

Néonicotinoïdes (acétamipride, clothianidine, imidaclopride, thiaclopride, thiaméthoxame), macrolides (azithromycine, clarithromycine, érythromycine), mercaptodiméthur, oxadiazon et diclofénac
Méthode d'analyse dans les eaux brutes

Généralités

Nom de la famille de substances	<u>Néonicotinoïdes</u> : acétamipride, clothianidine, imidaclopride, thiaclopride, thiaméthoxame <u>Macrolides</u> : azithromycine, clarithromycine, érythromycine <u>Carbamates</u> : mercaptodiméthur <u>Oxadiazoles</u> : oxadiazon <u>Médicaments anti-inflammatoires</u> : diclofénac
Nom des substances individuelles	acétamipride, clothianidine, imidaclopride, thiaclopride, thiaméthoxame, azithromycine, clarithromycine, érythromycine, mercaptodiméthur (ou méthiocarbe), oxadiazon et diclofénac.
Code SANDRE des substances individuelles	Acétamipride : 5579 Clothianidine : 6389 Imidaclopride : 1877 Thiaclopride : 5671 Thiaméthoxame : 6390 Azithromycine : 7817 Clarithromycine : 6537 Erythromycine : 6522 Mercaptodiméthur : 1510 Oxadiazon : 1667 Diclofénac : 5349
Matrice analysée	Eau : [23] Eau : eau douce de surface
Principe de la méthode	Extractions liquide-liquide (ELL) à pH3 et à pH10 et analyse par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle avec une ionisation en électrospray positif (UPLC/MSMS).
Acronyme	ELL/UPLC/MSMS
Domaine d'application	LQ (5, 10 ou 20 ng/L selon les composés) à 1000 ng/L d'eau
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	MES
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	Pour éviter toute perte des macrolides lors de l'évaporation de la phase organique récupérée lors de l'extraction liquide/liquide, il est impératif d'évaporer dans des tubes en plastique de type PP (polypropylène). En raison de l'utilisation de certaines substances dans des préparations pharmaceutiques, l'opérateur doit être vigilant quant à utilisation de pommades (diclofénac dans le gel Voltarène par exemple) et doit impérativement porter des gants pour éviter de contaminer les échantillons ou les extraits.

AVERTISSEMENT : Il convient que l'utilisateur de cette méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Cette méthode n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur. Certains des solvants utilisés dans le mode opératoire sont toxiques et dangereux. Les manipuler avec précaution.

Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément à cette méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation adéquate

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée:	Eau brute [23]
Conditionnement et conservation des échantillons	
- Protocole :	Les échantillons sont conservés à l'obscurité à $4 \pm 2^\circ\text{C}$. L'extraction à pH 10 doit être réalisée dans les 48 heures après le prélèvement. L'extraction à pH 3 peut être réalisée jusqu'à 5 jours après le prélèvement.
- Nature du contenant de stockage :	Verre ambré (certifié EPA) ou protégé de la lumière par une feuille d'aluminium, avec bouchons à vis à revêtement de PTFE (polytétrafluoroéthylène)
- Lavage du contenant :	Contenant neuf
- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :	<p>L'étude de stabilité a été réalisée avec une eau de surface (26 mg/L en MES et 11 mg/L en COT) dopée à 100 ng/L, conservée à $4 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à 5 jours. Des triplicats ont été préparés pour chaque pas de temps. La stabilité est vérifiée en comparant la concentration mesurée à la concentration de dopage en prenant en compte l'incertitude ($k=2$) de la méthode.</p> <p>Les composés sont stables jusqu'à 5 jours à l'exception de :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Azithromycine : dégradation observée dès 24 h de 38% ($\pm 7\%$, $n=2$) puis 33% ($\pm 16\%$) en 48 h et 53% ($\pm 8\%$) en 5 jours. - Clarithromycine : faible dégradation observée dès 48h de 11% ($\pm 2\%$) puis 13% ($\pm 2\%$) en 5 jours. NB : l'incertitude élargie de ce composé est faible (5%). <p>Aucun traitement préalable (ajout EDTA, acide ascorbique, thiosulfate de sodium) ou immédiat (mise à pH10, ajout de solvant d'extraction) ou le type de flacon (flacon en HDPE) n'a permis de stabiliser ces 2 composés. En conséquence, les incertitudes de mesure estimées pour ces 2 composés prennent en compte la dégradation observée à 48 h.</p> <p>Une étude de stabilité complémentaire a été réalisée sur 2 eaux superficielles (MES =45 mg/L et COT = 4 mg/L ; MES = 5 mg/L et COT = 7 mg/L) dopées à 100 ng/L et conservées 14 jours à $-18 \pm 5^\circ\text{C}$. Aucune dégradation n'a été observée.</p>

Analyse

Volume de la prise d'essai (mL)	2 x 1000 mL
--	-------------

Extraction

- Liquide / Liquide

2 litres sont nécessaires par échantillon, pour réaliser une extraction liquide/liquide à pH3 et une autre à pH10.

Le protocole d'extraction à pH3 est dédié aux 8 composés suivants: acétamipride, clothianidine, imidaclopride, thiaclopride, thiaméthoxame, mercaptodiméthur, oxadiazon et diclofénac.

Le protocole d'extraction à pH10 est dédié aux 3 composés suivants: azithromycine, clarithromycine et érythromycine.

