

**INSTALLATION D'UNE UNITE D'ANALYSES
DE RESIDUS DE NEMATICIDES
AU LABORATOIRE DE NEMATOLOGIE
ORSTOM - DAKAR**

PANSU Marc
Laboratoire
"Comportement des sols cultivés"
ORSTOM - MONTPELLIER

JACOB Yves
Laboratoire de Nématologie
ORSTOM - DAKAR

INSTALLATION D'UNE UNITE D'ANALYSES
DE RESIDUS DE NEMATICIDES
AU LABORATOIRE DE NEMATOLOGIE ORSTOM DAKAR.

M. PANSU et Y. JACOB

RESUME

Ce texte présente l'unité d'analyse de résidus de nématicides mise en place au laboratoire de nématologie de DAKAR entre le 3 et le 31 Mai 1988. Cette unité, maintenant fonctionnelle, comprend un ensemble pour l'extraction de dibromochloropropane (DBCP) dans les sols et les eaux et le dosage des extraits par chromatographie en phase gazeuse à détection par capture d'électrons.

Le principe de la détection est rappelé afin de situer le type de détecteur de troisième génération installé.

Nous décrivons les problèmes techniques spécifiques aux pays en voie de développement rencontrés dans l'alimentation électrique et en gaz et les solutions que nous avons retenues.

De même, nous insistons sur les précautions d'emploi, les tests et l'entretien associés à l'utilisation prolongée de ce détecteur très sensible.

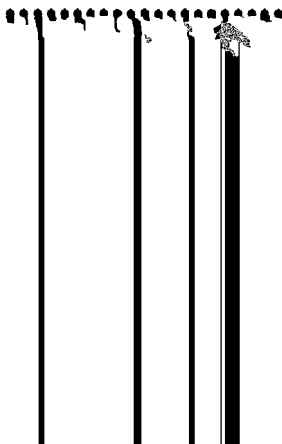
La partie analytique comprend les protocoles chromatographiques et d'extraction chimique mis au point antérieurement à BONDY ainsi que les résultats des premiers tests et essais à DAKAR.

L'étude de l'étalonnage indique une bonne linéarité pour des gammes de DBCP entre 0 et 100 ng/ml, une faible influence du courant d'alimentation du détecteur hors limite de saturation et une bonne reproductibilité au cours du temps.

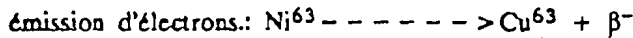
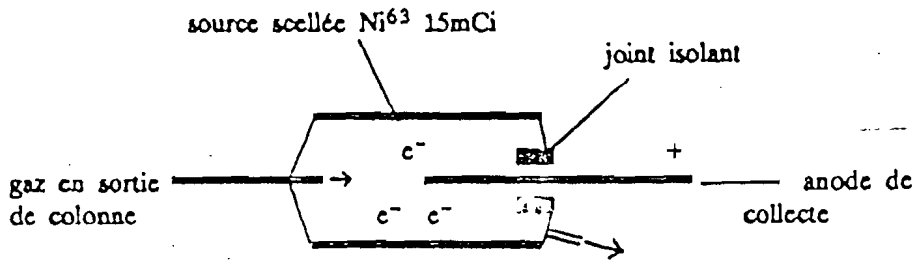
La limite de détection permet d'envisager l'étude de résidus dans les sols au moins jusqu'à un millième des doses courantes utilisées.

Les premiers résultats sur des sols du laboratoire ou prélevés sur des champs traités depuis plus d'un an indiquent une possibilité de contamination de certains matériels du laboratoire et nous indiquons les précautions nécessaires à l'étude des résidus plus de trois à quatre mois après traitements.

Un protocole est également présenté pour le dosage du dibromure d'éthylène (EDB) simultanément au DBCP. L'unité analytique peut d'ailleurs être étendue à tous les résidus de pesticides halogénés.

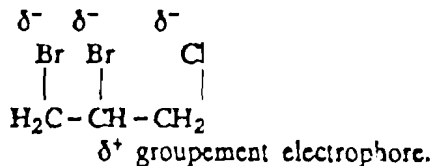


I. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE A DETECTION PAR CAPTURE D'ELECTRONS : PRINCIPE DU DETECTEUR ET EVOLUTION HISTORIQUE



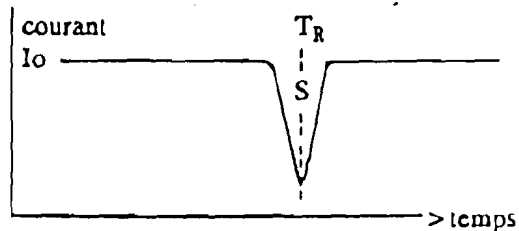
1e. Génération.

