

Liste de vigilance 2024 : 18 composés

Azoxystrobine, Clindamycine, Clotrimazole, o-Desméthylvenlafaxine, Diflufénican, Dimoxystrobine, Fipronil, Fluconazole, Metconazole, Miconazole, Octocrylène, Ofloxacine, Penconazole, Prochloraze, Tébuconazole, Tétraconazole, Triméthopprime, Venlafaxine

Méthode d'analyse dans les eaux

Généralités	2
Protocole analytique	3
— Prétraitement.....	3
— Analyse	4
Références de la méthode	8
Paramètres de validation de la méthode	8
Contacts	13

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.

Généralités

■ Nom de la famille de substances

Antibiotiques : Clindamycine, Ofloxacine et Triméthoprim

Filtre UV : Octocrylène

Fongicides : Azoxystrobine, Clotrimazole, Fluconazole, Metconazole, Miconazole, Penconazole, Prochloraze, Tébuconazole, Tétraconazole et Dimoxystrobine

Herbicides : Diflufénican

Insecticides : Fipronil

Psychotropes : Venlafaxine et o-Desméthylvenlafaxine

■ Nom des substances individuelles

Azoxystrobine	Miconazole
Clindamycine	Octocrylène
Clotrimazole	Ofloxacine
o-Desméthylvenlafaxine	Penconazole
Diflufénican	Prochloraze
Dimoxystrobine	Tébuconazole
Fipronil	Tétraconazole
Fluconazole	Triméthoprim
Metconazole	Venlafaxine

■ Code SANDRE des substances individuelles

Azoxystrobine	[1951]	Miconazole	[7130]
Clindamycine	[6792]	Octocrylène	[6686]
Clotrimazole	[5360]	Ofloxacine	[6533]
o-Desméthylvenlafaxine	[6785]	Penconazole	[1762]
Diflufénican	[1814]	Prochloraze	[1253]
Dimoxystrobine	[5748]	Tébuconazole	[1694]
Fipronil	[2009]	Tétraconazole	[1660]
Fluconazole	[8564]	Triméthoprim	[5357]
Metconazole	[1879]	Venlafaxine	[7611]

■ Matrice analysée

Eau [3] :

- Eau douce de surface
- Eau souterraine

■ Principe de la méthode

L'échantillon subit une extraction sur phase solide (SPE Disk). L'extrait reconcentré est transféré dans un mélange de solvants compatible avec son analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (code méthode SANDRE [1569]).

Remarques :

- Les composés suivants sont également analysables selon la fiche méthode Aquaref MA88-1 : Metformine et Guanylurée
- Les composés suivants sont également analysables selon la fiche méthode Aquaref MA-88-2 : Azoxystrobine, Diflufenican et Octocrylène
- Les composés suivants sont également analysables selon la fiche méthode Aquaref MA-85-1 : Clotrimazole, Dimoxystrobine, Fluconazole, Metconazole, Miconazole, Penconazole, Prochloraze, Tébuconazole, Tétraconazole, Triméthoprime
- Les composés suivants sont également analysables selon la fiche méthode Aquaref MA-85-2 : Clotrimazole, Dimoxystrobine, Fluconazole, Metconazole, Miconazole, Penconazole, Prochloraze, Tébuconazole, Tétraconazole, Triméthoprime, Venlafaxine, o-Desméthylvenlafaxine

■ Acronyme

SPE DISK-LC-MSMS [1569]

■ Domaine d'application

Selon le paramètre considéré : de la limite de quantification jusqu'à 2000 ng/L (sur la base de 1 L de prise d'essai concentrée à 100 µL).

La méthode est validée jusqu'à un seuil de 50 mg/L de matière en suspension (MES) et jusqu'à un seuil de 7 mg/L de DOC.

■ Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse

/

■ / Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode :

/

■ Interférents (préciser la matrice)

- Interférents identifiés : pas d'interférents identifiés lors des essais de validation
- Matrices testées : eaux de surface

Protocole analytique

— Prétraitement

■ Fraction analysée

Eau :

- Eau brute [23]

■ Conditionnement et conservation des échantillons

En respect des recommandations du JRC ISPRA pour la mise en œuvre de la Watch List au niveau des Etats Membres et des décisions prises au niveau national, aucune spécification de conditionnement/stabilisation n'a été mise en place. Cependant, une étude de stabilité a été réalisée.

| Protocole

Les échantillons sont conservés à l'obscurité à 4 ± 3 °C.

| Nature du contenant de stockage

Bouteille en verre ambré.

| Lavage du contenant

Les bouteilles sont lavées puis calcinées à 500 °C.

| Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température...)

