

Janvier 2023

Réf. : MA-85.2

Liste de vigilance 2022 : 15 composés

Clotrimazole, Fluconazole, Imazalil, Ipconazole, Metconazole, Miconazole, Penconazole, Prochloraze, Tebuconazole, Tétraconazole, Dimoxystrobine, Famoxadone, Triméthoprime, Venlafaxine, O-desméthylvenlafaxine

Méthode d'analyse dans les eaux

Généralités	2
Protocole analytique	3
— Prétraitement	3
— Analyse	3
Références de la méthode	6
Paramètres de validation de la méthode	6
Contacts	11

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

Antibiotique : Triméthoprim

Fongicides : Clotrimazole, Fluconazole, Imazalil, Ipconazole, Metconazole, Miconazole, Penconazole, Prochloraze, Tébuconazole, Tétraconazole, Dimoxystrobine et Famoxadone

Psychotrope : Venlafaxine et O-desméthylvenlafaxine

■ Nom des substances individuelles

Clotrimazole	Miconazole	Dimoxystrobine
Fluconazole	Penconazole	Famoxadone
Imazalil	Prochloraze	Triméthoprim
Ipconazole	Tébuconazole	Venlafaxine
Metconazole	Tétraconazole	O-desméthylvenlafaxine

■ Code SANDRE des substances individuelles

Clotrimazole	[5360]	Tébuconazole	[1694]
Fluconazole	[8564]	Tétraconazole	[1660]
Imazalil	[1794]	Dimoxystrobine	[5748]
Ipconazole	[7508]	Famoxadone	[2020]
Metconazole	[1879]	Triméthoprim	[5357]
Miconazole	[7130]	Venlafaxine	[7611]
Penconazole	[1762]	O-desméthylvenlafaxine	[6785]
Prochloraze	[1253]		

■ 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 solvant compatible avec son analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

NB : concernant l'ensemble des composés de la liste de vigilance 2022

- Les composés métaflumizone et sulfaméthoxazole sont analysables selon la fiche méthode Aquaref MA-85.1.
- Les composés amoxicilline et ciprofloxacine sont analysables selon la fiche méthode Aquaref MA-83.
- Tous les composés de cette fiche, à l'exception de O-desméthylvenlafaxine et triméthoprim sont également analysables selon la fiche méthode Aquaref MA-85.1.

■ Acronyme

SPE DISK/LC/MSMS

■ Domaine d'application

Selon le paramètre considéré : de la limite de quantification jusqu'à 500 ng de composé /L (sur la base de 500 mL de prise d'essai concentrée à 500 µL)

- **Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse**
 - MES
 - La méthode est validée jusqu'à un seuil de 50 mg L^{-1} de MES.
- **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.

Une étude de stabilité sur 96 heures (T0, T48h, T96h), $5 \pm 3^\circ\text{C}$, a été réalisée sur une matrice représentative : Eau de Seine brute.

A l'exception de la famoxadone pour laquelle une perte de 22% à 48h et 33% à 96h est observée, aucune instabilité n'est observée pour l'ensemble des autres substances pour un EMA fixé à 20%.

En conséquence, il est recommandé de :

- extraire les échantillons dans les 48 heures suivant le prélèvement (dès réception au laboratoire).
- les stocker dans des contenants en verre ambré, à l'abri de la lumière, à une température contrôlée ($5 \pm 3^\circ\text{C}$).

- **Filtration**

Pas de filtration

— Analyse

- **Volume ou masse de la prise d'essai**

500 mL

- **Extraction**

3% d'EDTA(0,1N)¹ (v/v) est ajouté par volumétrie à l'échantillon.

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

		Nombre de cycles	Temps de mouillage	Temps de séchage
Rinçage	MeOH	1	90s	30s
	Eau	2	60s	
Dépôt de l'échantillon	500 mL d'échantillon			
Rinçage	Eau			
Séchage	10 min			
Elution	MeOH	2	90s	30s
Elution	MeOH	1	90s	90s

L'éluat est évaporé à l'aide d'un concentrateur automatique SpeedVac®.

¹ Des agents chélatant 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.

■ Conservation de l'extrait

Les extraits peuvent être conservés à -20 ± 5 °C. Aucune instabilité n'a été mise en évidence sur période de 10 jours (délai supérieur non étudié).