On impose une tension positive à l'anode qui collecte les électrons. En l'absence de capture d'électrons (gaz vecteur seul) le courant est maximum. La détection est sensible aux groupements électrophores des molécules qui en possèdent. Elle est donc sélective. Les molécules polaires (composés halogénés) : comportent des charges positives constituant des groupements électrophores.



Les électrons émis par la source sont captés par les groupements électrophores. A l'arrivée d'un tel produit on a donc une brusque diminution du courant et un pic de détection.

I_0 = courant de repos
 T_R = temps de rétention/colonne
 S = surface du pic qui doit être proportionnelle à la quantité injectée



D'autres molécules sont susceptibles de capter des électrons, par exemple selon un mécanisme d'ionisation :



Les ions positifs formés sont électrophores : c'est le cas de la détection de N_2O . Par contre le détecteur ne réagira pas aux nombreux composés organiques moins polaires.

2e. Génération.

La chambre de capture renferme un nuage électronique et un nuage moléculaire. La probabilité de capture électronique par les molécules conditionne la sensibilité. Elle est maximum lorsque les énergies cinétiques de ces molécules et des électrons sont voisines. Dans la première génération les électrons sont accélérés en permanence par le champ de l'anode. Leur vitesse est grande devant celle des molécules et la sensibilité s'en trouve réduite.

Pour réduire l'énergie des électrons la deuxième génération de détecteurs comportait une alimentation de l'anode non plus continue mais pulsée avec un réglage manuel de la fréquence à des pulsations entre 10 μ s et 500 μ s. Un détecteur de ce type a été utilisé à l'ORSTOM BONDY pour la mise au point et la réalisation des premières analyses de DBCP dans les sols

3e. Génération.

Lorsque des molécules électrophores arrivent dans la chambre, la brusque diminution du courant permet leur détection mais engendre aussi une forte baisse de la densité électronique. Lorsque la teneur des molécules augmente on obtient un déficit d'électrons dans la chambre ou saturation du signal.

La 3ème génération de détecteur à capture d'électrons vise à améliorer la linéarité (en fonction de la concentration) et le rapport signal/bruit en maintenant constant le courant qui traverse la chambre et donc la densité du nuage électronique.

Lorsqu'une molécule électrophore traverse la chambre, une action sur la fréquence de pulsation permet de ramener le courant du détecteur à la valeur fixée par la consigne.

La variation appliquée à la fréquence convertie en voltage est proportionnelle à la quantité de molécules électrophores.

Le détecteur que nous avons installé fait partie de cette 3ème génération.

II. INSTALLATION DU DETECTEUR.

1. Le chromatographe.

Il s'agit d'un appareil DELSI série 330 équipé anciennement de deux détecteurs à ionisation de flamme. Ce modèle n'est plus fabriqué actuellement par DELSI mais son équipement à capture d'électrons pouvait être assuré par cette maison. Considérant le bon état du chromatographe cette solution avait été retenue (BAUJARD et PANSU, 1987).

- La séparation des circuits de régulation et de puissance dans les modules de chauffages régulés présente un risque.

En conséquence la solution finalement retenue se résume à :

- Branchement sur un onduleur Imunelec MS 300 * des circuits d'amplification intégration.
- Branchement sur une alimentation stabilisée 1KVA des autres circuits.

3. Alimentation gaz vecteur.

Le détecteur à capture d'électrons nécessite pour son bon fonctionnement une alimentation supérieure à 15 ml/mn soit en mélange Argon/Méthane soit en azote très pur.

Dans le cas d'un travail avec colonne capillaire il faut une alimentation complémentaire en gaz vecteur. Dans notre cas de travail avec une colonne remplie, l'azote gaz vecteur suffit à l'alimentation du détecteur.

Celui-ci est très sensible à la pollution en amont et à l'oxydation. L'azote à employer doit être au moins de qualité C (Air liquide). Une bouteille commandée depuis février n'étant toujours pas livrée nous avons dû commencer le travail avec une bouteille d'azote U.

