

# Développement d'une méthode d'analyse du fipronil et de la méthyl nonyl cétone dans les sédiments

C. Chatellier, N. Huynh, A. El Masri

Juin 2023

Document final

Avec le soutien de



## Contexte de programmation et de réalisation

---

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2023, au titre de l'action D « Améliorer les opérations d'analyses physico-chimiques ».

Auteur (s) :

*Claudine Chatellier*  
INERIS  
*Claudine.chatellier@ineris.fr*

*Nina Huynh*  
INERIS  
*Nina.huynh@ineris.fr*

*Ahmad El Masri*  
INERIS  
*ahmad.el-masri@ineris.fr*

---

Vérification du document :

*Jean-Philippe Ghestem*  
BRGM  
*jp.ghestim@brgm.fr*

## Les correspondants

---

OFB : Pierre-François Staub, pierre-francois.staub@ofb.gouv.fr

INERIS : Nina Huynh, nina.huynh@ineris.fr

Référence du document : Claudine Chatellier, Nina Huynh, Ahmad El Masri - Développement d'une méthode d'analyse du fipronil et de la méthyl nonyl kêtone dans les sédiments - Rapport AQUAREF 2023 - 23 p.

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

<b>1. CONTEXTE</b> .....	<b>7</b>
<b>2. DÉFINITIONS</b> .....	<b>7</b>
2.1 Le fipronil .....	7
2.2 La méthyl nonyl cétone .....	8
<b>3. MATERIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>9</b>
3.1 Réactifs.....	9
3.2 Extraction .....	9
3.3 Analyse.....	10
<b>4. RÉSULTATS</b> .....	<b>11</b>
4.1 Observations sur la méthode analytique.....	11
4.2 Comparaison des méthodes d'extraction .....	12
4.3 Optimisation du protocole QuEChERS .....	13
4.4 Protocole final proposé.....	17
<b>5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS</b> .....	<b>18</b>
<b>6. REFERENCES</b> .....	<b>19</b>
<b>7. ANNEXES</b> .....	<b>19</b>

## RÉSUMÉ

Le fipronil et la méthyl nonyl kétone sont des biocides utilisés pour différentes applications, y compris domestiques. L'étude Emergents Nationaux (EMNAT 2018) consacrée à la recherche de polluants d'intérêt émergent dans les milieux aquatiques français a mis en évidence la présence de ces composés à la fois dans les eaux de surface continentales et les sédiments. Les concentrations relevées pour ces substances et leurs fréquences de détection dans les sédiments en métropole en ont fait des composés considérés comme pouvant poser des risques, au regard du risque écotoxicologique qu'ils pourraient poser. De ce fait, ils ont été intégrés dans la liste de Substances Pertinentes à Surveiller (SPAS) de catégorie C, pour une mise en surveillance dès 2025.

Afin de fournir des éléments aux futurs laboratoires qui auront la charge de ces analyses dans un cadre réglementaire, cette étude visait à développer une méthode d'analyse de ces deux biocides dans les sédiments. Un point d'attention particulier a été porté sur la robustesse de la méthode et la facilité du transfert et de la mise en place de celle-ci aux différents laboratoires dans le cadre de programmes de surveillance nationaux.

Pour cela, la méthode employée lors de la campagne EMNAT, développée et mise en œuvre par L'équipe de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC), a été, dans une première étape, reprise pour identifier les potentielles problématiques qui pourraient être rencontrées lors de son application. Une seconde étape a été dédiée à la proposition d'une méthode de préparation d'échantillon plus simple et moins coûteuse à mettre en place. Enfin, une comparaison de la méthode initiale et de cette méthode a été effectuée pour s'assurer que les performances initiales étaient conservées, voire améliorées.

**Mots clés :** Sédiments, fipronil, méthyl nonyl kétone, GC-MS/MS, QuEChERS

*DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE ANALYSIS OF FIPRONIL AND METHYL NONYL KETONE IN SEDIMENTS*  
Claudine Chatellier, Nina Huynh, Ahmad El Masri

ABSTRACT

Fipronil and methyl nonyl ketone are biocides used for a variety of applications, including domestic ones. A previous national study dedicated to the monitoring of pollutants of emerging concern in French aquatic environments (EMNAT 2018), highlighted the presence of these compounds in both continental surface waters and sediments. The concentrations of these substances and their detection frequencies determined during the study led to consider them as critical in sediments in mainland France, regarding the ecotoxicological risk they could pose. For this reason, they have been included in the list of the category C of Relevant Substances to Monitor (SPAS), for an implementation of the regulatory monitoring as early as 2025.

The aim of this study was to develop a method for analyzing these two biocides in sediments, in order to provide information for future laboratories that might be put in charge of these analyses within a regulatory framework. Particular attention was paid to the robustness of the method and the ease with which it could be transferred and implemented in different laboratories as part of national monitoring programs.

To this end, the method used during the EMNAT national study, developed and implemented by L'équipe de Physico- et Toxicologie Chimie de l'environnement (LPTC), was in a first stage studied to identify potential problems that could be encountered during its application. A second stage was dedicated to the proposal of a sample preparation method that would be simpler and less costly to implement. Finally, a comparison of the initial method and this new one was carried out to ensure that the previous performances were at least maintained, and at best improved.

**Keywords:** Sediments, fipronil, methyl nonyl ketone, GC-MS/MS, QuEChERS

## 1. CONTEXTE

L'étude Emergents Nationaux (EMNAT), effectuée entre 2018 et 2020, avait pour objectif de fournir des données de surveillance sur des substances d'intérêt d'émergent dans différents milieux aquatiques (Assoumani et al., 2020). Cette étude s'est focalisée sur les substances biocides et les surfactants.

Parmi les substances étudiées, l'étude EMNAT a montré que le fipronil était la substance biocide la plus fréquemment quantifiée dans les échantillons d'eau et également fréquemment retrouvée dans les sédiments. La méthyl nonyl kétone (MNK) était quant à elle la substance la plus fréquemment quantifiée dans les sédiments avec les concentrations médianes parmi les plus élevées. De plus, par comparaison aux valeurs de PNEC disponibles, ces deux composés ont été considérés comme des substances très critiques dans les sédiments en métropole, avec des fréquences de dépassement de la PNEC supérieures à 35 % (Assoumani et al., 2020).

Ces observations ont amené à l'ajout du fipronil et de la MNK dans l'actuel cycle de surveillance des milieux aquatiques (2022-2027), en tant que substances pertinentes à surveiller (SPAS) de catégorie C, pour lesquels la surveillance dans l'eau et les sédiments sera mise en œuvre en 2025. De plus, en vue de la publication prochaine du nouvel avis relatif aux limites de quantification des couples « paramètre-matrice » de l'agrément des laboratoires, Aquaref a proposé des limites de quantification dans les sédiments à 0,02 µg/kg et 3 µg/kg respectivement pour le fipronil et la MNK (valeurs provisoires qui seraient applicables à partir de 2025).

Lors de l'étude EMNAT, les analyses de ces substances avaient été effectuées par l'équipe de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC), qui avait développé une méthode pour 6 composés par PSE-GC/MSMS.