■ Volume ou masse finale avant analyse

500 µL d'un mélange eau ultrapure-acétonitrile (70/30 (v/v)).

Dans le mélange eau ultrapure-acétonitrile (70/30), une instabilité (perte de l'ordre de 30 %) a été observée pour le Miconazole en 24 heures en cas d'absence de réfrigération du passeur automatique LC.

■ Méthode analytique utilisée

Paramètres chromatographiques :

Colonne : phase inverse greffée BEH C18 1,7 µm 2,1*100 mm (Waters)

Température : 25°C

Elution en mode gradient :

Temps (min)	Phase mobile	
	H ₂ O	ACN
	(0,1% Acide Formique; v/v)	(0,1% Acide Formique ; v/v)
0	95	5
2	95	5
8	1	99
10	1	99
10,5	95	5
15	95	5

Débit : 0,4 mL min⁻¹

Volume injecté : 15 µL.

Paramètres du spectromètre de masse :

Mode d'ionisation : électrospray en mode positif (ESI+)

Tension du capillaire : 3kV

Température de la source : 150°C.

Gaz de désolvatation : azote, chauffé à 650°C, débit de 1000 L.h-1.

Gaz de collision : argon, pression de la cellule de collision maintenue à environ $3,5 \cdot 10^{-3}$ mbar.Paramètres de détection :

Mode MRM

	Temps de rétention (indicatif) min	Transition de quantification (u.m.a)	Transition de confirmation (u.m.a)
Clotrimazole	5.82	277.1>165	277.1>241
Fluconazole	4.24	307.2>238.2	307.2>220.2
Imazalil	5.5	297.2>159	297.2>69
Ipconazole	7.13	334.2>70	334.2>125
Metconazole	6.81	320.2>70	320.2>125
Miconazole	6.62	417.1>160.9	417.2>158.9
Penconazole	6.79	284.1>70	284.1>159
Prochloraz	6.31	376>308	376>70
Tébuconazole	6.63	308.2>70	308.2>125
Tétraconazole	6.57	372.1>158.9	372.1>70
Dimoxystrobine	6.86	327.2>116	327.2>205.1
Famoxadone	7.22	331.2>238.1	331.2>93
Triméthoprim	3.92	291.1>230.1	291.1>123.1
Venlafaxine	4.72	278.2>58	278.2>260
O-desméthylvenlafaxine	4.11	264.3>58	264.3>246.1
Clotrimazole D5	5.8	282.2>170.1	282.2>246.1
Fluconazole D4	4.23	311.2>242.1	311.2>223.1
Imazalil D5	5.49	304.1>160.9	304.1>69
Metconazole D6	6.8	326.2>70	326.2>125
Miconazole D5	6.61	422.1>161.1	422.1>163.1
Penconazole D7	6.77	291.1>71.1	291.1>160
Prochloraz D4	6.3	380.1>312	380.1>74
Tebuconazole D9	6.61	317.2>70	317.2>125
Famoxadone D5	7.2	336.2>98	336.2>243.2
Triméthoprim D9	3.88	300.2>234.1	300.2>123
Venlafaxine D6	4.7	284>58.1	284>266.2
O-desméthylvenlafaxine D6	4.09	270.4>58.1	270.4>252.3

■ Equipements¹ (modèles utilisés)

ACQUITY UPLC XEVO TQ MS Waters

■ Type d'étalonnage

Dilution isotopique, c'est à dire étalonnage interne avec analogue marqué à l'exception de la dimoxystrobine, l'ipconazole 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

Dilution isotopique (analogues marqués au deutérium) (cf. tableau ci-dessus)

| **Etalons / Traceurs utilisés** : Modèle de type linéaire

| **Domaine de concentration** : /

■ Méthodes de calcul des résultats

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

| **Rendement** : /

| **Blancs** :

- Blanc appareillage : solvants d'injection tout au long de la séquence d'analyse
- Blanc méthode : eau Evian® (bouteille de verre)
- Soustraction du blanc : Non. Lorsque que l'ensemble du processus de mesure est maîtrisé, les valeurs typiques de blanc sont inférieures à 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 (LOQ) jusqu'à 500 ng /L d'eau selon composé

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

■ 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 l'ensemble du processus de mesure est maîtrisé, les valeurs typiques de blanc sont inférieures à 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.

■ 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 eaux x 3 niveaux x 3 réplicats).