De même il serait préférable d'utiliser en sortie de bouteille un détendeur inox à soufflet métallique. Ce type de détendeur n'étant pas disponible à Dakar, nous avons utilisé un détendeur à membrane qui présente des risques : porosité, contamination.

Les tuyaux plastiques ont été remplacés par des tuyaux inox "1/8" nettoyés et dépassivés (chauffage au rouge sombre sous courant d'azote) avec raccords swagelock en laiton. La longueur des tuyaux entre le détendeur et le chromatographe a été réduite et nous avons intercalé dans l'ordre :

- Une cartouche inox contenant du tamis moléculaire 13 X régénéré 3 h à 350°C sous courant d'azote. Cette cartouche sert à absorber les impuretés organiques de l'azote.
- Une cartouche OXYSORB pour retenir les traces d'oxygène et d'eau responsables de l'oxydation du détecteur. Cette cartouche doit être changée après 2 à 3 bouteilles d'Azote C. Deux recharges sont actuellement disponibles.

L'étanchéité de tous les raccords a été vérifiée mais doit être régulièrement contrôlée avec de l'eau savonneuse. Les septums d'injection ont été conditionnés à 280°C pendant 3 h puis soigneusement essuyés.

III. MISE EN ROUTE DU DETECTEUR.

1. Précautions d'emploi.

Ne jamais chauffer le détecteur sous atmosphère oxydante. On laisse passer l'azote 1 h ou 2 avant de mettre le chauffage. La colonne a été conditionnée 1 journée à 230°C sous azote avant d'être branchée sur le détecteur. En même temps, ce dernier a été mis sous courant d'azote par l'intermédiaire d'un tuyau inox branché sur le 2e injecteur pour les premiers tests.

2. Tests du détecteur.

Deux paramètres sont surtout importants pour tester le bon fonctionnement du détecteur et maintenir une sensibilité constante :

- I₀ = courant spontané en l'absence de polarisation. Ce courant doit normalement rester négatif. Il peut devenir instable en cas de fuites en amont du détecteur et positif en cas d'oxydation de la source.

- I_{max} = courant maximum que peut délivrer la source de Ni^{63} . Il diminue lorsque le détecteur est sale.

Pour maintenir une sensibilité constante le courant doit être réglé selon un pourcentage constant I_{ref} de la différence $(I_{max} - I_0)$ soit :

$$I = I_{ref} (I_{max} - I_0) + I_0 \quad (1)$$

- colonne : OV 225 à 3% sur chromosorb WHP, 2,1 m x 2 mm ϕ int.
- température : - colonne : 110 °C
 - détecteur : 250 °C
 - injecteur : 180 °C
- gaz vecteur : N₂ - pression entrée 2.2 bar
- Iref = 60%, atténuation 1 x 8
- injection : 1 μ l.

2. Gamme étalon DBCP.

- Préparation

- Préparation d'une solution de DBCP à 1mg/ml
soit 50 μ l/100 ml de DBCP technique (à 96% et d = 2,08) dans 100 ml d'hexane à 1%
d'acétone.
- Dilution 1000 fois dans l'hexane pour obtenir la solution mère à 1 μ g/ml de préparation de
la gamme étalon entre 1 et 100 ng/ml.

teneur
DBCP ng/ml 0 1 2 5 10 50 100

volume solution mère
à 1 μ g/ml

QS 10 ml hexane 0 10 μ l 20 μ l 50 μ l 100 μ l 500 μ l 1ml

La précision des estimations augmente avec la date de leur obtention. Ceci est probablement dû à la reproductibilité des injections liée à un facteur opérateur.

I%	date	Pente		R ²	F(n1,n2)	Sx10 ⁴
		b x 10 ⁶	100 $\frac{S_b}{b}$ %			
40	16/05/88	3.196	5 %	97.3	394 (1:4)	2.2
50	20/05/88	3.001	2 %	99.8	2205(1:5)	0.6
60	19/05/88	5.631	1.9 %	99.7	2652(1:7)	1.3
60	27/05/88	3.164	0.6 %	99.99	28190(1:4)	0.08

Tableau I : résultats d'étalonnages du modèle de l'équation(2) correspondant aux courbes de la figure I pour différents réglages du courant d'alimentation I en % et différentes dates d'expérimentation :

- b = pente en unité comptage de surface x ml/μg pour l'atténuation 1x8
 S_b = écart-type sur b
 R² = coefficient de détermination
 F(n1:n2) = test Fisher Snedecor du modèle pour n1 et n2 degrés de liberté
 S = écart-type résiduel du modèle

- Limite de détection

Elle est peu dépendante des variations observées sur les droites d'étalonnage et trouvée voisine de 1 ng/ml dans chaque cas : soit 1 pg de produit contenu dans nos injections de 1 μl.