Aussi, afin de pouvoir fournir des informations et recommandations aux laboratoires qui seront en charge des analyses dans une optique de surveillance réglementaire à large échelle, ce travail a pour but de tester la méthode du LPTC, et éventuellement de l'adapter pour atteindre les LQ proposées par AQUAREF. Ce rapport a notamment pour but de décrire la méthode tout en discutant de ses performances et des problématiques analytiques rencontrées dont les éventuelles contaminations liées à la mise en place de la méthode.

## 2. DÉFINITIONS

### 2.1 LE FIPRONIL

Le fipronil (n° CAS : 1200068-37-3, code SANDRE : 2009) est un biocide faisant partie de la famille des phénylpyrazoles (Figure 1) avec deux énantiomères (*S* et *R*) autour de l'atome de soufre.

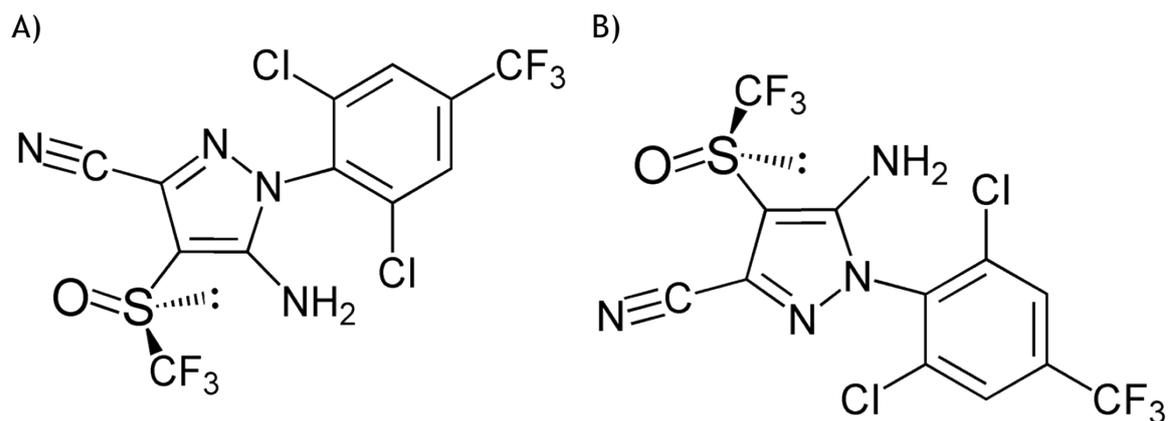


Figure 1 : A) S-Fipronil et B) R-Fipronil

Le fipronil est principalement utilisé dans le traitement des puces chez les animaux domestiques, en tant qu'insecticide pour le traitement des semences ou comme mesure préventive contre les termites.

Différentes controverses liées à son utilisation ont éclaté dans le début des années 2000 suite à un effet observé sur la mortalité importante des abeilles domestiques aux alentours des zones traitées par le fipronil, puis, plus récemment, suite à la détection de cette molécule dans des œufs destinés à la consommation humaine.

D'un point de vue réglementaire, cette substance faisait partie de l'annexe I de la directive 91/414/CEE qui la classait en tant qu'insecticide pour le traitement des semences. Aujourd'hui, son usage en tant que composé phytopharmaceutique n'est plus autorisé (règlement n°1107/2009) mais son usage en tant que biocide (insecticide, acaricide et produit de lutte contre les arthropodes) est accepté.

## 2.2 LA MÉTHYL NONYL KÉTONE

La méthyl nonyl kétone (Figure 2), aussi connue sous le nom de 2-undécaneone (n° CAS : 112-12-9, code SANDRE : 8315) est également un biocide utilisé comme insecticide et répulsif pour les animaux domestiques principalement.

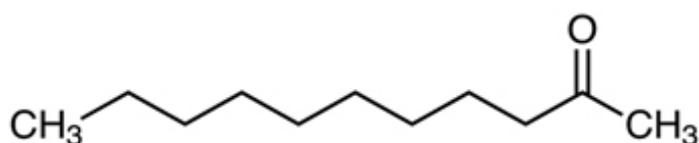


Figure 2 : Méthyl nonyl kétone (MNK)

D'autres utilisations moins connues de cette molécule sont liées à ses propriétés olfactives, notamment pour son rôle dans la composition de produits cosmétiques ou en tant qu'arôme.

### 3. MATERIEL ET METHODES

#### 3.1 RÉACTIFS

##### *Etalons*

Les étalons utilisés ont été obtenus auprès de CIL-Cluzeau et sont listés ci-dessous :

- Fipronil : solution commerciale à 100 µg/mL dans l'acétonitrile (Référence F021S100ANVC, lot F21-01-230322w)
- Fipronil <sup>13</sup>C<sub>2</sub> <sup>15</sup>N<sub>2</sub> : solution commerciale à 100 µg/mL dans l'acétonitrile, (Référence F125S100ANVC, lot F125-01-230320f)
- 2-Undécanone : produit pur à 99,24 % (Référence DRE-C17896600, lot G1081862), mis en solution dans l'acétonitrile.

L'acétonitrile utilisé est de qualité ULC/MS obtenu auprès de Biosolve (Référence 1204101BS).

Le fipronil <sup>13</sup>C<sub>2</sub> <sup>15</sup>N<sub>2</sub> sera utilisé comme étalon interne d'extraction dans tous les tests qui seront présentés par la suite. Il sera ajouté juste après pesée des matrices étudiées afin de prendre en compte toutes les étapes de préparation de l'échantillon.

Cet étalon interne sera utilisé pour les deux composés étudiés car il n'existe pas d'étalon marqué pour la MNK. Tous les résultats de rendements d'extraction dans la suite seront présentés après correction par cet étalon interne pour les deux composés étudiés.

##### *Matrices*

Les matrices utilisées dans cette étude sont les suivantes :

- Sable de Fontainebleau pour les essais de dopage préliminaires
- Sédiment du Rau Vrignon issu de la campagne exploratoire de 2012, prélevé à Saint-Aubin des Ormeaux (COT = 4,1 %), par la suite annoté 12 AB 117
- Sédiment de la Beaume issu de la campagne exploratoire de 2012, prélevé à Rosières (COT < 0,4 %), par la suite annoté 12 AB 662

##### *Matériel*

Les différents équipements et matériels utilisés dans la suite de ce document sont listés ci-dessous :

- Extracteur par Solvant Pressurisé (PSE) : ASE350, Thermofisher
- GC-MS/MS : Chromatographie gazeuse (Agilent 7890B) couplée à un spectromètre de masse triple quadipôle (Agilent 7010B)
- Kit Quechers :
  - o 900 mg MgSO<sub>4</sub> + 150 mg PSA : SST310, Interchim
  - o 900 mg MgSO<sub>4</sub> + 150 mg PSA + 15 mg PGC : SST500, Interchim
  - o 900 mg MgSO<sub>4</sub> + 150 mg PSA + 45 mg PGC : SST400, Interchim
  - o 900 mg MgSO<sub>4</sub> + 150 mg PSA + 150 mg C18 : SST210, Interchim

#### 3.2 EXTRACTION

##### *3.2.1 Par extraction par solvant pressurisé (PSE)*

La première méthode testée est celle qui a été utilisée par le LPTC pour l'analyse des sédiments dans le cadre de la campagne EMNAT 2018. Elle consiste en une extraction de 2 g de sédiment sec par du dichlorométhane sous 100 bars pendant 2 cycles de 15 min.