Ajuster l'échantillon à $\text{pH } 3 \pm 0,1$ au pH-mètre avec de l'acide sulfurique (qualité ACS reagent, pureté 95-98%) dilué au $\frac{1}{2}$.

Ajouter 50 μL du mélange des 11 étalons internes (acétamipride-d3, clothianidine-d3, imidaclopride-d4, thiaclopride-d4, thiaméthoxame-d3, azithromycine-d3, clarithromycin-N-methyl-d3, érythromycine-d6, mercaptodiméthur-d3, oxadiazon-methyl-d3 et diclofénac-d4) à 5 mg/L dans l'acétonitrile.

Extraire avec 30 mL de dichlorométhane puis 3 fois avec 40mL d'un mélange dichlorométhane/acétone 75/25 (v/v).

Recueillir les phases organiques dans un flacon en verre.

Evaporer l'extrait jusqu'à 0,5 mL sous flux d'azote dans un bain marie à 30°C (sans évaporation à sec) et reprendre l'extrait dans l'acétonitrile à un volume de 0,5 mL dans un vial ambré.

Ajuster l'échantillon à $\text{pH } 10 \pm 0,1$ au pH-mètre, en ajoutant de la soude à 6 mol/L.

Ajouter 50 μL du mélange des 11 étalons internes à 5 mg/L dans l'acétonitrile.

Extraire avec 30mL de dichlorométhane puis 2 fois avec 40mL d'un mélange dichlorométhane/acétone 75/25 (v/v).

Recueillir les phases organiques dans un flacon plastique PP.

Evaporer l'extrait jusqu'à 0,5 mL (toujours dans un flacon plastique) sous flux d'azote dans un bain marie à 40°C (sans évaporation à sec) et reprise de l'extrait dans l'acétonitrile à un volume de 0,5 mL, dans un vial ambré.

Conservation de l'extrait

Au congélateur ($-18 \pm 5^\circ\text{C}$). Le délai de conservation d'1 mois a été vérifié.

Volume final avant analyse :

Pour chaque extraction le volume final est de 1 mL : dans chaque extrait ajouter 0,5 mL d'eau (qualité HPLC/MSMS) pour obtenir 1 mL d'un mélange acétonitrile/eau 50/50 (v/v).

Méthode analytique utilisée :

Les 2 extraits sont analysés séparément avec la même méthode.

Chromatographie :

Colonne Acquity UPLC BEH C18® (10 cm x 2,1 mm x 1,7 µm ; Waters), thermostatée à 50°C.

Phase mobile :

Voie A : Eau avec 0,01% d'acide formique (v/v)

Voie B : Acétonitrile avec 0,01% d'acide formique (v/v)

Débit 0,4 mL/min

Temps (min)	%A	%B
0	95	5
0,75	95	5
8	1	99
9	1	99
9,3	95	5
14	95	5

Volume d'injection : 2 µL, échantillon maintenu à 10°C dans le passeur d'échantillons.

Spectrométrie de masse :

Mode d'ionisation : ESI+

Température de la source : 150 °C

Température de désolvatation : 650 °C

Débit gaz du cône : 50 L/h

Débit gaz de désolvatation : 800 L/h

Conditions d'ionisation et de fragmentation :

Composés	Transition de quantification en uma (Tension de Cône en V, Energie de Collision en eV)	Transition de qualification en uma (Tension de Cône en V, Energie de Collision en eV)
Acétamipride	223>126 (30, 20)	223>56 (30, 15)
Acétamipride-d3	228>128 (30, 20)	228>59 (30, 15)
Clothianidine	250>169 (20, 15)	250>132 (20, 20)
Clothianidine-d3	255>172 (20, 15)	255>134 (20, 20)
Imidaclopride	256>209 (25, 15)	256>175 (25, 20)
Imidaclopride-d4	260>213 (25, 15)	260>179 (25, 20)
Thiaclopride	253>126 (30, 20)	253>186 (30, 15)
Thiaclopride-d4	259>128 (35, 25)	259>192 (35, 15)
Thiaméthoxame	292>211 (20, 10)	292>132 (20, 20)
Thiaméthoxame-d3	297>214 (20, 15)	297>134 (20, 20)
Azithromycine	375,5>158 (25, 25)	375,5>591,5 (25, 15)
Azithromycine-d3	377>158 (25, 25)	377>594,5 (25, 15)