Dans les conditions d'extraction utilisées sur les sols (voir ci-dessous), cette limite correspond à 1 mg/tonne de sol soit à 15 g/ha en prenant pour hypothèse une répartition uniforme du produit sur une profondeur de 1 m et une densité du sol de 1,5. Cette limite permettra donc de déceler 1 / 100 de la dose apportée pour un traitement à 15 kg/ha. Ce résultat est du même ordre que celui trouvé à BONDY avec le détecteur de deuxième génération.

3. Protocole d'extraction de DBCP dans les sols.

Nous avons adopté le protocole mis au point à Bondy qui constitue une simplification de la technique de HODGES et LEAR (1973) et utilise moins de solvant. Les rendements d'extraction ont été trouvés entre 75 et 100% sur des plans d'expériences comportant des contaminations contrôlées de 1μg, 0,1μg, 0,01μg et 0,001μg par g de sol pour deux sols Deck et Dior du bassin arachidier au Sénégal.

Les opérations sont les suivantes :

- pesée 10 g de sol dans des fioles cylindro-conique type fioles jaugées de 25 ml à bouchage SVL à vis avec joint Téflon.
- Ajout de 5 ml eau du robinet et 10 ml hexane pur.
- Agitation 1/2 h à l'agitateur va et vient (ou 5 mn sur agitateur vibreur).
- Ajout d'eau en rinçant le col de la fiole pour faire monter la phase hexanique dans ce col.
- Prélèvement de la phase hexanique à la pipette Pasteur et séchage par filtration sur entonnoir Pyrex de 40 mm bouché par un tampon de laine de verre et rempli d'une spatule de sulfate de sodium pur sec.
- Injection dans le chromatographe de 1 μl du filtrat recueilli en tube de 10 ml à bouchage à vis type SVL avec joint Téflon.

Remarques concernant ce protocole:

- on utilise l'eau du robinet qui a été trouvée exempte de DBCP tant à Bondy qu'à Dakar (extraction à blanc identique mais sans sol). L'eau Bi-échangée contient souvent des produits organiques en provenance des résines et la distillation n'élimine pas les produits organiques volatils comme les fumigants nématicides.
- En cas d'incident avec l'eau du robinet (contrôles périodiques nécessaires) il faudrait purifier cette eau avec l'une des techniques suivantes :
 - purification sur charbon actif.
 - Ebullition oxydante à reflux de l'eau en présence de permanganate de potassium et d'acide sulfurique préalablement à sa distillation.
- Le dosage des résidus de DBCP dans les eaux (drainage, puits, nappes phréatiques) peut être pratiqué de manière analogue en remplaçant les 10 g de sol par un volume exact d'eau compatible avec la taille de la fiole et une bonne agitation.

4. Résultats obtenus.

Des échantillons de sol antérieurement traités au DBCP et à l'EDB ont été prélevés à Darou Mousty (prélèvement effectué entre 5 et 15 cm de profondeur).

Des échantillons ont également été prélevés sur des témoins non traités (B1, B19) ainsi que sur un terrain apparemment non traité à proximité du site expérimental (Bi.1, Bi.2).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II.

ECHANTILLON	[DBCP] ng/g de sol	[DBCP] g/ha
32	15.0	225
35	19.6	294
B1	7.6	114
B19	6.7	100
Bi.1	8.1	121
Bi.2	8.7	130

Tableau II : teneur en DBCP d'échantillons de sol prélevés à Darou Mousty.

Des anomalies sur les teneurs en DBCP des sols non traités à Darou Mousty suggèrent une contamination accidentelle lors du processus d'extraction-analyse ou de prélèvement et nous ont amenés à en rechercher la cause.