Une étude de stabilité pseudo-isochrone sur 96 heures (T0, T48h, T96h), à 4 ± 3 °C, a été réalisée sur une matrice représentative, de l'eau de Seine brute.

Aucune instabilité n'a été observée pour l'ensemble des substances pour un EMA fixé à 20 %. Il est cependant recommandé :

- D'extraire les échantillons dans les 48 heures suivant le prélèvement (dès réception au laboratoire).
- De les stocker dans des contenants en verre ambré, à l'abri de la lumière, à une température contrôlée (4 ± 3 °C).

■ Filtration

Aucune filtration n'est à effectuer.

■ Pré-traitement des échantillons liquides ou solides

Aucun pré-traitement n'est à effectuer.

— Analyse

■ Volume ou masse de la prise d'essai (mL ou mg selon la phase analysée)

Eau :

- Eau douce surface : 1 L
- Eau souterraine : 1 L

■ Extraction**| SPE DISK**

Avant extraction, 100 µL d'une solution contenant les composés marqués à une concentration d'environ 500 ng/mL et laisser homogénéiser 30 min à 1 h. Ensuite, 0,1 % d'EDTA (0,1 N)¹ (v/v) est ajouté à l'échantillon par volumétrie.

Extraction automatique SPE-DEX® 4790 (Horizon Technology) sur support d'extraction C18 Atlantic® SPE Disks (Biotage).

¹ Des agents chélatants comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) se complexent avec les métaux dans la solution et permettent d'éviter la formation de complexes entre les composés recherchés et ces métaux qui s'adsorbent sur les groupements silanols libres des bouteilles en verre. L'ajout d'EDTA augmente les taux de recouvrement des analytes.

Étape	Solvant	Nombre de cycles	Temps de mouillage	Temps de séchage
Rinçage	MeOH	1	90 s	30 s
	Eau	2	60 s	
Dépôt de l'échantillon	1 L d'échantillon			
Rinçage	Eau			
Séchage	10 min			
Elution	MeOH	2	90 s	30 s
	MeOH	1	90 s	90 s

L'éluat est ensuite évaporé à l'aide d'un concentrateur automatique SpeedVac® et repris dans 100 µL d'un mélange 70/30 eau ultra-pure (EUP)/acétonitrile (ACN).

■ Conservation de l'extrait

Les extraits peuvent être conservés à -20 ± 5 °C. La durée maximale de conservation des extraits n'a pas fait l'objet de test dans le cadre de ce travail.

■ Volume ou masse finale avant analyse

100 µL d'un mélange EUP/ACN (70/30 (v/v)).

■ Méthode analytique utilisée

Paramètres chromatographiques

La colonne sélectionnée est une colonne BEH C18 (2,1 × 100 mm, 1,7 µm) chauffée à 40 °C. Le gradient utilisé, composé d'eau ultra-pure avec 0,1 % d'acide formique et d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique est présenté ci-dessous. Le débit fixé est de 0,4 mL/min et le volume injecté est de 15 µL. Le passeur d'échantillon est réfrigéré à une température de 10 °C.

Temps (min)	EUP + 0,1 % acide formique	ACN + 0,1 % acide formique
0	95	5
2	95	5
8	1	99
10	1	99
10,5	95	5
15	95	5

Paramètres du spectromètre de masse et paramètres de détection

Les paramètres du spectromètre de masse et paramètres de détection sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Mode d'ionisation	ESI + / ESI -
Tension du capillaire	3 kV / 2 kV
Température de la source	150 °C
Gaz de désolvatation	Azote
Température du gaz de désolvatation	650 °C
Débit du gaz de désolvatation	1000 L/h
Gaz de collision	Argon
Pression cellule de collision	$3,5 \cdot 10^{-3}$ mbar
Débit cône	50 L/h