	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>Clarithromycine</td> <td>748,5>158 (30, 35)</td> <td>748,5>590 (30, 20)</td> </tr> <tr> <td>Clarithromycine-N-méthyle-d3</td> <td>751,5>161 (35, 35)</td> <td>751,5>593 (35, 20)</td> </tr> <tr> <td>Erythromycine</td> <td>734,5>158 (35, 35)</td> <td>734,5>576,5 (35, 20)</td> </tr> <tr> <td>Erythromycine-d6</td> <td>740,5>164 (35, 35)</td> <td>740,5>582,5 (35, 20)</td> </tr> <tr> <td>Mercaptodiméthur</td> <td>226>169 (15, 10)</td> <td>226>121 (15, 20)</td> </tr> <tr> <td>Mercaptodiméthur-d3</td> <td>229>169 (15, 10)</td> <td>229>121 (15, 20)</td> </tr> <tr> <td>Oxadiazon</td> <td>345>303 (30, 10)</td> <td>345>220 (30, 20)</td> </tr> <tr> <td>Oxadiazon-méthyle-d3</td> <td>320>202 (30, 25)</td> <td>320>237 (30, 15)</td> </tr> <tr> <td>Diclofénac</td> <td>296>215 (25, 20)</td> <td>296>250 (25, 15)</td> </tr> <tr> <td>Diclofénac-d4</td> <td>302>256 (25, 15)</td> <td>302>221 (25, 20)</td> </tr> </tbody> </table>	Clarithromycine	748,5>158 (30, 35)	748,5>590 (30, 20)	Clarithromycine-N-méthyle-d3	751,5>161 (35, 35)	751,5>593 (35, 20)	Erythromycine	734,5>158 (35, 35)	734,5>576,5 (35, 20)	Erythromycine-d6	740,5>164 (35, 35)	740,5>582,5 (35, 20)	Mercaptodiméthur	226>169 (15, 10)	226>121 (15, 20)	Mercaptodiméthur-d3	229>169 (15, 10)	229>121 (15, 20)	Oxadiazon	345>303 (30, 10)	345>220 (30, 20)	Oxadiazon-méthyle-d3	320>202 (30, 25)	320>237 (30, 15)	Diclofénac	296>215 (25, 20)	296>250 (25, 15)	Diclofénac-d4	302>256 (25, 15)	302>221 (25, 20)
Clarithromycine	748,5>158 (30, 35)	748,5>590 (30, 20)																													
Clarithromycine-N-méthyle-d3	751,5>161 (35, 35)	751,5>593 (35, 20)																													
Erythromycine	734,5>158 (35, 35)	734,5>576,5 (35, 20)																													
Erythromycine-d6	740,5>164 (35, 35)	740,5>582,5 (35, 20)																													
Mercaptodiméthur	226>169 (15, 10)	226>121 (15, 20)																													
Mercaptodiméthur-d3	229>169 (15, 10)	229>121 (15, 20)																													
Oxadiazon	345>303 (30, 10)	345>220 (30, 20)																													
Oxadiazon-méthyle-d3	320>202 (30, 25)	320>237 (30, 15)																													
Diclofénac	296>215 (25, 20)	296>250 (25, 15)																													
Diclofénac-d4	302>256 (25, 15)	302>221 (25, 20)																													
Equipements ¹ (modèles utilisés) :	Chromatographe Ultra Haute pression Acquity® (Waters) équipé d'un passeur d'échantillons automatique réfrigéré, avec dispositif d'injection permettant d'introduire une prise d'essai de 2 µL à 50 µL. Spectromètre de masse en tandem (triple quadripôle) : XEVO-TQD® (Waters).																														
Type d'étalonnage	Interne																														
Modèle utilisé	Linéaire pondéré en 1/x																														
Etalons / Traceurs utilisés	Un étalon interne marqué pour chaque composé soit une solution de 11 étalons internes, chacun à 5 mg/L dans l'acétonitrile : <ul style="list-style-type: none"> - acétamipride-d3 - clothianidine-d3 - imidaclopride-d4 - thiaclopride-d4 - thiaméthoxame-d3 - azithromycine-d3 - érythromycine-d6 - clarithromycine-N-méthyle-d3 - mercaptodiméthur-d3 - oxadiazon-méthyle-d3 - diclofénac-d4 <p>Un volume de 0,05 mL pour 1L d'échantillon est ajouté avant extraction.</p>																														
Domaine de concentration	5, 10 ou 20 à 1000 µg/L. Les solutions sont préparées dans un mélange eau/acétonitrile 50/50 (v/v).																														
Méthode de calcul des résultats	Etalonnage interne, en mode dilution isotopique (à l'exception de l'oxadiazon étalonné avec l'oxadiazon-méthyle-d3).																														
Rendement	Sans objet. Chaque composé dispose de son homologue marqué (sauf pour l'oxadiazon qui est étalonné avec l'oxadiazon-méthyle-d3) ; cela permet de corriger du rendement pour chaque échantillon.																														
Blancs	Blanc méthode (eau de source) réalisé à chaque série d'extraction, inférieur à la limite de détection. Soustraction du blanc : non																														

¹ Les matériels cités ici constituent des exemples d'application satisfaisante. Ces mentions ne constituent pas une recommandation exclusive, ni un engagement quelconque de la part du rédacteur ou d'AQUAREF

Références de la méthode

La méthode est dérivée de la publication suivante	/
Norme dont est tirée la méthode	/
Niveau de validation selon Normes	Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée	NF T90-210 (mai 2009).
Domaine de validation	LQ (5, 10 ou 20 ng/l selon les composés) à 1000 ng/L

Blancs analytiques	Blanc solvant (eau/acétonitrile 50/50, v/v) inférieur à la limite de détection. Blanc méthode (eau de source) inférieur à la limite de détection.
--------------------	--

Rendement	<p>L'étude de rendement (ou taux de recouvrement) est réalisée dans des conditions de fidélité intermédiaire avec une eau douce de surface (rivière) dopée à trois niveaux de concentration (6 jours x 2 réplicats pour chaque concentration).</p> <p>Les caractéristiques de l'eau superficielle utilisée (rivière, La Canne) sont les suivantes : MES = 26 mg/L, pH = 7,1, conductivité = 124,6 µS/cm et COT = 11,4 mg/L.</p>
-----------	---

