point pourrait être appliquée après hydrolyse de l'urine par la bêta-glucuronidase et extraction sur des cartouches CLEAN SCREEN FAST®(200mg/3ml) ou par la méthode QuEChERS (Anastassiades, 2003).

## CONCLUSION

La méthode de détermination du sulfotep par UPLC-ESI-MS que nous avons développée a démontré de très bonnes performances analytiques dans l'optique de son application au dosage du sulfotep dans différentes matrices aussi bien dans le domaine réglementaire, environnemental et de la surveillance biologique des travailleurs agricoles. Les prochaines étapes de notre travail viseront à réaliser un contrôle du niveau de sulfotep dans les différentes formulations de chlorpyrifos homologuées et commercialisées en Côte d'Ivoire.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leurs sincères remerciements à la Direction et au personnel du Laboratoire National de la Santé Publique de Côte d'Ivoire (LNSP-CI) pour leur contribution financière et technique à la réalisation de ce travail.

## CONFLITS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). (2013). *Évaluation des risques liés aux résidus de pesticides dans le beau de distribution : contribution à l'exposition alimentaire totale*. ANSES, Maisons-Alfort.
- Ambrus, A., Hamilton, D., Kuiper, H., & Racke, K. (2003). Significance of impurities in the safety evaluation of crop protection products. *Pure Appl. Chem*, 75, 937-973.
- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbauer, D., Schenck, F. (2003). Fast and easy multi residue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int.*, 86, 412-431.
- Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAQ). (2015). Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie. Disponible sur le site : [www.caeq.gouv.qc.ca/accréditation/pala/DR12VCM\\_protocole\\_val\\_chimie.pdf](http://www.caeq.gouv.qc.ca/accréditation/pala/DR12VCM_protocole_val_chimie.pdf), consulté le 17 décembre 2017.
- Emara, O.M.Y., Abd-El-Aziz, S.A. (2010). Effect of heat, Direct sun light and UV-Rays on stability of some Chlorpyrifos formulations with emphasis to their content of Sulfotep. *Nature and Sciences*, 8 (12) : 229-233.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2004). FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides :Chlorpyrifos. 46 p.
- FAO/WHO joint Meeting on Pesticides Specifications (JMPS). (2016). Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. FAO and WHO. Dr R. Yadav/WHOPES, 292p.
- FAO/OMS. (2010). Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides: Directives pour l'homologation des pesticides. FAO/OMS, 21p.
- Freire, C., Koifman, R., Sarcinelli, P., Simoes, R. A., Clapauch, R., Koifman, S. (2013). Long-term exposure to organochlorine pesticides and thyroid status in adults in a heavily contaminated area in Brazil. *Environmental Research*, 127, 7-15.
- Ministère de l'Agriculture République de Côte d'Ivoire (MINAGRI). (2016). Liste des pesticides homologués et autorisés en Côte d'Ivoire. *Rapport de la Direction Générale des Productions et de la Sécurité Alimentaire*. 78 p.
- Moses, V., Peter, J. V. (2010). Acute intentional toxicity: endosulfan and other organochlorines . *Clinical Toxicology*, 48 (6): 539-544.
- Plimmer, J. R. (2001). *Handbook of Pesticide Toxicology, 2nd edition*. Academic Press, pp. 95-107.
- Plonka, M., Walorczyk, S., Miszczyk, M., Kronenbach-Dylong, D. (2016). Simultaneous gas chromatographic determination of chlorpyrifos and its impurity sulfotep in liquid pesticide formulations. *J Environ Sci Health B*, 51 (11) : 736-41.
- Singh, Z., Kaur, J., Kaur, R., & Hundal, S. S. (2016). Toxic effects of organochlorine pesticides: A review. *American Journal of BioScience*, 4(3-1), 11-18.
- Tahany, G., Hala, M., & El-Hadek, M. (2015). Physicochemical Properties of Ten Commercial Chlorpyrifos Emulsifiable Concentrate Formulations and their Biological Effects on Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) . *J. Biol. Chem. Research*, 32(2), 497-509.