Le tableau III présente une comparaison entre :

- un sol antérieurement stérilisé, prélevé en vase de végétation (E1) et un sol directement prélevé à la sortie du stérilisateur (E2) qui suggère une pollution ambiante du laboratoire en produit nématicide fumigant.
- un sol non traité prélevé avec le matériel habituel du laboratoire (F1) et ce même sol prélevé avec un matériel neuf (F2) qui indique une probable contamination des matériels de prélèvements.

	[DBCP] ng/g de sol
E 1	5.7
E 2	0
F 1	1.2
F 2	< L.D.

Tableau III : tests de pollution d'essai de laboratoire et de matériel de prélèvement. L.D. = limite de détection

V. ESSAI DE DOSAGE DE L'EDB.

Une gamme d'EDB est préparée de façon analogue au DBCP entre 1 et 100 ng/ml.

Un essai d'injection de cette gamme aux conditions chromatographiques de dosage du DBCP ci-dessus s'est avéré infructueux. La volatilité beaucoup plus grande de l'EDB rend difficile sa séparation du solvant.

La séparation s'est pourtant avérée possible dans les mêmes conditions mais à une température du four de 50°C.

Des essais sur des mélanges étalons EDB - DBCP ont montré que:

- le dosage des deux produits en programmation de température de 50 à 130°C s'avère impossible avec cette colonne vu la sensibilité du dosage.

- Le dosage des mélanges s'avère possible de la façon suivante :

a) injection des extraits à 50°C (nos essais ont montré qu'à cette température, le DBCP ne perturbe pas le dosage de l'EDB au moins dans les dix premières injections.

b) Reconditionnement de la colonne à 150°C jusqu'à stabilisation du signal puis nouvelle injection des extraits à 110°C pour le dosage du DBCP comme précédemment.

La courbe de la figure III donne la droite de régression pour l'étalonnage de l'EDB obtenu dans ces conditions. Pour la même gamme de sensibilité (1 x 8) que le DBCP, l'équation obtenue est :

$$\text{Surface} = 1612480 \times C \quad (3)$$

avec

C = concentration en ng/ml

R² = 98,81 %

F(1,4) = 580,6.

CONCLUSIONS.

Les résultats d'analyses de DBCP obtenus sur les prélèvements à Darou Mousty sont anormalement élevés par rapport à ceux obtenus antérieurement à Bondy.

Les blancs eux-mêmes, prélevés sur des sols supposés non traités présentent des pics non négligeables correspondant au temps de rétention du DBCP.

Il a été vérifié que ces pics proviennent du sol et non pas de la verrerie et des produits utilisés pour les extractions.

Les différents tests sur des sols témoins ont montré une possibilité de pollution tant à l'intérieur du laboratoire que dans le matériel de prélèvement sur le terrain.

Pour poursuivre ces études de traces de façon fiable, le laboratoire doit observer les précautions suivantes :

- mettre à l'écart tous les produits fumigants concentrés (bouchons doublés de parafilm) en chambre réfrigérée et manipuler ces produits sous une hotte exclusivement réservée à cet usage.
- Renouveler le matériel de prélèvement sur le terrain et ne plus le transporter dans le véhicule utilisé pour les produits de traitement.
- Avant d'effectuer une série de prélèvements, faire un test du matériel avec le sol correspondant à l'échantillon F2 du tableau III.
- Tester périodiquement la verrerie et les produits utilisés pour l'extraction (essai à blanc sans sol).

Il faut pourtant garder à l'esprit que les pollutions observées restent faibles et affectent les résultats sur des résidus mesurés plus d'un an après traitements. Elles auraient une influence négligeable sur la mesure du produit dans les premiers mois suivant un traitement.