Paramètres de détection

Les conditions d'ionisation et de fragmentation sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Composés	Temps de rétention	Tension de cône (V)	Transition 1 (CE en V)	Transition 2 (CE en V)
Azoxystrobine	6,3	20	404,2 > 372,2 (16)	404,2 > 344,2 (24)
Azoxystrobine D₄	6,3	20	408,2 > 376,2 (14)	408,2 > 348,2 (28)
Clindamycine	4,4	30	425,3 > 126,2 (30)	425,3 > 377,3 (22)
Clindamycine ¹³C D₃	4,4	30	429,3 > 130,2 (30)	429,3 > 381,3 (20)
Clotrimazole²	5,4	30	277,1 > 165 (20)	277,1 > 241,2 (26)
Clotrimazole D₅	5,4	25	282,2 > 170,1 (24)	282,2 > 246,1 (28)
Diflufénican	7,3	20	395 > 266,1 (22)	395 > 375,1 (18)
Diflufénican D₃	7,3	30	398,2 > 268,1 (24)	398,2 > 248,1 (36)
Dimoxystrobine	6,7	10	327,2 > 116 (22)	327,2 > 205,1 (12)
Fipronil	6,8	20	435,1 > 330,1 (16)	435,1 > 250 (26)
Fipronil ¹³C₂ ¹⁵N₂	6,8	20	439,1 > 334,1 (16)	439,1 > 403,1 (10)
Fluconazole	4,1	20	307,2 > 238,2 (16)	307,2 > 220,1 (16)
Fluconazole D₄	4,1	22	311,2 > 242,1 (16)	311,2 > 223,1 (18)
Metconazole	6,7	25	320,2 > 70 (20)	320,2 > 125 (34)
Metconazole D₆	6,7	30	326,2 > 70 (20)	326,2 > 125 (40)
Miconazole	6,0	30	417,1 > 160,9 (26)	417,1 > 158,9 (26)
Miconazole nitrate D₅	6,0	40	422,1 > 161,1 (28)	422,1 > 163,1 (28)
Octocrylène	8,3	15	362,3 > 250,1 (10)	362,3 > 232,2 (20)
Octocrylène ¹³C₃	8,3	15	365,3 > 253,1 (12)	365,3 > 235,2 (22)
o-Desméthylvenlafaxine	3,9	22	264,3 > 58 (17)	264,3 > 246,1 (12)
o-Desméthylvenlafaxine D₆	3,9	22	270,4 > 58,1 (17)	270,4 > 252,3 (12)
Ofloxacin	3,8	30	362,2 > 318,3 (18)	362,2 > 261,2 (26)
Ofloxacin D₈	3,8	30	370,3 > 326,3 (20)	370,3 > 265,2 (26)
Penconazole	6,7	20	284,1 > 70 (16)	284,1 > 159 (30)
Penconazole D₇	6,7	20	291,1 > 71,1 (16)	291,1 > 160 (26)
Prochloraz	6,1	15	376 > 308 (12)	376 > 70 (22)
Prochloraz D₄	6,1	15	384 > 316 (12)	384 > 74 (26)
Tébuconazole	6,5	25	308,2 > 70 (20)	308,2 > 125 (32)
Tébuconazole D₉	6,5	25	317,2 > 70 (20)	317,2 > 125 (30)
Tétraconazole	6,4	25	372,1 > 158,9 (26)	372,1 > 70 (20)
Triméthoprim	3,7	40	291,1 > 230,1 (22)	291,1 > 123,1 (26)
Triméthoprim D₉	3,7	30	300,2 > 234,1 (24)	300,2 > 123 (26)
Venlafaxine	4,5	20	278,2 > 58 (18)	278,2 > 260 (14)
Venlafaxine D₆	4,5	20	284 > 58,1 (17)	284 > 266,2 (14)

■ **Equipements³ (modèles utilisés)**

Chromatographe ultra haute pression Acquity® (Waters)

² L'ion père ne correspond pas à l'ion [M+H⁺]

³ 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

Spectromètre de masse en tandem (triple quadripôle) XEVO-TQ MS® (Waters) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring).

▪ Type d'étalonnage

Dilution isotopique, c'est à dire étalonnage interne avec analogue marqué à l'exception de la dimoxystrobine et le tétraconazole pour lesquels il n'existe pas d'analogue marqué. Pour ces molécules la quantification est réalisée par étalonnage interne à l'aide du tébuconazole D₉.

▪ Modèle utilisé

Modèle linéaire pour tous les composés.

▪ Etalons / Traceurs utilisés

Dilution isotopique (analogues marqués au deutérium ou au carbone 13 ou azote 15) avec les étalons du tableau ci-dessous.