L'extrait résultant est concentré à sec sous flux d'azote à 35 °C et repris dans 500 µL d'acétate d'éthyle (AcEt) pour analyse.

### 3.2.2 Par extraction Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) et extraction sur phase solide dispersive (d-SPE)

Une seconde méthode a été testée en utilisant une méthode QuEChERS (Anastassiades et al., 2003), plus rapide et plus facile à mettre en place. Elle consiste en une extraction de 10 g de sédiment humide par 10 mL d'acétonitrile (ACN) avec un mélange de MgSO<sub>4</sub> et NaCl (4 g et 1 g respectivement) sous agitation par Vortex pendant 1 min. Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 RPM pendant 5 min. Le surnageant est récupéré (~10 mL) et transféré dans un tube contenant une phase dispersive permettant de purifier l'extrait. Différentes combinaisons de phases ont été testées avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre, du PSA (Primary Secondary Amine), du PGC (Porous graphitized carbon) ou de la C18. Le tout est agité par Vortex et centrifugé une nouvelle fois avant récupération du surnageant (~10 mL) et concentration à sec et reprise dans 500 µL d'AcEt pour analyse. Cette dernière partie fait l'objet d'une optimisation (cf 4.3.1) qui amènera à de petites modifications pour le protocole final retenu.

### 3.3 ANALYSE

En ce qui concerne l'analyse, la méthode appliquée est inspirée de celle utilisée par le LPTC en adaptant et en testant différents modes d'injection.

Les analyses ont été effectuées en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MSMS) avec une ionisation par impact électronique (EI).

Les conditions chromatographiques et spectrométriques sont fournies dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Détails des conditions analytiques

Conditions chromatographiques	
Colonne	HP-5 ms ultra Inert 30 m x 250 µm, 0,25 µm
Gaz vecteur	1,3 mL/min
Type d'injection	Split Liner Restek 23 330 (split liner with glass frit) Mode split ratio 2 Température : 250 °C
Volume injecté	1 µL
Programme de température	Initial : 50 °C pendant 2 min Puis rampe de 15 °C/min jusqu'à 300 °C maintenue pendant 2 min
Conditions spectrométriques	
Mode d'ionisation	EI à 70 eV
Température de la ligne de transfert	290 °C
Température de la source	230 °C
Température des quadripôles	150 °C
Courant du filament	100 µA
Gaz de collision	N <sub>2</sub> à 1,5 mL/min
MRM Q : transition de quantification, q : transition(s) de qualification, (énergie de collision en eV)	Fipronil : Q : 367 > 213 (25) q1 : 367 > 255 (25) q2 : 351 > 255 (15)  Fipronil <sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> - : Q : 371 > 213 (30) q : 373 > 215 (30)  MNK : Q : 58,1 > 43,1 (10) q : 170,1 > 85 (10)

## 4. RÉSULTATS

### 4.1 OBSERVATIONS SUR LA MÉTHODE ANALYTIQUE

Une première partie de ce travail a été consacrée à sélectionner les conditions analytiques optimales afin d'estimer de façon précise les limites de quantification analytiques atteignables pour les deux composés d'intérêt.

Les premières injections en mode full scan d'une solution à 1 ng/μL de fipronil, ont montré des problèmes de répétabilité, avec un coefficient de variation de 144 % sur 9 injections et une variation aléatoire des aires relevées. Ainsi, il a été choisi de travailler avec un *analyte protectant* lors de l'injection pour éviter les phénomènes d'interférences qui peuvent avoir lieu et influencer sur la forme et l'intensité des pics et ainsi causer une variabilité lors des différentes injections.

Lors de ce travail, l'*analyte protectant* utilisé était une solution de L-Gluconolatoné à 600 μg/mL et de D-Sorbitol à 300 μg/mL dans de l'acétonitrile.

La comparaison des deux séries d'injection (avec ou sans *analyte protectant*) est présentée en Tableau 2.

Tableau 2 : Effets de l'ajout d'*analyte protectant* lors de l'injection pour le fipronil

N = 9	Sans <i>analyte protectant</i>	Avec <i>analyte protectant</i>
Moyenne des aire de pic	1 183 244	35 426 190
Ecart-type	1 707 080	1 834 519
Coefficient de variation	144 %	5 %

Les injections avec *analyte protectant* ont été effectuées en « mode sandwich ». Cette méthode d'injection consiste à injecter l'échantillon avec l'*analyte protectant*, séparé par une couche d'air (Figure 3).

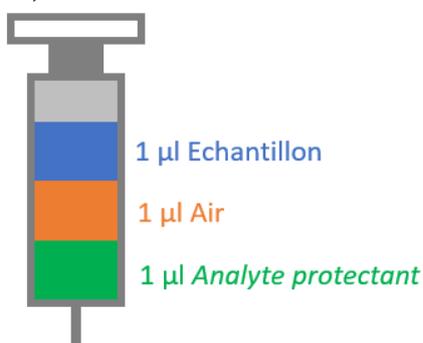


Figure 3 : Schéma de l'injection en « mode sandwich »

Cette méthode d'injection a été précédemment rapportée dans la littérature comme permettant de réduire les variations entre les différentes injections, notamment dans les cas des pesticides.

Cette observation a bien été retrouvée dans notre cas, à la fois pour le fipronil et la MNK (Annexe 1).

Ces conditions ont donc été retenues pour l'analyse de ces deux composés et ont permis d'établir des courbes d'étalonnages en gamme directe dans l'acétate d'éthyle sur un domaine allant de 0,1 à 600 ng/mL pour le fipronil et de 0,5 à 200 ng/mL pour la MNK. Les LQ instrumentales estimées dans ces conditions sont donc de 0,1 ng/mL et 1 ng/mL pour le fipronil et la MNK, respectivement.

## 4.2 COMPARAISON DES MÉTHODES D'EXTRACTION

Dans un second temps, la méthode d'extraction utilisée par le LPTC a été appliquée et comparée à une méthode de type QuEChERS afin de voir s'il était possible de faciliter la procédure tout en conservant les performances de la méthode précédemment utilisée.

Les premiers tests ont été effectués sur du sable de Fontainebleau, vierge des deux composés d'intérêt (< LQ), afin de vérifier les performances de la méthode sur une matrice simple. Le sable a été dopé avec 100 ng des composés d'intérêt et en présence de la même masse d'étalon interne d'extraction (Fipronil  $^{13}\text{C}_2$   $^{15}\text{N}_2$ ). Les rendements d'extraction selon les étapes de préparation sont présentés en Figure 4.