Composés	Rendement moyen (relatif) et écart-type (n=12)					pH de l'extraction
	5 ng/L	10 ng/L	20 ng/L	100 ng/L	1000 ng/L	
Acétamipride			98% (4%)	99% (4%)	98% (4%)	pH3
Clothianidine			106% (12%)	104% (4%)	101% (3%)	pH3
Imidaclopride			105% (5%)	104% (4%)	99% (4%)	pH3
Thiaclopride			96% (3%)	100% (2%)	96% (4%)	pH3
Thiaméthoxame			105% (7%)	102% (4%)	102% (3%)	pH3
Azithromycine			108% (8%)	107% (6%)	103% (4%)	pH10
Clarithromycine			101% (2%)	101% (1%)	101% (2%)	pH10
Erythromycine	106% (9%)		104% (4%)	104% (3%)	102% (4%)	pH10
Mercaptodiméthur		99% (7%)	101% (4%)	104% (2%)	101% (4%)	pH3
Oxadiazon			108% (14%)	110% (11%)	102% (4%)	pH3
Diclofénac		108% (21%)	103% (12%)	105% (4%)	100% (4%)	pH3

Pour confirmation des résultats :

- clarithromycine peut être quantifiée avec le protocole d'extraction à pH3 ;
- acétamipride, clothianidine, imidaclopride, thiaclopride, thiaméthoxame, mercaptodiméthur et oxadiazon peuvent être quantifiés avec le protocole d'extraction à pH10.

En complément de cette étude, les performances analytiques pour des eaux superficielles très chargées en MES ont été vérifiées avec 2 eaux superficielles ayant des teneurs en MES de 101 mg/L (COT = 6,7 mg/L) et 145 mg/L (COT = 3,8 mg/L) dopées à 100 ng/L en composés.

Limite de quantification (LQ)

5 ng/L pour l'érythromycine
20 ng/L pour l'azithromycine et l'oxadiazon
10 ng/L pour les autres composés
Validée selon la norme NF T90-210:2009 (plan B) par dopage des composés dans une eau superficielle.

Limite de détection (LD)

La limite de détection est obtenue en divisant la limite de quantification par 3.

Incertitudes (%) sur les résultats

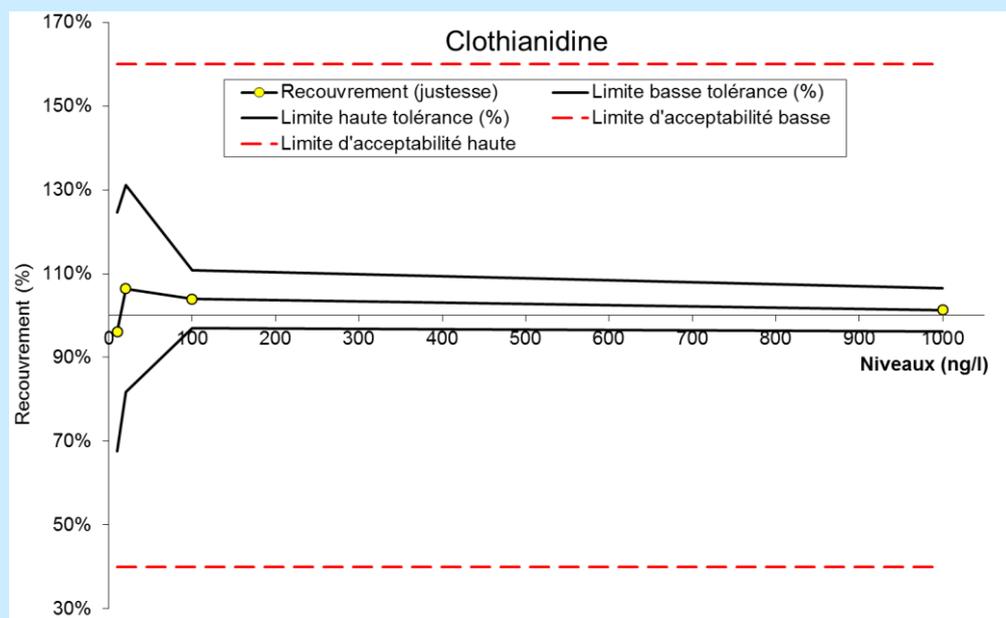
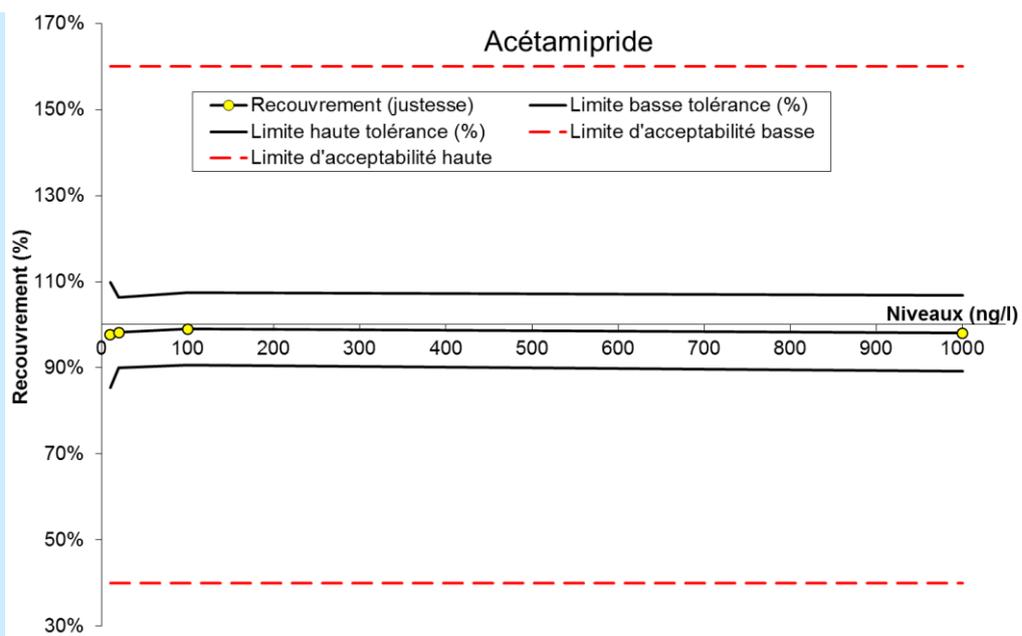
L'évaluation de l'incertitude est effectuée en utilisant la norme ISO 11352, par ajout des composés dans l'eau superficielle (La Canne) avec réalisation de deux réplicats pendant 6 jours différents à 3 niveaux de concentration. Elle prend en compte l'incertitude liée au biais et l'incertitude liée à la fidélité, ainsi qu'une composante liée à l'étude de stabilité. Elle est exprimée avec un facteur d'élargissement : $k=2$.