Composé non marqué	Composé marqué associé
Azoxystrobine	Azoxystrobine D ₄
Clindamycine	Clindamycine ¹³ C D ₃
Clotrimazole	Clotrimazole D ₅
Diflufénican	Diflufénican D ₃
Dimoxystrobine	Tébuconazole D ₉
Fipronil	Fipronil ¹³ C ₂ ¹⁵ N ₂
Fluconazole	Fluconazole D ₄
Metconazole	Metconazole D ₆
Miconazole	Miconazole D ₅
Octocrylène	Octocrylène ¹³ C ₃
o-Desméthylvenlafaxine	o-Desméthylvenlafaxine D ₆
Ofloxacin	Ofloxacin D ₈
Penconazole	Penconazole D ₇
Prochloraz	Prochloraz D ₄
Tébuconazole	Tébuconazole D ₉
Tétraconazole	Tébuconazole D ₉
Triméthoprim	Triméthoprim D ₉
Venlafaxine	Venlafaxine D ₆

▪ Domaine de concentration

Étalonnage de 0,5 à 1250 ng/mL. Pour certains composés comme la o-desméthylvenlafaxine et la venlafaxine, il peut être nécessaire de séparer ce domaine de concentration en deux et de faire deux gammes (une gamme basse et une gamme haute avec un point central commun).

▪ Méthodes de calcul des résultats

Des contrôles qualité : blancs et échantillons dopés sont mis en œuvre à chaque série d'analyses.

| Rendement

Sans objet, les étalons internes marqués permettent de corriger les concentrations déterminées en tenant compte du rendement.

| Blancs

- Appareillage : Solvants d'injection tout au long de la séquence d'analyse.
- Méthode : Application de toute la méthode sur de l'eau d'Evian®
- Soustraction du blanc : Non. Lorsque l'ensemble du processus de mesure est maîtrisé, les valeurs typiques de blanc sont inférieures à la LQ. Si une contamination des blancs instrumentaux est mise en évidence, les extraits sont réinjectés. Si le blanc méthode est > LQ, la série analytique est invalidée.

Références de la méthode

■ La méthode est dérivée de la publication suivante

/

■ Norme dont est tirée la méthode

/

■ Niveau de validation selon Norman

Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode

■ Norme utilisée

- NF T 90 210 (2018) Caractérisation des performances initiales de la méthode
- NF ISO 11352 (2013) Estimation de l'incertitude de mesure basée sur des données de validation et de contrôle qualité

■ Domaine de validation

De la limite de quantification (LQ) jusqu'à $10 \times LQ$

■ Matériaux de référence utilisés

Il n'existe pas de matériau de référence certifié à matrice pour les paramètres visés par cette méthode.

■ Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)

Des blancs de méthode et blancs instrumentaux sont mis en œuvre lors de chaque série d'extractions et d'analyses. Lorsque que l'ensemble du processus de mesure est maîtrisé, les valeurs typiques de blanc sont inférieures à la LQ. Si une contamination des blancs instrumentaux est mise en évidence, les extraits sont réinjectés. Si le blanc méthode est supérieur à la LQ, la série analytique est invalidée.

■ Rendement

L'étude de rendement (ou taux de recouvrement) est réalisée dans des conditions de fidélité intermédiaire avec 3 eaux dopées chacune à trois niveaux de concentration en triplicat (3 matrices $\times$ 3 niveaux $\times$ 3 réplicats).

Les matrices utilisées sont préparées à partir de l'eau d'Evian® :

- Evian® seule
- Evian® avec ajout de 3 mg/L de COD
- Evian® avec ajout de 7 mg/L de COD et 50 mg/L de MES.

Les niveaux de concentration testés sont :

- Le niveau de concentration de la LQ associé à chaque composé
- 3 x LQ
- 10 x LQ.

Les 3 eaux sont traitées indépendamment sur 3 jours différents.

Les rendements relatifs correspondent aux rendements corrigés à l'aide des étalons internes