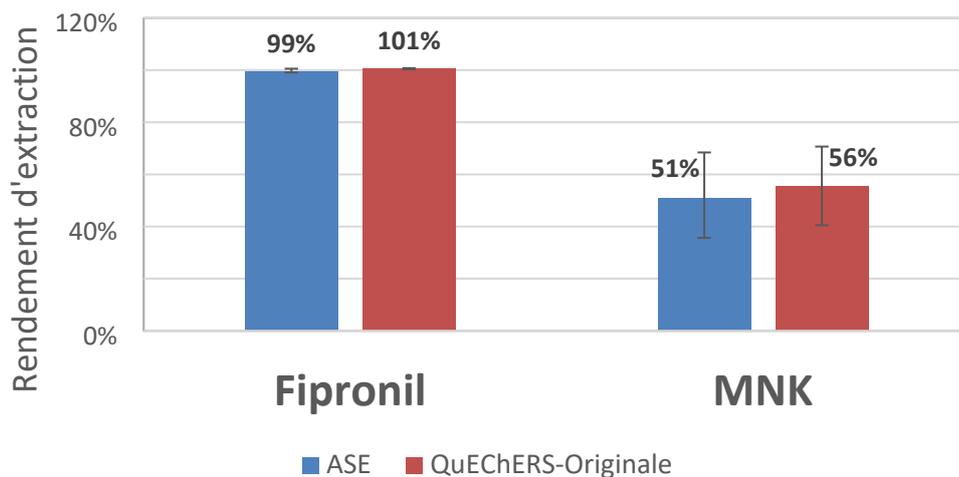


Figure 4 : Comparaison des rendements d'extraction obtenus par les méthodes PSE et QuEChERS (N = 3), barres d'erreur = coefficient de variation

Ces tests préliminaires ont mis en évidence :

- Des performances similaires entre les deux méthodes pour les deux composés d'intérêt
- Un bon rendement d'extraction pour le fipronil avec une faible variabilité entre les répliques
- Une récupération partielle de la MNK par les deux méthodes avec une variabilité plus forte

Au vu des propriétés de la MNK (Pression de vapeur saturante : 0,04 mmHg), l'hypothèse selon laquelle la MNK serait perdue lors de l'étape d'évaporation de l'extrait a été émise, ce qui expliquerait les plus faibles rendements observés pour ce composé.

Une seconde étape a donc été consacrée à l'optimisation de cette phase de concentration. Tout d'abord, pour confirmer l'hypothèse, des tests similaires ont été répétés en changeant la température de concentration sous azote, en passant des 35 °C initiaux à 40 °C.

La Figure 5 montre ainsi qu'en augmentant la température de concentration, le rendement d'extraction diminue en effet pour la MNK alors qu'aucun changement n'est observé sur le rendement du fipronil. Cet essai confirme l'hypothèse que le mauvais rendement obtenu pour la MNK est lié à sa volatilisation lors de l'étape de concentration du solvant.

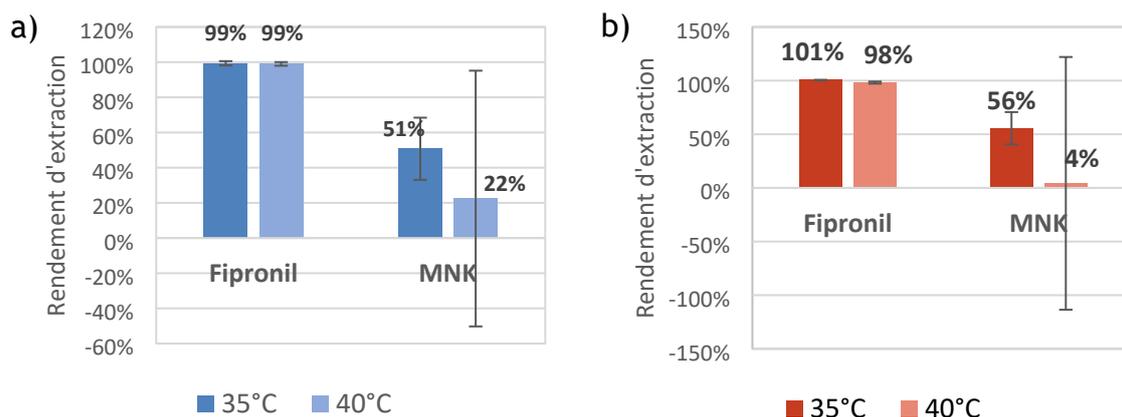


Figure 5 : Comparaison des températures de concentration (N = 3) pour le Fipronil et la MNK après a) extraction par PSE, b) extraction par QuEChERS

### 4.3 OPTIMISATION DU PROTOCOLE QUECHERS

Les résultats précédents ayant montré des performances équivalentes pour les deux méthodes d'extraction, le choix s'est porté sur la méthode QuEChERS pour la suite de cette étude. En effet, à performances similaires, la méthode QuEChERS est plus rapide et nécessite peu de moyens, les réactifs nécessaires étant disponibles dans le commerce directement en sachet prêt à l'emploi.

Cependant, la partie précédente a mis en évidence quelques problèmes subsidiaires qui vont être abordés dans cette partie.

#### 4.3.1 Détermination des conditions optimales de concentration

Des essais complémentaires ont été menés afin de limiter la perte de la MNK lors de la concentration des extraits. Pour cela, des tubes à essais contenant 8 mL d'acétonitrile (ACN) ont été dopés avec 100 ng des composés d'intérêt et les trois essais suivants ont été menés avec une concentration sous azote à 40 °C :

- Essai 1 : concentration à sec et reprise à 0,5 mL d'AcEt (protocole testé précédemment en 4.2)
- Essai 2 : concentration à 0,1 mL d'ACN et reprise à 0,5 mL avec de l'AcEt
- Essai 3 : concentration sur *keeper* (100 µL d'hexadécane) et reprise à 0,5 mL d'AcEt

Les résultats de ces essais sont présentés en Figure 6.

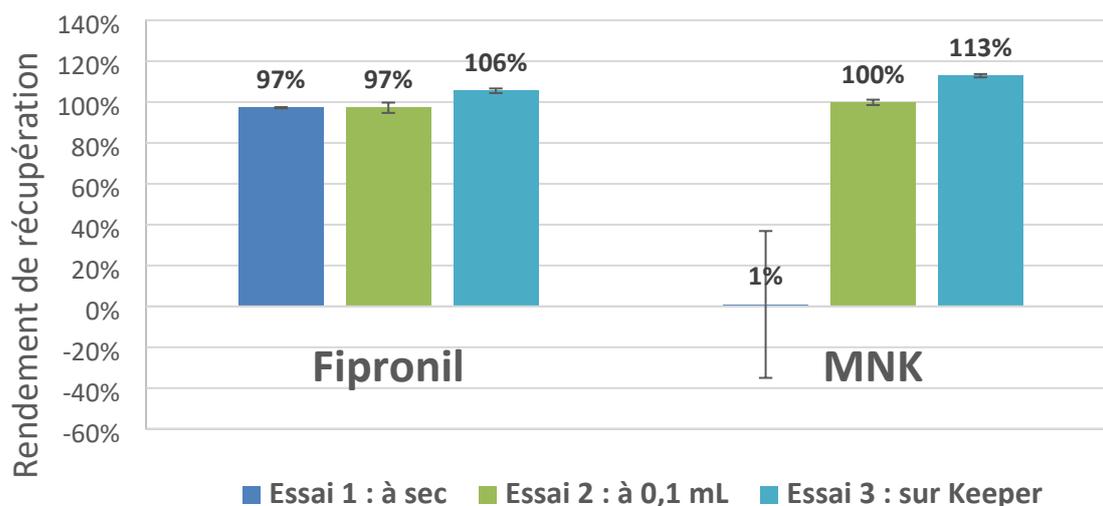


Figure 6 : Comparaison des méthodes de concentration des extraits

Il est donc nécessaire de ne pas concentrer l'extrait à sec afin de ne pas perdre la MNK, le fipronil n'étant, quant à lui, pas impacté par ces changements de conditions.