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

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

Les niveaux de concentration sont la LQ et des multiples de 3 et 50 fois du niveau de concentration de la LQ de chaque composé.

Les 3 eaux sont traitées indépendamment sur 3 jours différents.

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

		Rendement relatif moyen (%) et écart-type (n=9)		
Composé	LQ (ng/L)	Niveau 1 (LQ)	Niveau 2 (3xLQ)	Niveau 3 (50xLQ)
Clotrimazole	6	87 % (10 %)	88 % (10 %)	111 % (2 %)
Fluconazole	10	96 % (6 %)	92 % (4 %)	96 % (5 %)
Imazalil	10	98 % (10%)	99 % (7 %)	94 % (7 %)
Ipconazole	10	84 % (6 %)	85 % (6 %)	88 % (4 %)
Metconazole	10	90 % (5 %)	89 % (7 %)	98 % (5 %)
Miconazole	10	86 % (7 %)	87 % (10 %)	89 % (8 %)
Penconazole	10	80 % (20 %)	87 % (5 %)	99 % (2 %)
Prochloraze	10	101 % (6 %)	97 % (8 %)	85 % (2 %)
Tébuconazole	10	93 % (4 %)	91 % (6 %)	99 % (3 %)
Tétraconazole	10	84 % (7 %)	89 % (8 %)	106 % (9 %)
Dimoxystrobine	10	82 % (12 %)	86 % (17 %)	90 % (4 %)
Famoxadone	3	97 % (16 %)	97 % (11 %)	94 % (6 %)
Triméthoprim	5	95 % (6 %)	95 % (7 %)	94 % (5 %)
Venlafaxine	2	87 % (13 %)	96 % (3 %)	98 % (5 %)
O-desméthyl venlafaxine	2	97 % (12 %)	95 % (8 %)	96 % (3 %)

| Par molécule : /

■ Limite de quantification (LQ)

Substances	LQ (ng/L)
Venlafaxine, O-desméthylvenlafaxine	2
Famoxadone	3
Triméthoprim	5
Clotrimazole	6
Fluconazole, Imazalil, Ipconazole, Metconazole, Miconazole, Penconazole, Prochloraze, Tébuconazole, Tétraconazole, Dimoxystrobine	10