| Par niveau de concentration

	LQ (ng/L)	Rendement relatif moyen (%) et écart-type (n = 9)		
		LQ	3 x LQ	10 x LQ
Azoxystrobine	10	100 (2)	97 (5)	97 (5)
Clindamycine	15	99 (2)	94 (5)	101 (4)
Clotrimazole	7	94 (3)	92 (7)	96 (3)
Diflufenican	3	100 (9)	98 (13)	105 (8)
Dimoxystrobine	10	97 (3)	96 (12)	94 (10)
Fipronil	0,3*	99 (24)*	88 (17)	94 (11)
Fluconazole	10	93 (2)	90 (6)	92 (3)
Metconazole	10	97 (6)	93 (8)	97 (5)
Miconazole	10	91 (6)	87 (6)	95 (3)
Octocrylène	50	99 (11)	95 (10)	99 (4)
o-Desméthylvenlafaxine	2	101 (18)	97 (11)	105 (4)
Ofloxacin	8	120 (14)	99 (12)	99 (1)
Penconazole	10	98 (5)	95 (4)	97 (3)
Prochloraz	10	100 (2)	97 (7)	99 (4)
Tébuconazole	10	99 (1)	94 (5)	92 (4)
Tétraconazole	10	102 (6)	93 (6)	94 (6)
Triméthoprim	5	99 (7)	98 (2)	105 (9)
Venlafaxine	2	87 (11)	92 (4)	92 (7)

* Attention, la LQ du fipronil n'a pas été validée (voir partie Incertitudes).

■ Limite de quantification (LQ)

La limite de quantification a été vérifiée par dopage dans 3 eaux, en triplicat (voir rendement).

Composé non marqué	LQ (ng/L) (n = 9)
Azoxystrobine	10
Clindamycine	15
Clotrimazole	7
Diflufenican	3
Dimoxystrobine	10
Fipronil*	0,9*

Composé non marqué	LQ (ng/L) (n = 9)
Fluconazole	10
Metconazole	10
Miconazole	10
Octocrylène	50
o-Desméthylvenlafaxine	2
Ofloxacin	8
Penconazole	10
Prochloraz	10
Tébuconazole	10
Tétraconazole	10
Triméthoprim	5
Venlafaxine	2

* Attention, la LQ testée à 0,3 ng/L pour le fipronil n'a pas été validée (voir partie Incertitudes). La plus petite concentration validée est donc considérée comme la LQ.

■ Incertitudes (%) sur les résultats

Méthode d'évaluation : NF ISO 11352

Facteur d'élargissement : k = 2

| Par molécule et par niveau de concentration

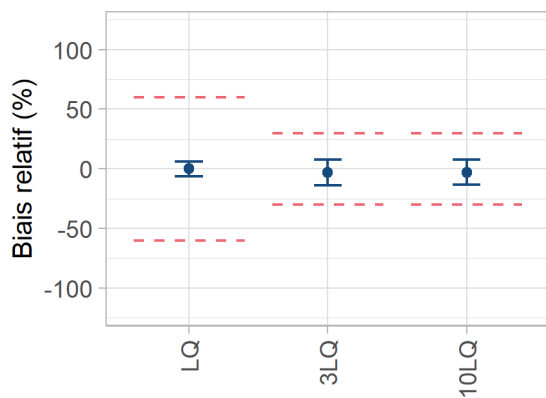
Concernant le fipronil, l'exactitude n'est pas validée à la LQ et à 3 x LQ. Au vu des résultats, il a été décidé de valider une nouvelle LQ à 0,9 ng/L. En fixant un EMA de 60 % à ce niveau de concentration, cette dernière est validée.

	LQ (ng/L)	Incertitudes (%) (n = 9)		
		LQ	3 x LQ	10 x LQ
Azoxystrobine	10	15	15	15
Clindamycine	15	20	20	20
Clotrimazole	7	25	25	10
o-Desméthylvenlafaxine	2	50	30	15
Diflufenican	3	30	30	25
Dimoxystrobine	10	35	35	15
Fipronil*	0,3*	80*	60	35
Fluconazole	10	25	25	20
Metconazole	10	25	25	15
Miconazole	10	30	30	15
Octocrylène	50	35	35	20
Ofloxacin	8	60	35	25
Penconazole	10	15	15	10
Prochloraz	10	20	20	10
Tébuconazole	10	20	20	20
Tétraconazole	10	25	25	25
Triméthoprim	5	30	30	30
Venlafaxine	2	45	30	30

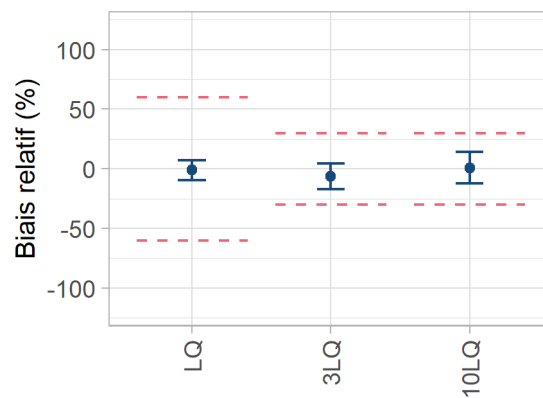
* Attention, la LQ testée à 0,3 ng/L pour le fipronil n'a pas été validée. La plus petite concentration validée est donc considérée comme la LQ.