Pour la MNK, les essais 2 et 3 sont comparables en termes de rendement final d'extraction. Cependant, d'un point de vue chromatographique, des différences ont pu être observées entre ces deux méthodes (Annexe 2), avec notamment une déformation du pic et de la ligne de base en présence d'hexadécane (Essais 3). La réponse des composés dans le milieu contenant de l'ACN à 20 % (Essais 2) ne diffère pas de l'injection de l'étalon seul (dans 100 % AcEt).

Ainsi, le choix s'est porté sur les conditions de concentrations employées lors de l'essai 2 pour la suite des optimisations.

#### 4.3.2 Détermination des conditions de purification

Les tests précédents ont été réalisés sur du sable de Fontainebleau, considéré comme étant une matrice « propre ». En revanche, sur des échantillons de sédiments, une étape complémentaire de purification de l'extrait obtenu précédemment est nécessaire. Elle est réalisée par d-SPE et, pour la méthode décrite par Anastassiades et al. (2003), elle consiste en l'ajout de 900 mg de  $MgSO_4$  (élimination d'éventuelles traces d'eau) et 150 mg de PSA (élimination des composés acides, pigments polaires).

Les tests préliminaires sur les extraits du sable de Fontainebleau ont également mis en évidence une perte de la MNK à cette étape de purification due aux réactifs utilisés pour la purification. Il est suspecté que la MNK puisse se fixer sur les résidus de réactifs formés lors de la concentration (Annexe 3). La mise en place d'une filtration sur filtre seringue 20/25 HTPFE à 0,2  $\mu m$  en amont de la concentration permet de retrouver les performances précédentes (Annexe 3).

Cette méthode a ainsi été appliquée sur 2 sédiments avec des teneurs en COT différentes (<0,4 % ou 4,1 %) afin de vérifier les performances de la méthode en conditions réelles. Les sédiments ont été dopés avec 100 ng de composés d'intérêt et de l'étalon interne et deux prises d'essai (pe) différentes ont été testées : 10 g et 2 g (Figure 7).

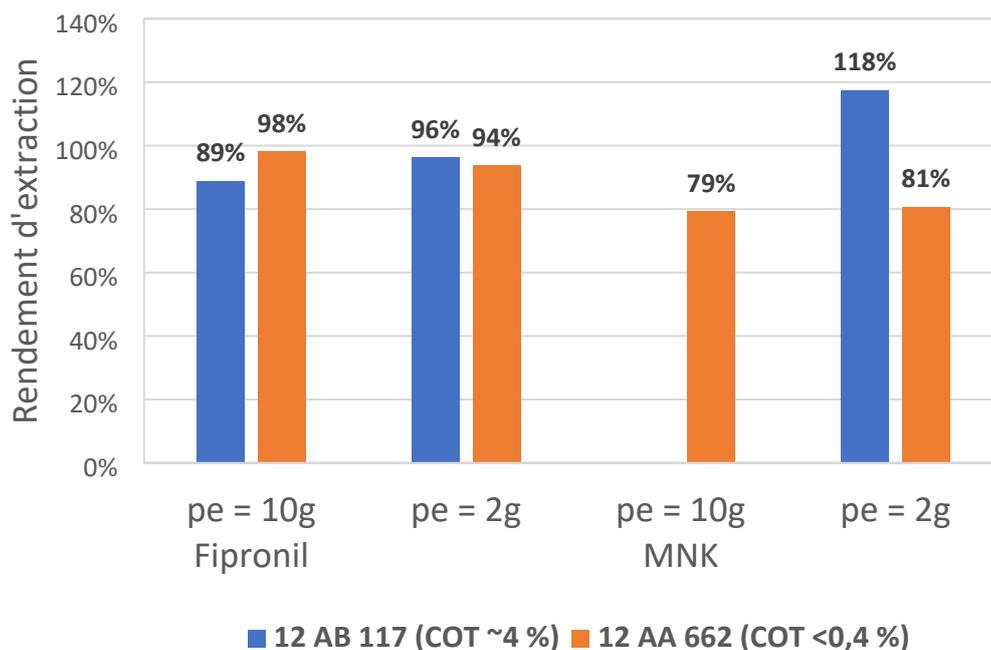


Figure 7 : Rendements d'extraction par QuEChERS + d-SPE sur sédiments réels

Les résultats montrent que pour le sédiment le plus chargé (12 AB 117), la MNK étant présente dans l'échantillon initial, une prise d'essai de 10 g ne permet pas d'obtenir de résultats exploitables (saturation du détecteur). Afin de retrouver des conditions d'analyse optimales (i.e., signal de la MNK compris dans la gamme d'étalonnage), une prise d'essai de 2 g a été testée, montrant que la méthode appliquée semble efficace pour les deux composés d'intérêt.

Une dernière série de tests a été mise en place afin de voir si un changement de la phase utilisée en d-SPE pouvait permettre d'optimiser davantage la méthode. Les phases suivantes ont ainsi été testées sur 4 extractions QuEChERS similaires au protocole décrit jusqu'à présent :

- d-SPE 1 = 900 mg MgSO<sub>4</sub> + 150 mg PSA
- d-SPE 2 = 900 mg MgSO<sub>4</sub> + 150 mg PSA + 15 mg PGC
- d-SPE 3 = 900 mg MgSO<sub>4</sub> + 150 mg PSA + 45 mg PGC
- d-SPE 4 = 900 mg MgSO<sub>4</sub> + 150 mg PSA + 150 mg C18

Ces tests ont été réalisés sur le sédiment le plus chargé en termes de matrice et en termes d'analyte (12 AB 117), la prise d'essai de 2 g et un dopage à 100 ng des composés d'intérêt ont été conservés. Les résultats sont présentés en Figure 8.