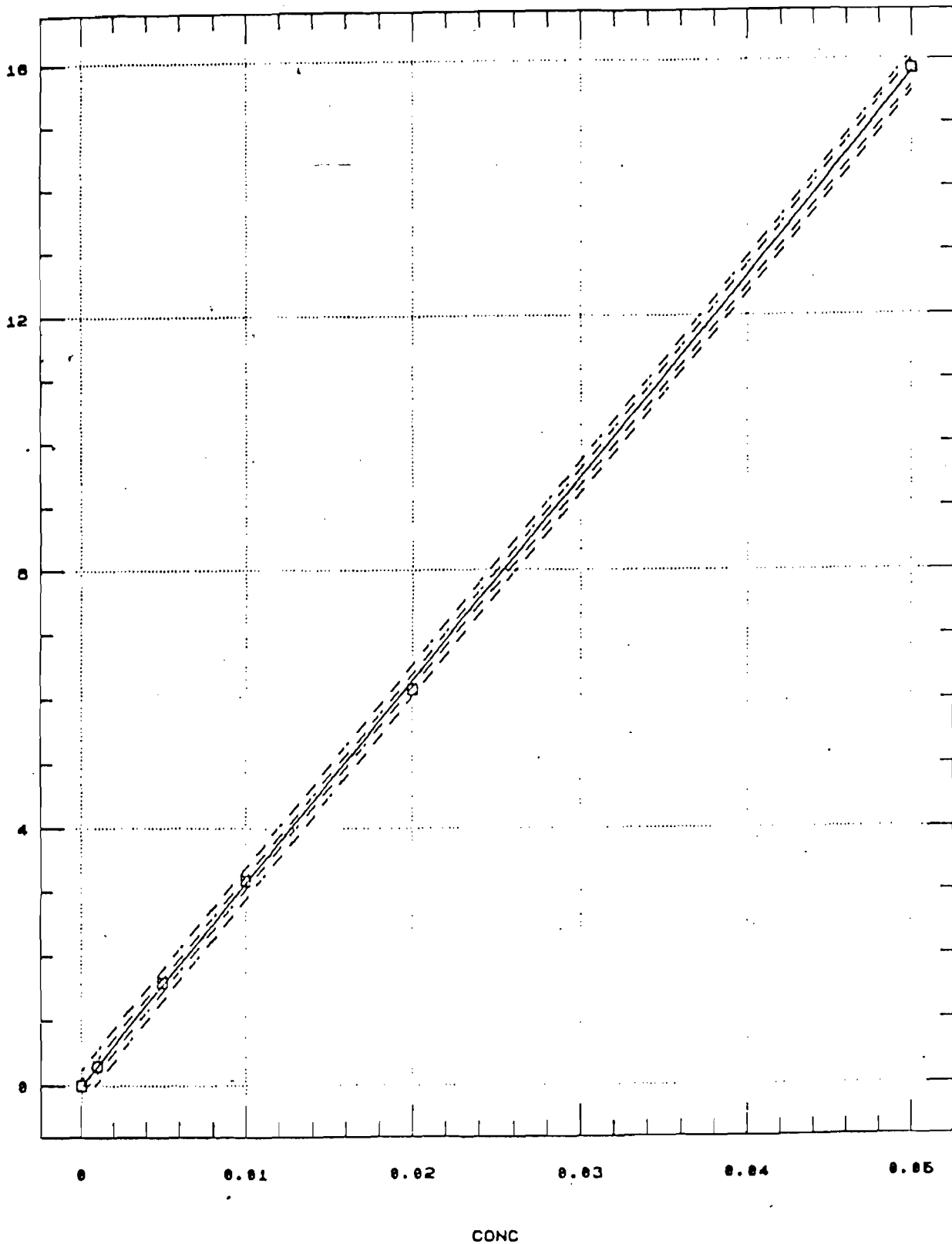
L'analyse de l'EDB est possible avec le matériel disponible à Dakar bien que l'analyse simultanée des deux fumigants pourrait être améliorée par la recherche d'une colonne plus appropriée.

Le Laboratoire de Nématologie de Dakar est maintenant en mesure d'effectuer les analyses de résidus fumigants dans les sols et les eaux moyennant les précautions ci-dessus.

fig. 1 : Etalonnage DSCP 27/05/88

Iref=60%

10000)



Couples de lignes pointillées :

- proches de la droite : Intervalles de confiance à 95% des valeurs prédites (trait plein)
- les plus éloignées : Limites de prédiction (95%) pour une mesure d'une échantillon unique

Fig 2: Influence Iref X sur reponse

et derive reponse apres 1 semaine

(X 10000)