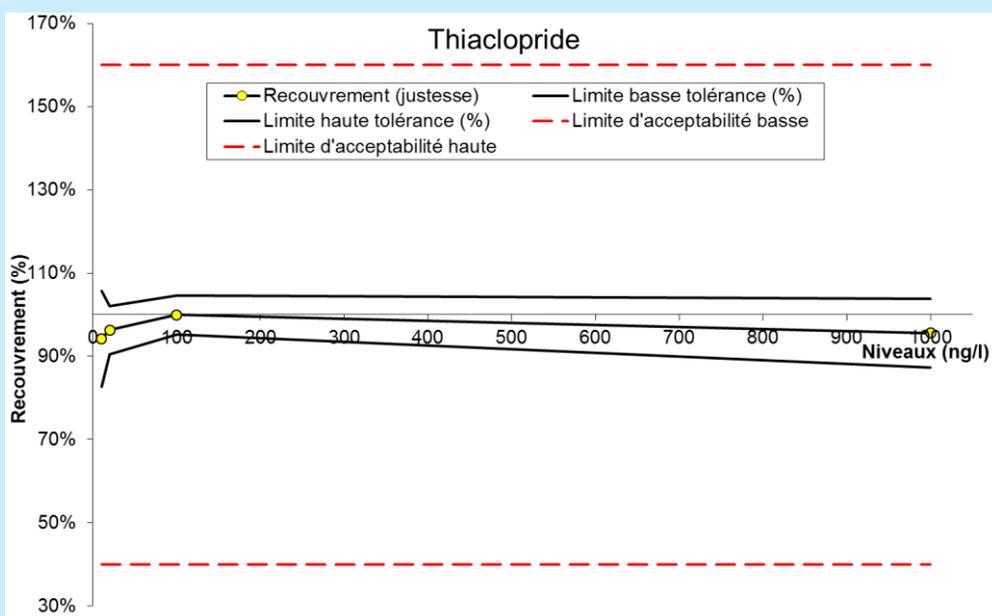
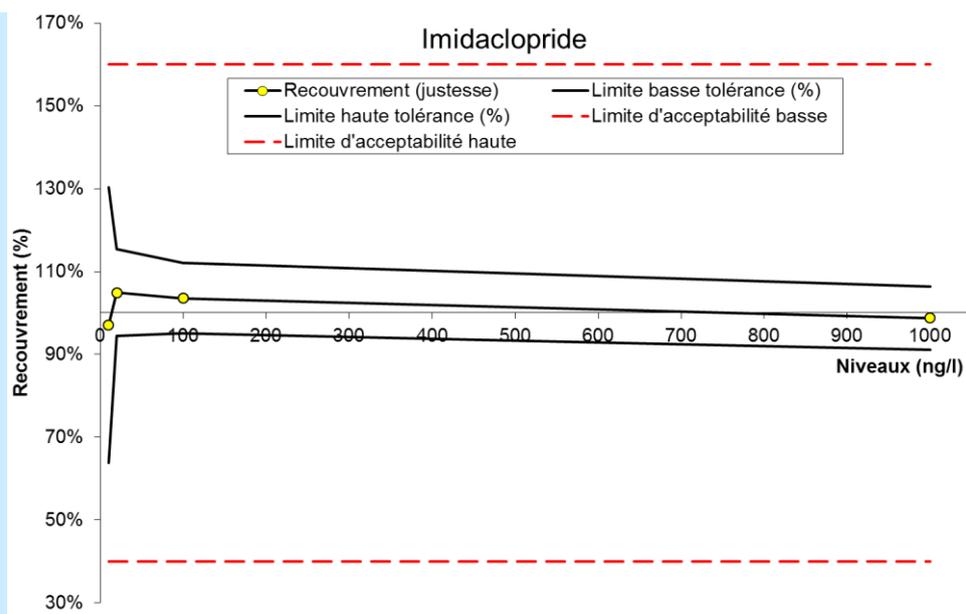
- par niveau de concentration