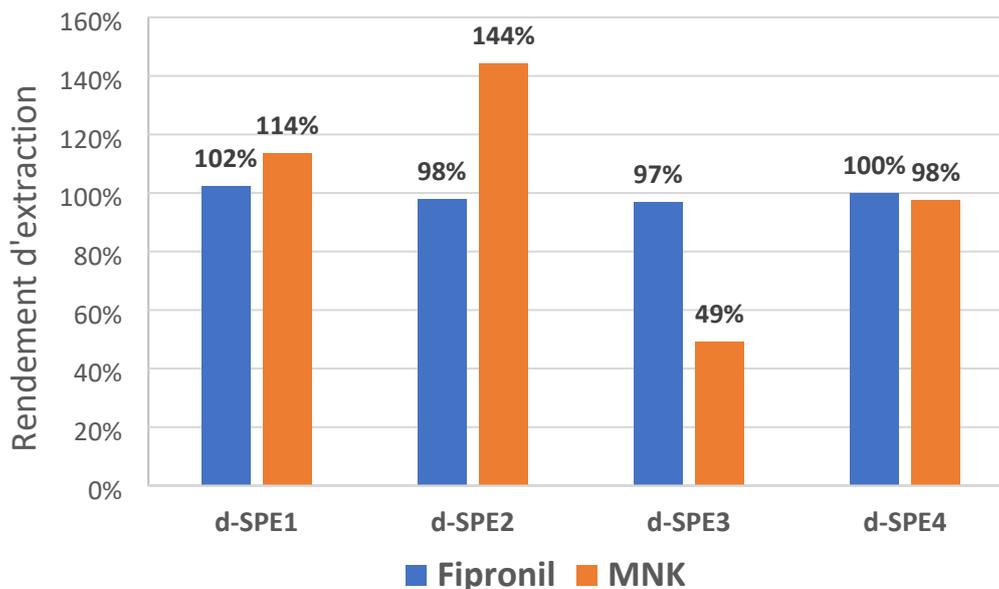


Figure 8 : Influence de la phase d-SPE sur le rendement d'extraction du fipronil et de la MNK

Quelle que soit la phase d-SPE sélectionnée, aucune influence n'est observée sur le rendement d'extraction final du fipronil. En revanche, de très fortes variations de rendement ont été observées pour la MNK lorsque la d-SPE était réalisée en présence de PGC. En effet, pour une proportion plus faible de PGC (d-SPE2 : 1,4 % de PGC), un rendement de 144 % est observé alors que le rendement n'atteint plus que 49 % lorsque la PGC est présente en plus forte proportion (d-SPE3 : 4,1%).

Cette variabilité du rendement d'extraction de la MNK en présence de PGC peut être expliquée par la structure de la molécule d'intérêt. En effet, la MNK est une molécule plane pour laquelle de fortes interactions peuvent exister avec la PGC, dont la structure est également plane. La différence de rendement entre la d-SPE2 et d-SPE3 peut aussi être expliquée par l'utilisation d'un étalon interne (ici Fipronil-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>) pas totalement adapté pour la MNK. La MNK ne possédant pas d'équivalent marqué isotopiquement sur le marché, les précédents travaux réalisés dans le cadre d'EMNAT décrivaient l'utilisation de la cyperméthrine-d<sub>6</sub>. Les prochains travaux s'appliqueront donc à comparer l'utilisation de ces deux étalons pour corriger la MNK afin de valider la méthode.

En conséquence et à ce stade, les 4 phases de d-SPE testées conviennent pour la purification de l'extrait en ce qui concerne le fipronil. En revanche, pour la MNK, les d-SPE1 et d-SPE4 sont à privilégier, celles-ci montrant des performances similaires (Annexe 4).

Par comparaison de l'essai d-SPE1 aux résultats présentés en Figure 7, une faible variabilité sur les rendements d'extraction peut être observée, cette méthode sera donc recommandée. Cependant, il est à noter qu'une forte variation de la concentration obtenue de MNK dans le sédiment non dopé entre ces deux essais a pu être constatée (11 ng/g pour l'essai Figure 7, contre 62 ng/g pour l'essai Figure 8). La soustraction de la teneur du sédiment avant dopage permet de retrouver la valeur de dopage pour chacun de ses essais. Cependant ce constat reste un point de vigilance important à noter et à investiguer lors de futurs travaux de validation de méthode. En effet, ces tests sur échantillon brut ont été effectués sans réplica et peuvent suggérer que la MNK n'est pas répartie de façon homogène dans l'échantillon, ce qui explique cette variation. Les futurs travaux devront couvrir un plus large spectre de sédiments de propriétés différentes et avec des teneurs initiales en MNK variables pour lesquels il sera nécessaire de faire un certain nombre de mesures sur les matrices sans dopage.

#### 4.4 PROTOCOLE FINAL PROPOSÉ

Suite aux observations précédentes, le protocole retenu pour l'analyse du fipronil et de la méthyl nonyl kétone dans les sédiments est présenté en Figure 9.