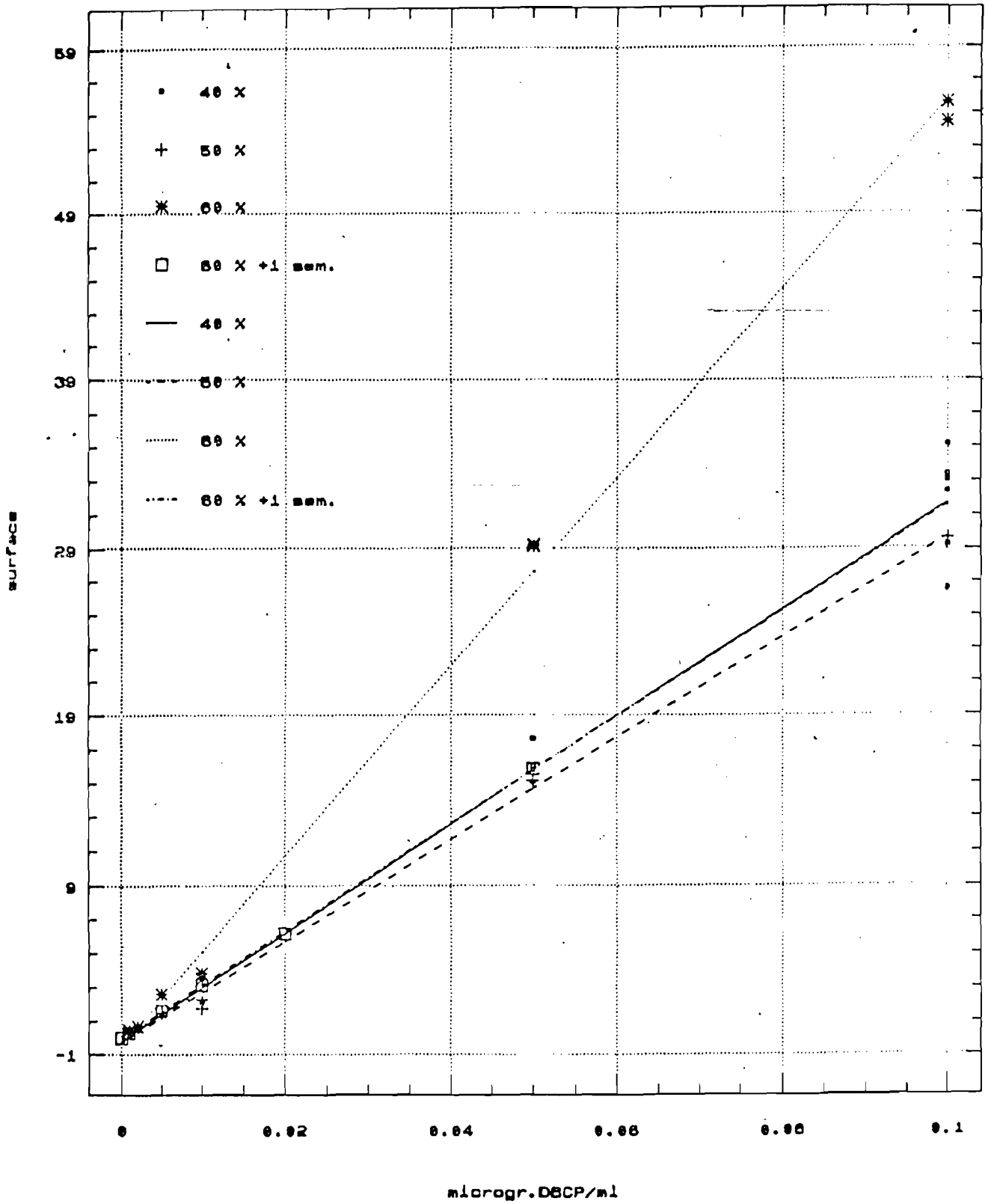
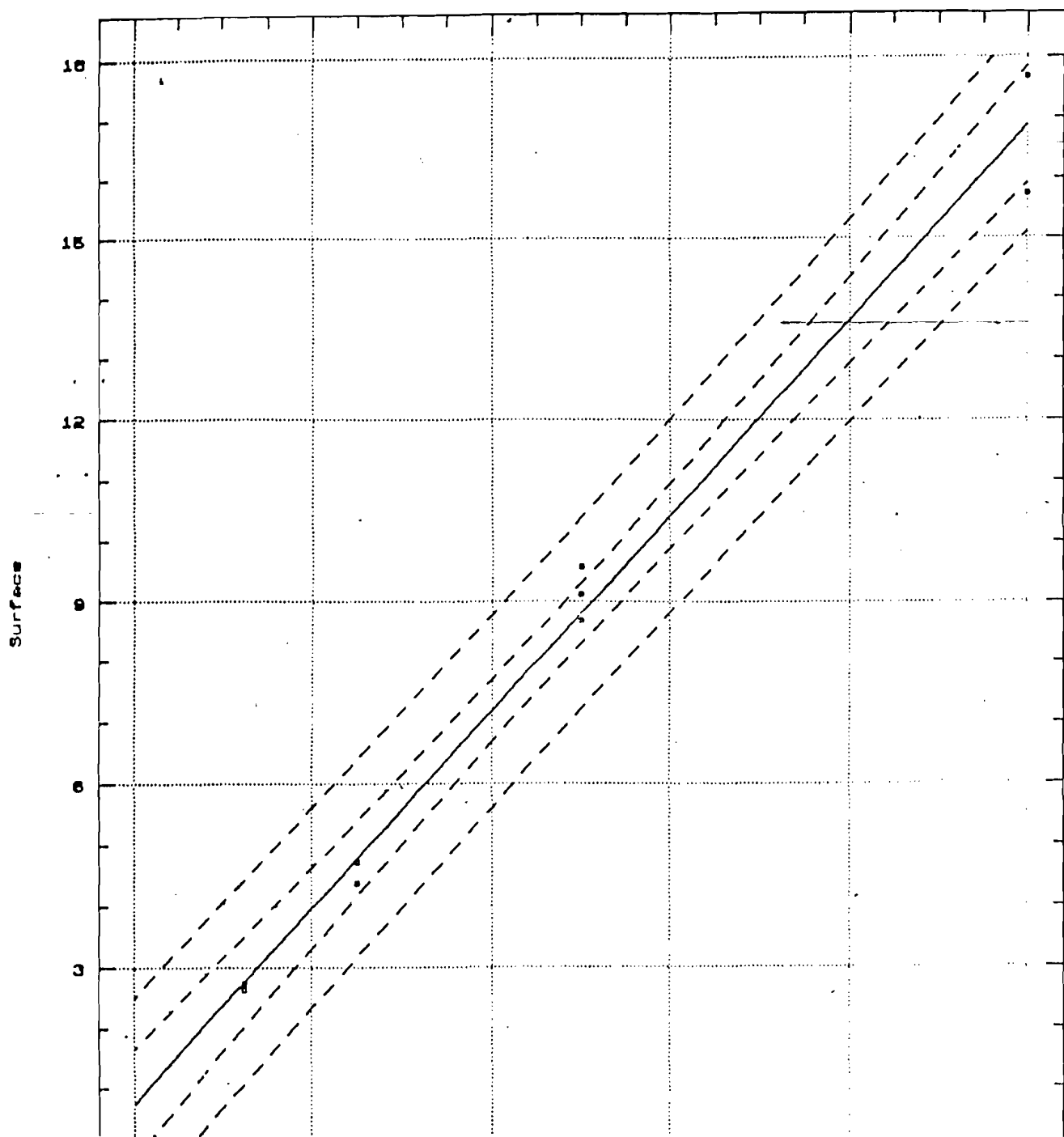