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

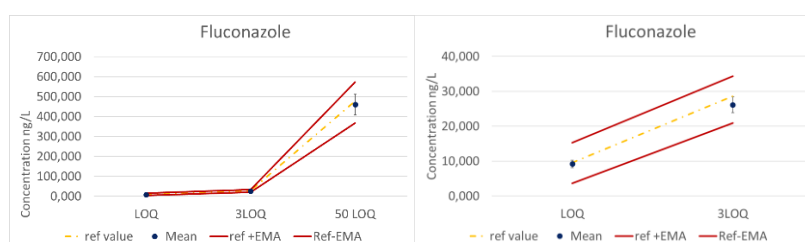
■ Incertitudes (%) sur les résultats

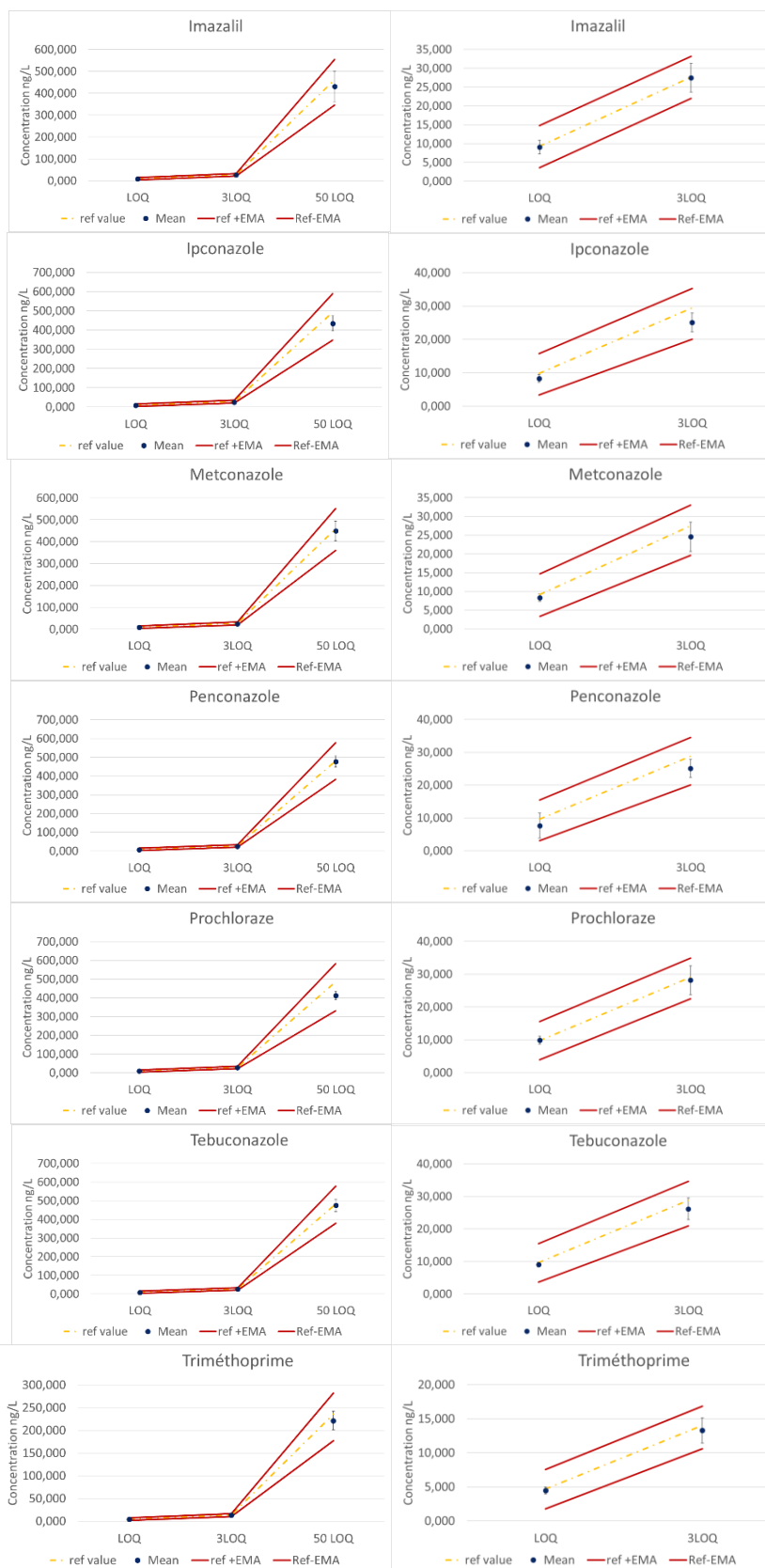
Méthode d'évaluation : NF ISO 11352

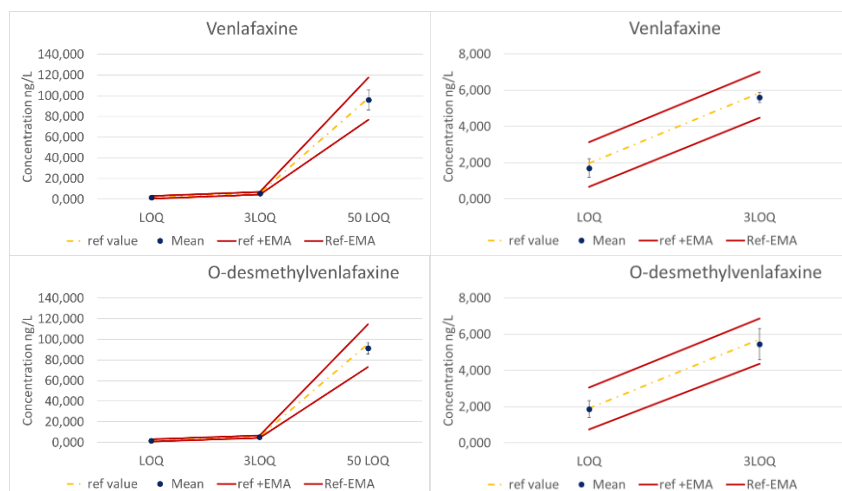
Facteur d'élargissement : $k = 2$

n = 9	LQ	3xLQ	50xLQ
Clotrimazole	40%	40%	20%
Fluconazole	20%	20%	20%
Imazalil	25%	25%	25%
Ipconazole	35%	35%	25%
Metconazole	30%	30%	15%
Miconazole	40%	40%	30%
Penconazole	80%	30%	10%
Prochloraze	30%	30%	30%
Tebuconazole	25%	25%	10%
Tétraconazole	35%	30%	30%
Dimoxystrobine	50%	50%	25%
Famoxadone	45%	30%	20%
Triméthoprim	20%	20%	20%
Venlafaxine	50%	15%	15%
O-desméthyl venlafaxine	35%	25%	10%