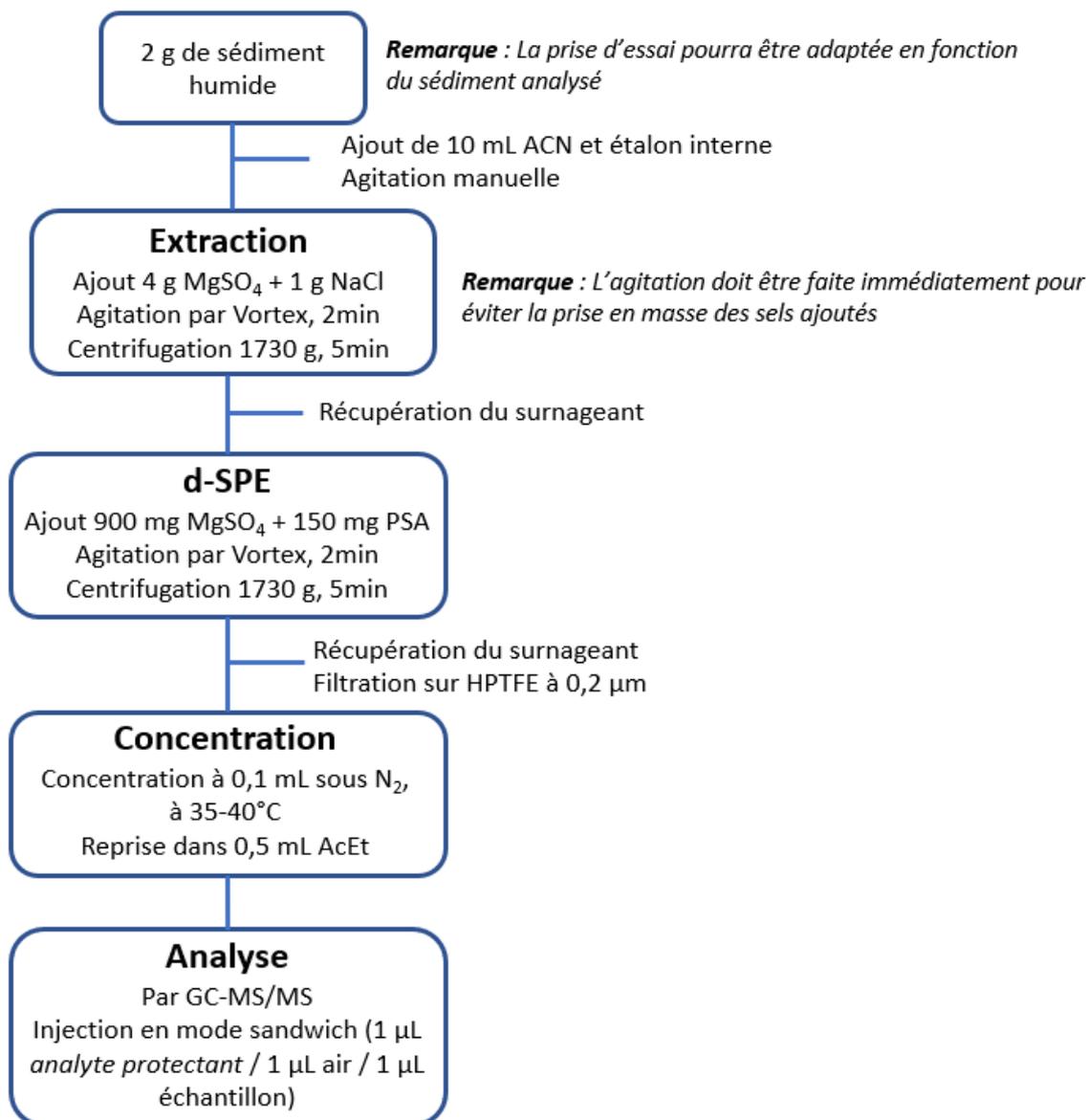


Figure 9 : Protocole final retenu

Cette méthode permet d'obtenir un rendement moyen d'extraction de 99 % pour le fipronil et 116 % pour la MNK. Dans ces conditions, la méthode pourrait permettre d'atteindre des LQ de 0,025 ng/g et 0,25 ng/g pour le fipronil et la MNK respectivement, pour des matrices peu chargées et sous réserve de validation de cette méthode avec un spectre plus large de sédiments aux propriétés physico-chimiques différentes.

## 5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Le fipronil et la méthyl nonyl cétone ont été identifiés comme des substances d'intérêt dans les sédiments suite à l'étude Emergents Nationaux en 2018. Ces substances ont été incluses dans l'actuel cycle de surveillance (2022-2027) et leur surveillance débutera en 2025, à la fois dans les sédiments et dans les eaux de surface continentales. Afin de fiabiliser leur mesure, cette action avait pour but de développer une méthode d'analyse du fipronil et de la méthyl nonyl cétone dans les sédiments.

Différents tests ont été menés au cours de cette étude afin de proposer un protocole robuste et facile à mettre en place. Le choix s'est porté sur une méthode de type QuEChERS pour l'extraction, suivie d'une purification par d-SPE et de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Sur cette étude préliminaire, cette méthode permet d'atteindre des limites de quantification pour le fipronil et la méthyl nonyl cétone respectivement de 0,005 ng/g et 0,05 ng/g pour une prise d'essai de 10 g de sédiment ou de 0,025 et 0,25 ng/g respectivement, pour une prise d'essai de 2 g, avec des rendements d'extraction satisfaisants. Ces performances seront à vérifier sur une plus grande diversité de sédiments afin de valider la robustesse de la méthode, mais cette dernière semble, à ce stade, prometteuse pour atteindre les limites de quantification proposées par AQUAREF en vue de la publication de l'avis sur les limites de quantification.

Cette étude a mis en évidence quelques points sur lesquels il est nécessaire de rester vigilant lors de l'analyse de ces composés, notamment l'utilisation d'un *analyte protectant* pour l'analyse, et le risque de perte de la MNK lors de l'étape de concentration des extraits lors de la préparation d'échantillon.

Afin de favoriser le transfert de cette méthode vers d'autres laboratoires, une action complémentaire sera menée dans le cadre du programme Aquaref afin de valider cette méthode selon la XP X31-131 et établir la fiche méthode correspondante pour diffusion.

## **6. REFERENCES**

- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int. 86, 412-431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Assoumani, A., Lestremay, F., Salomon, M., Ferret, C., Lepot, B., 2020. Campagne Emergents Nationaux 2018 (EMNAT 2018) - Résultats de la recherche de contaminants émergents dans les eaux de surface et les rejets de STEU (No. Ineris-172894-2169068-v3.0).

## **7. ANNEXES**

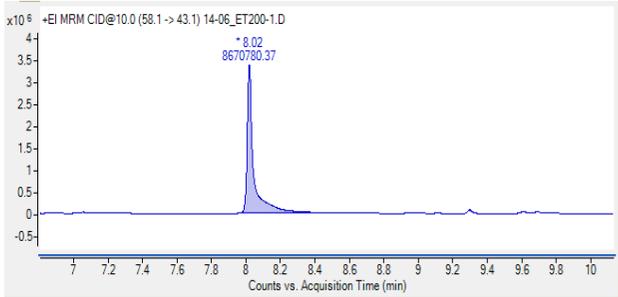
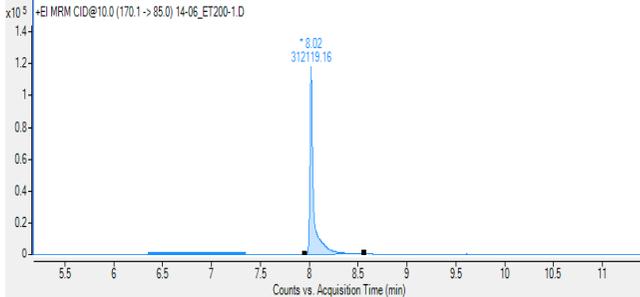
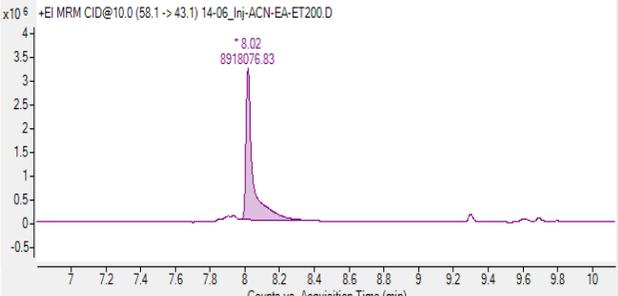
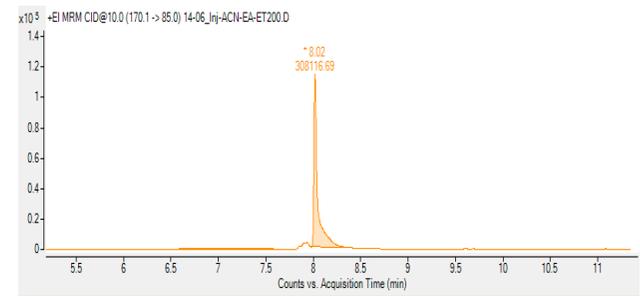
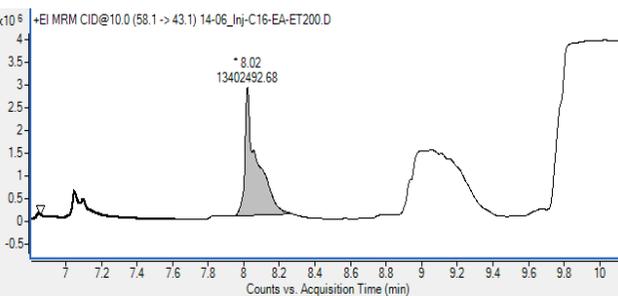
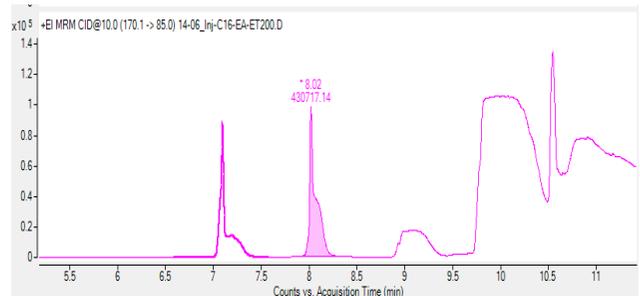
### **Liste de Annexes :**