Profils d'exactitude

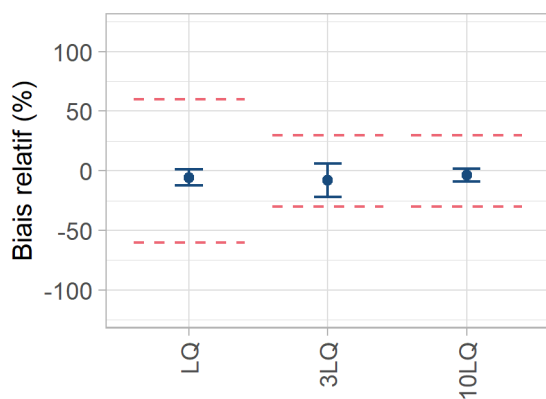
Azoxystrobine



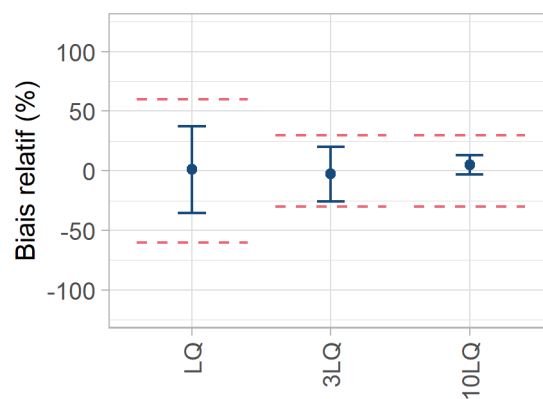
Clindamycine



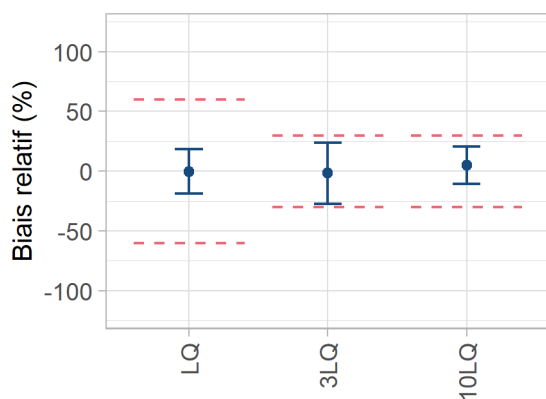
Clotrimazole



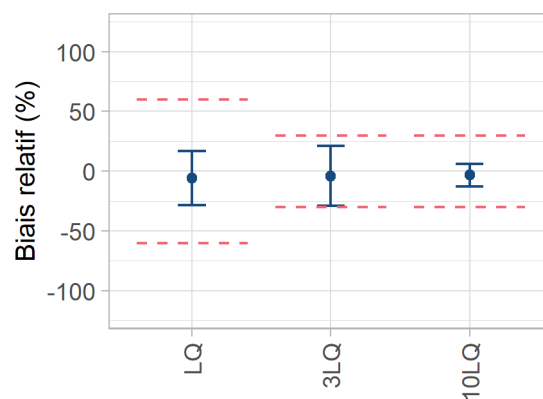
O-desméthylvenlafaxine

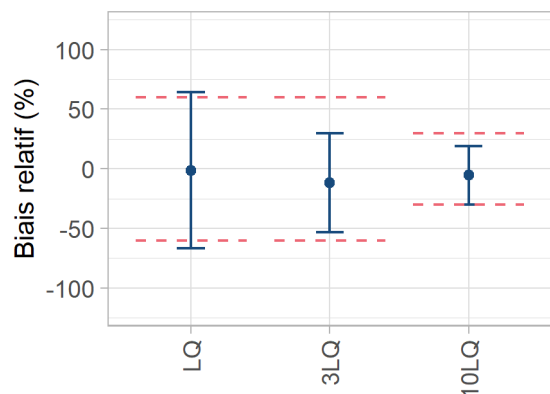