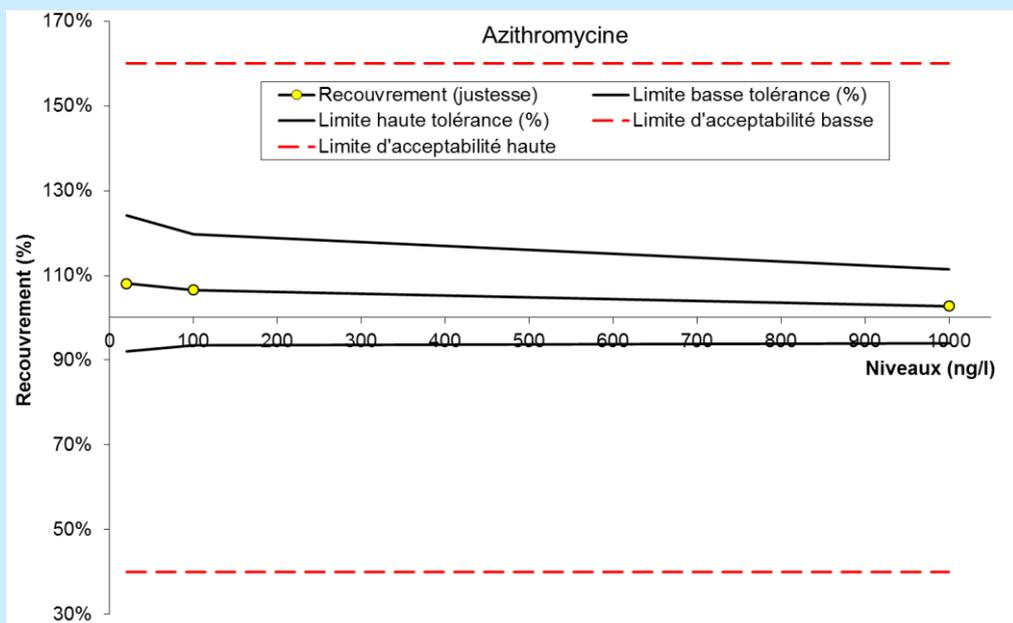
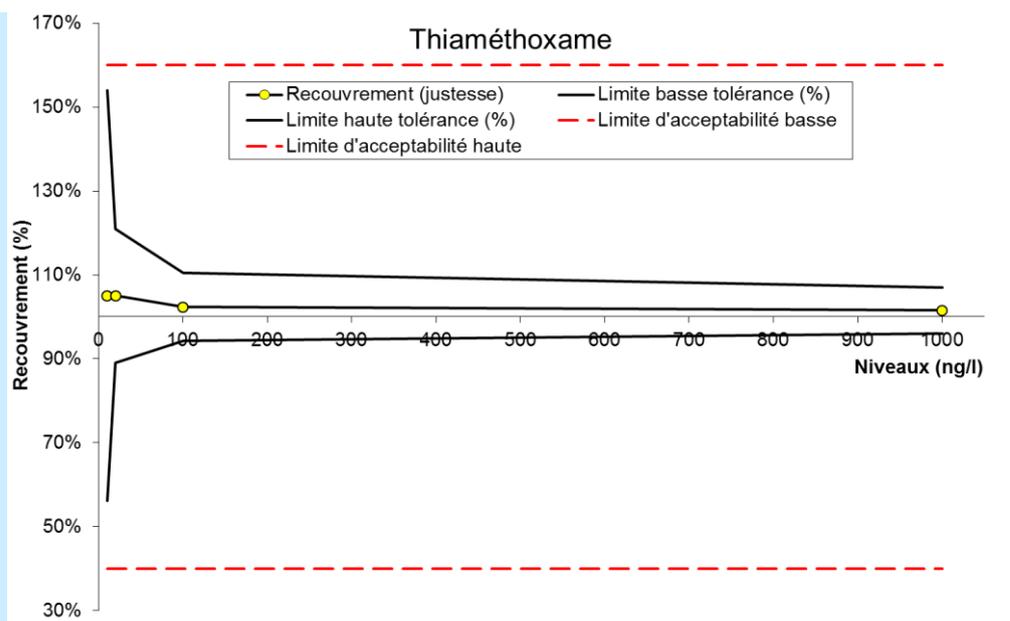
Composés	Incertitude relative élargie ($k=2$) (%)				
	5 ng/L	10 ng/L	20 ng/L	100 ng/L	1000 ng/L
Acétamipride		15	10	10	10
Clothianidine		35	30	15	10
Imidaclopride		40	15	15	10
Thiaclopride		20	15	15	15
Thiaméthoxame		55	20	10	10
Azithromycine			50	50	50
Clarithromycine	25		15	15	15
Erythromycine	25		15	15	15
Mercaptodiméthur		20	15	15	15
Oxadiazon			35	30	10
Diclofénac		45	30	15	10