Fig. 3 Etalonnage EOB

Iref. = 60%

(X 10000)



Annexe I. Régénération d'un détecteur à capture d'électrons.

- Chauffage à 350 ° C du détecteur pendant 1/2 journée sous courant d'azote pur sans colonne (effet autonettoyant).
- Echange avec Service après Vente DELSI ou démontage du détecteur puis dévissage de l'électrode centrale de collecte avec séparation du guide électrode. Deux types de nettoyage peuvent être envisagés ensuite pour le corps métallique et l'électrode de collecte :
 - trempage dans solvant non chloré et séchage.
 - Nettoyage à la soude ou potasse bouillante des 2 parties métalliques : 10 à 15 pastilles NaOH ou KOH en béccher de 500 ml pendant 1/4 d'heure. Rinçage prolongé à l'eau chaude puis eau froide, acétone et séchage.
- Réduction à 350 ° C avec le mélange 2 ml/mn N₂, 10 ml/mn hydrogène saturé en eau.

- Remarques :

- le nettoyage par réduction à l'hydrogène présente un danger. L'hydrogène ne doit être envoyé que lorsque l'atmosphère d'azote est bien établie.
- Les solutions de nettoyage alcalin peuvent être radioactives. Il faut alors les stocker et les envoyer à l'organisme de récupération des déchets radioactifs.