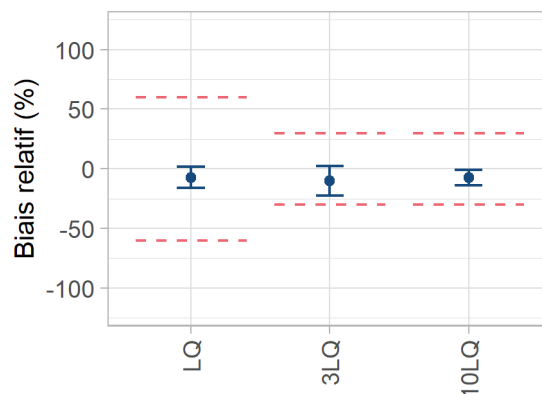
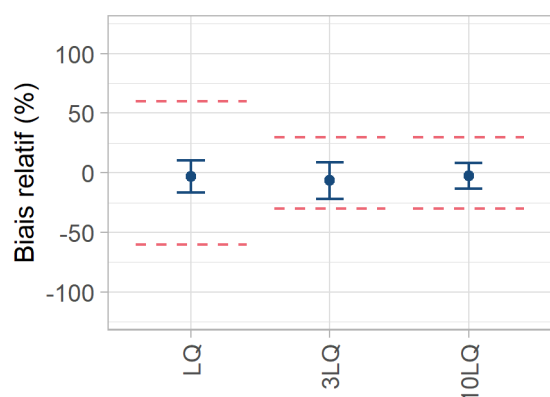
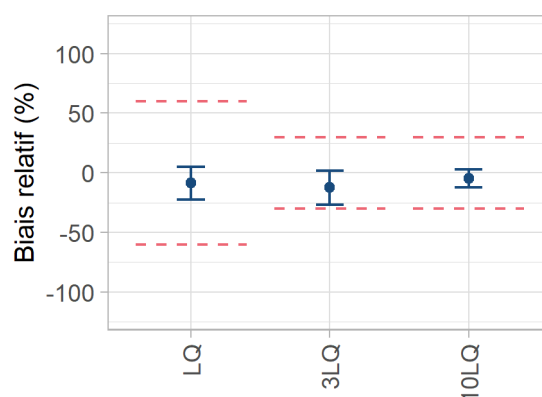
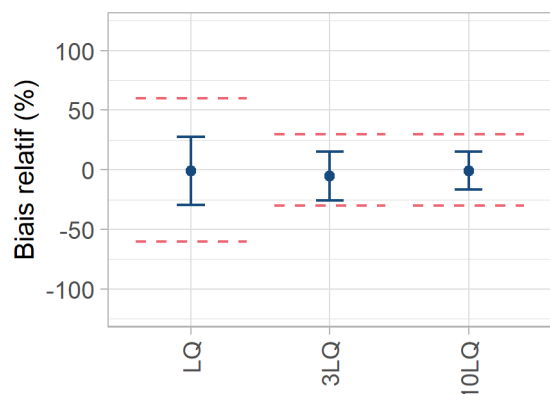
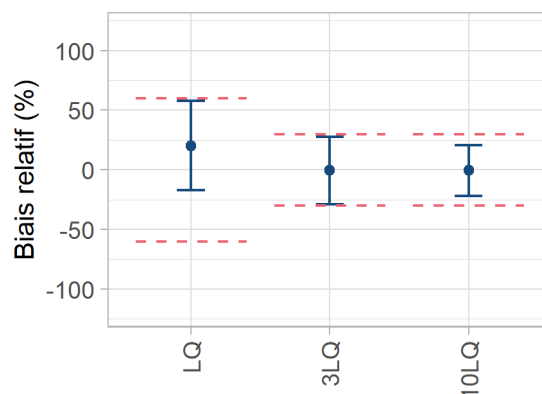
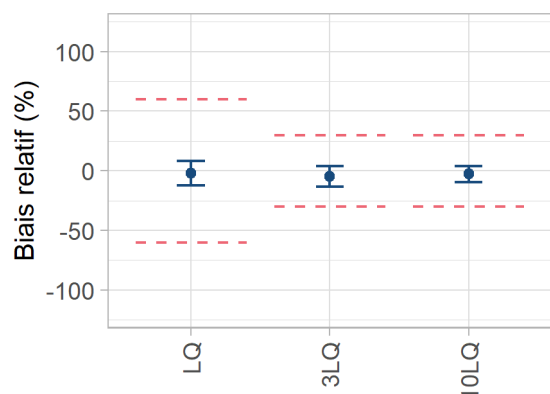
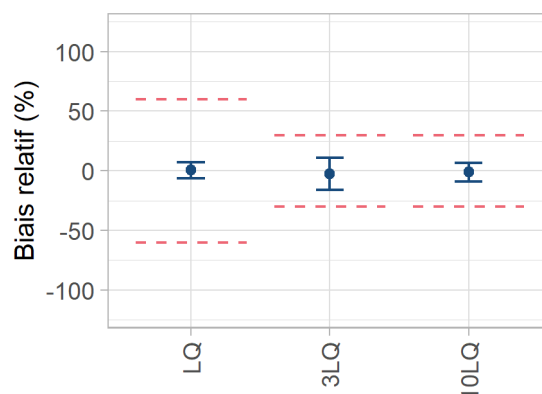