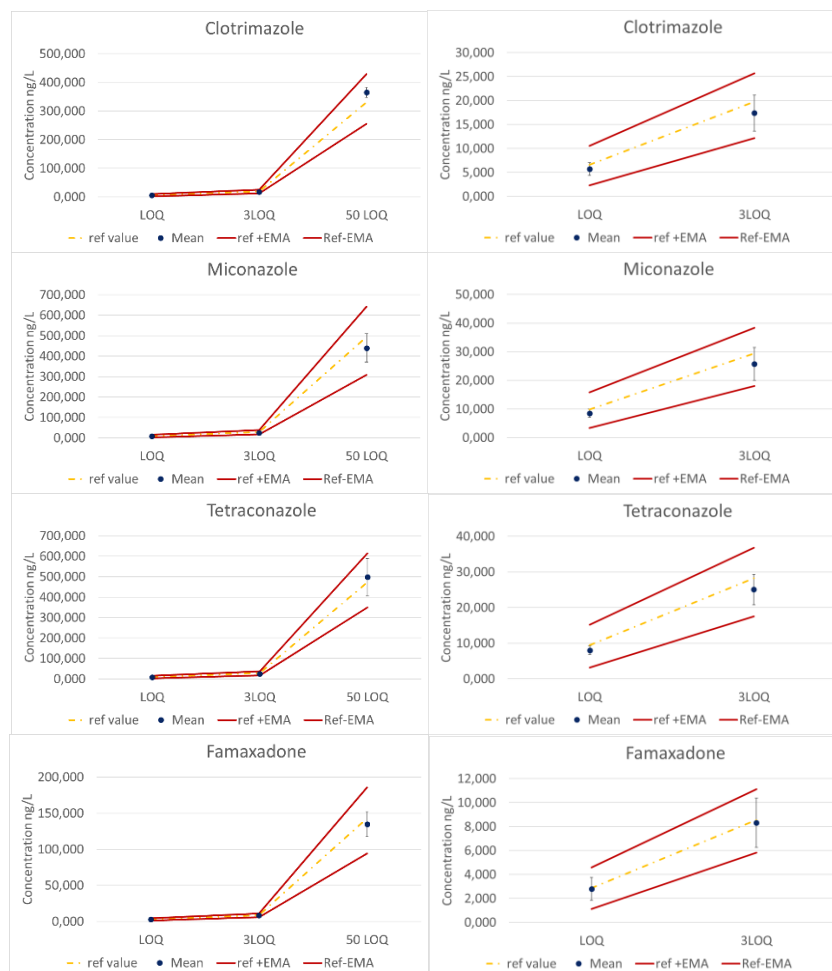
| Exactitude : 60 % d'exactitude à la LQ et 20 % à 3 LQ et 50 LQ



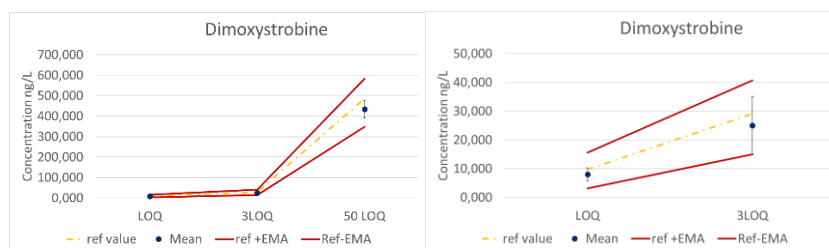




| Exactitude : 60 % d'exactitude à la LQ et 30 % à 3 LQ et 50 LQ



| **Exactitude** : 60 % d'exactitude à la LQ, 40 % à 3 LQ et 20% à 50 LQ



Contacts

■ Auteurs

Sophie LARDY-FONTAN, Véronique LE DIOURON, Carine FALLOT, Béatrice LALERE (LNE)

■ Contact

beatrice.lalere@lne.fr