- par molécule

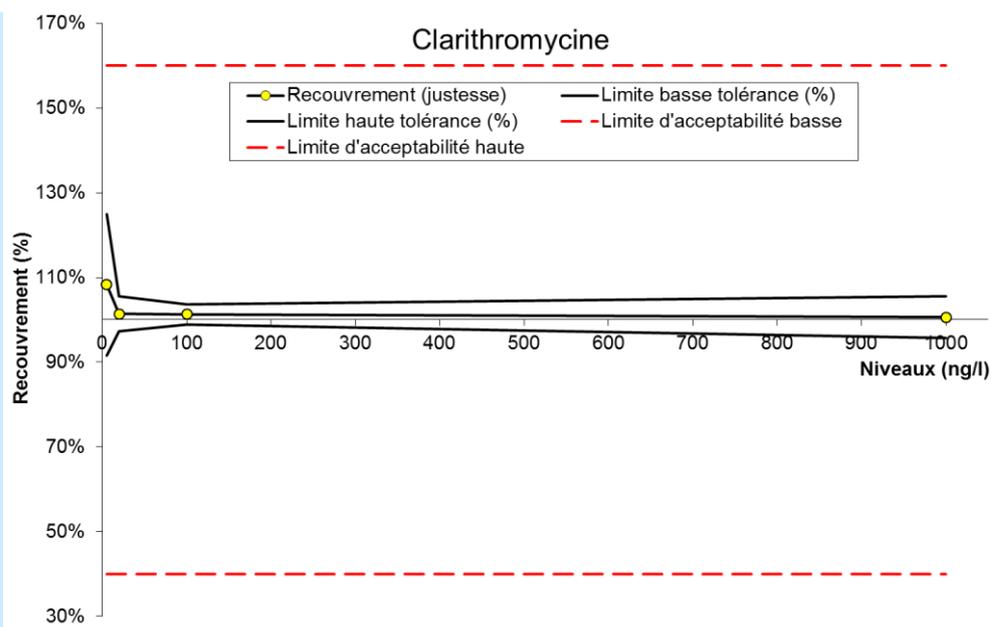
Profil d'exactitude :