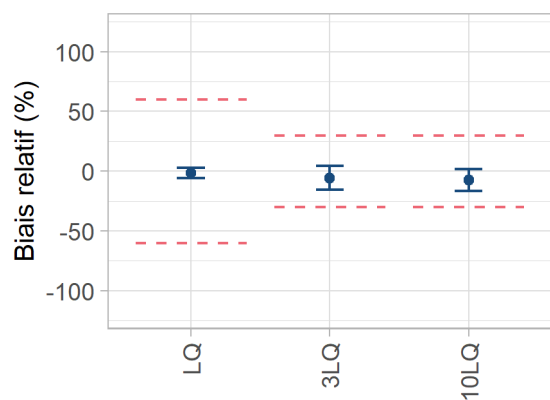
Diflufenican



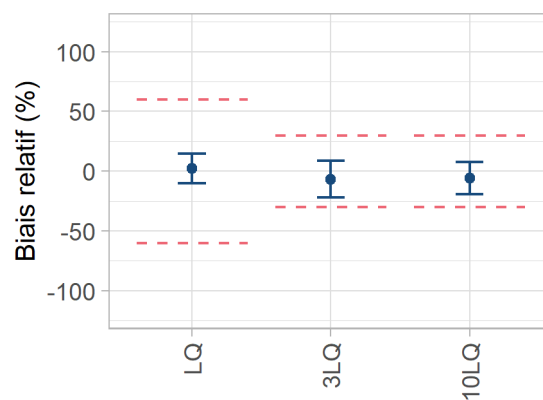
Dimoxystrobine



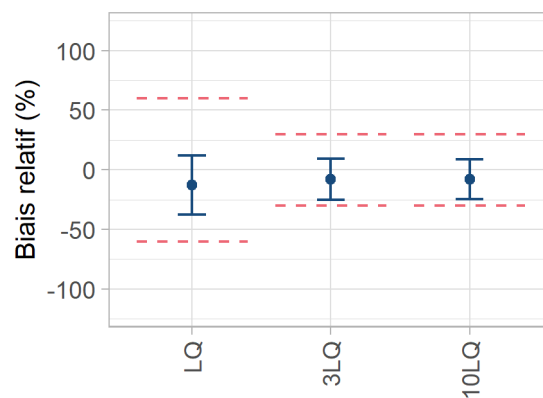
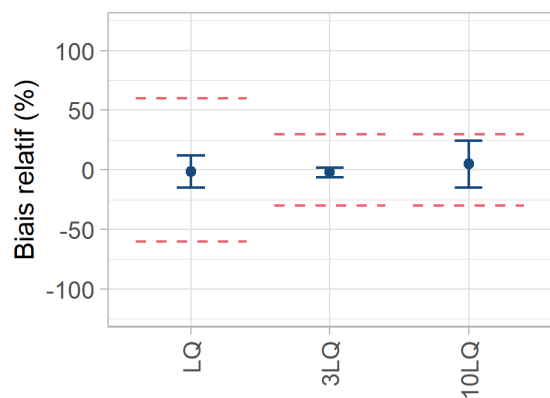
Fipronil – LQ non validée**Fluconazole****Metconazole****Miconazole****Octocrylène****Ofloxacine****Penconazole****Prochloraze****Tébuconazole****Tétraconazole**



Triméthoprimine



Venlafaxine



Contacts

■ Auteurs

Bertille BONNAUD, Carine FALLOT, Béatrice LALERE, Véronique LE DIOURON (LNE)

■ Contact

bertille.bonnaud@lne.fr

■ Partenaire

BRGM