- Annexe 1 :** Comparaison des chromatogrammes en injection directe et en injection en « mode sandwich »
- Annexe 2 :** Influence du milieu de reprise sur les chromatogrammes de la MNK
- Annexe 3 :** Comparaison des rendements d’extraction en QuEChERS + d-SPE, avec et sans filtration avant l’étape de concentration (N = 4)
- Annexe 4 :** Comparaison des bruits de fond en fonction de la phase de d-SPE utilisée

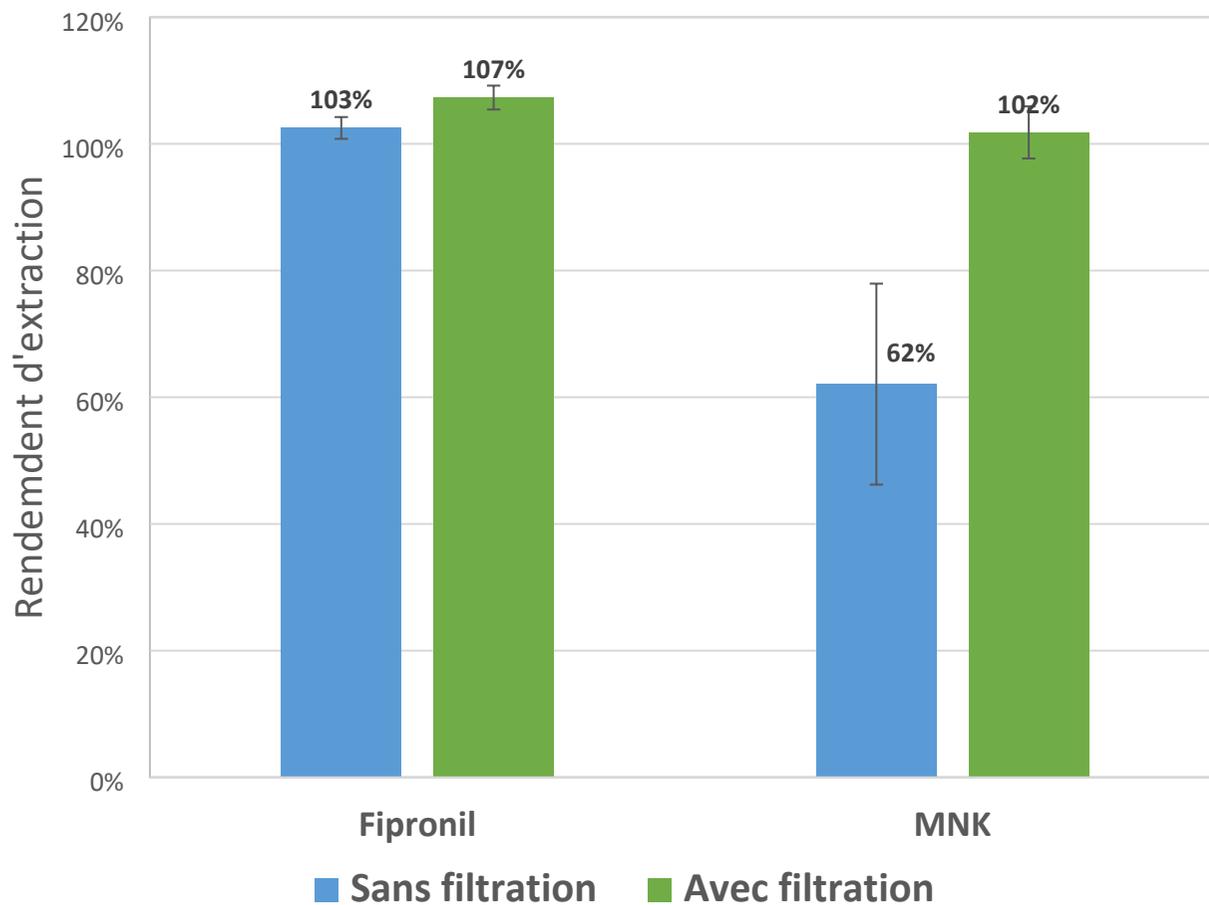
**Annexe 1 : Comparaison des chromatogrammes en injection directe et en injection en « mode sandwich »**

	<b>MNK</b>	<b>Fipronil</b>
<b>Temps de rétention (min)</b>	<b>8,0</b>	<b>14,0</b>
<b>Chromatogramme en injection directe</b>		
<b>Chromatogramme en injection "mode sandwich »"</b>		

## Annexe 2 : Influence du milieu de reprise sur les chromatogrammes de la MNK

Milieu de reprise	MRM quantification (58 > 43)	MRM qualification (170 > 85)
Etalon (100 % AcEt)		
Essai 2 (80 % AcEt / 20 % ACN)		
Essai 3 (80 % AcEt / 20 % hexadécane)		

Annexe 3 : Comparaison des rendements d'extraction en QuEChERS + d-SPE, avec et sans filtration avant l'étape de concentration (N = 4)



Concentration sans filtration

Annexe 4 : Comparaison des bruits de fond en fonction de la phase de d-SPE utilisée

MRM du MNK pour le sédiment 12AB117 purifié par d-SPE	
<b>d-SPE 1</b>	<p>+ MRM (58.1 -&gt; 43.1) 27-06_12AB117-Dop-Purif-SST310.D</p> <p>8.02 30947941 464.4</p>
<b>d-SPE 2</b>	<p>+ MRM (58.1 -&gt; 43.1) 27-06_12AB117-Dop-Purif-SST500.D</p> <p>8.02 26600099 545.7</p>
<b>d-SPE 3</b>	<p>+ MRM (58.1 -&gt; 43.1) 27-06_12AB117-Dop-Purif-SST400.D</p> <p>* 8.02 17260582 339.6</p>
<b>d-SPE 4</b>	<p>+ MRM (58.1 -&gt; 43.1) 27-06_12AB117-Dop-Purif-SST210.D</p> <p>* 8.02 28005432 525.4</p>