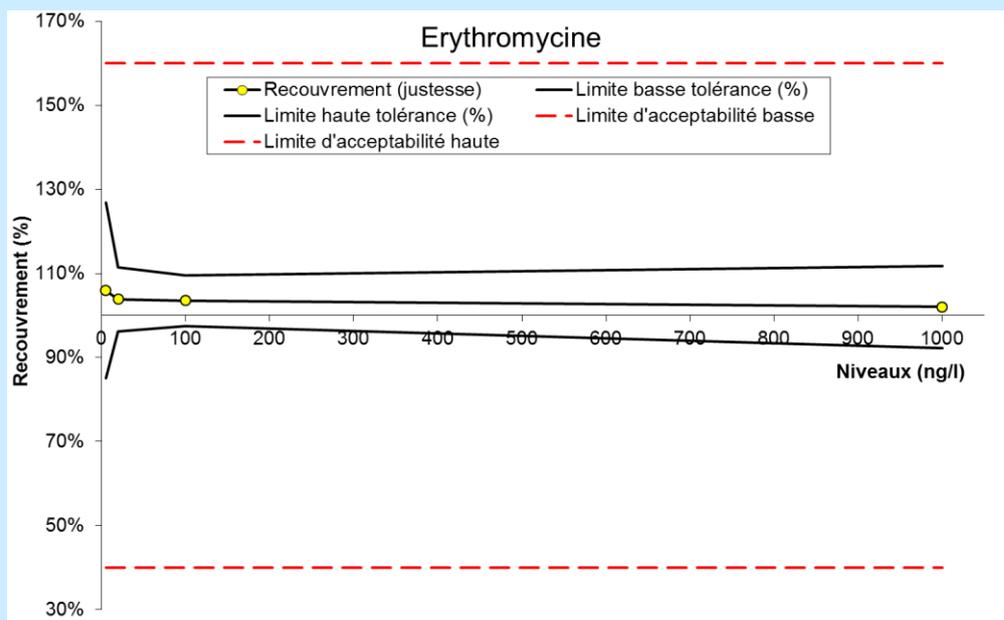


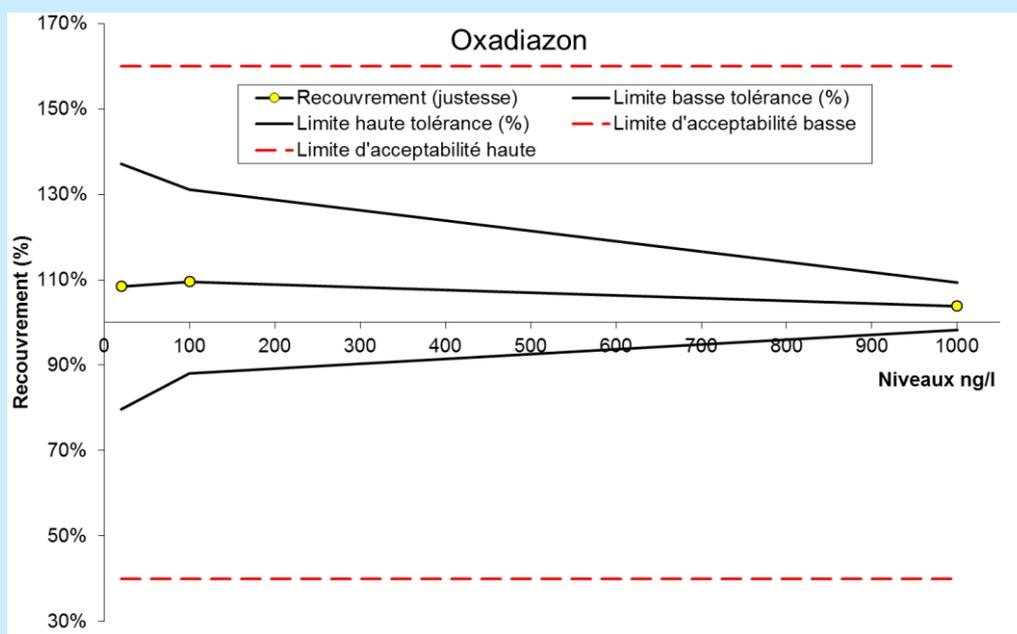
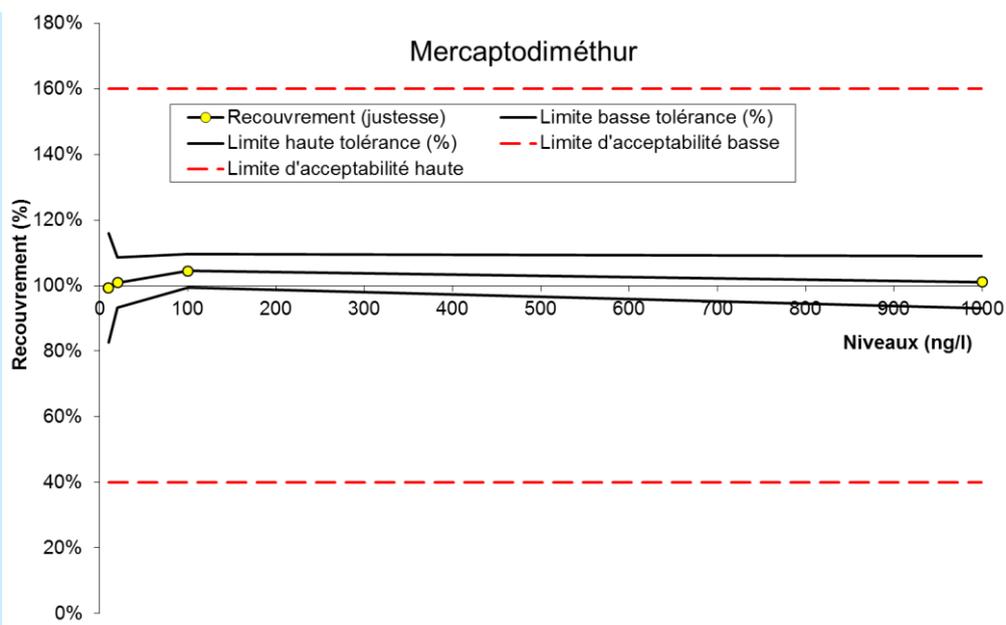


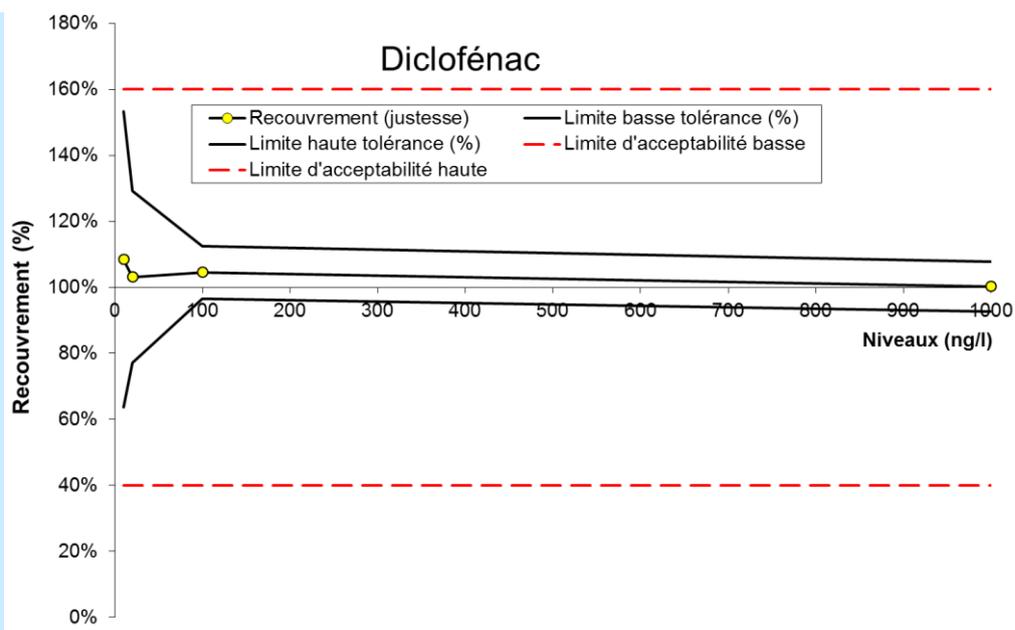
NB : le profil d'exactitude de l'azithromycine ne prend pas en compte l'étude de stabilité.



NB : le profil d'exactitude de la clarithromycine ne prend pas en compte l'étude de stabilité.







Contacts

Auteurs S. Bristeau et L. Amalric

Institut BRGM

Contacts s.bristeau@brgm.fr; l.amalric@brgm.fr