

# Etude de la stabilité de l'hydrazide maléique et du 1,2,4-triazole dans des échantillons d'eau de surface et/ou souterraine

P. Moreau, M. Revalor, J-P Ghestem

Décembre 2018

Document final



## Contexte de programmation et de réalisation

---

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2018, thème « Améliorer les opérations d'échantillonnage ».

Auteur (s) :

*Pauline Moreau*  
BRGM  
[p.moreau@brgm.fr](mailto:p.moreau@brgm.fr)

*Marion Revalor*  
BRGM  
[m.revalor@brgm.fr](mailto:m.revalor@brgm.fr)

*Jean-Philippe GHESTEM*  
BRGM  
[jp.ghestem@brgm.fr](mailto:jp.ghestem@brgm.fr)

---

Vérification du document :

*Sophie LARDY FONTAN*  
LNE  
[sophie.lardy-fontan@lne.fr](mailto:sophie.lardy-fontan@lne.fr)

*Bénédicte LEPOT*  
INERIS  
[Benedicte.Lepot@ineris.fr](mailto:Benedicte.Lepot@ineris.fr)

*Marina COQUERY*  
IRSTEA  
[Marina.coquery@irstea.fr](mailto:Marina.coquery@irstea.fr)

## Les correspondants

---

AFB : Nicolas Gaury, [nicolas.gaury@afbiodiversite.fr](mailto:nicolas.gaury@afbiodiversite.fr)  
Gaelle Deronzier, [gaelle.deronzier@afbiodiversite.fr](mailto:gaelle.deronzier@afbiodiversite.fr)

BRGM: Jean-Philippe GHESTEM, [jp.ghestem@brgm.fr](mailto:jp.ghestem@brgm.fr)

Référence du document : Pauline Moreau, Marion Revalor, Jean-Philippe Ghestem - Etude de la stabilité de l'hydrazide maléique et du 1,2,4-triazole dans des échantillons d'eau de surface et/ou souterraine - Rapport AQUAREF 2018 - BRGM/RP-68631-FR-46 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>

*ETUDE DE LA STABILITE DE L'HYDRAZIDE MALEIQUE ET DU 1,2,4-TRIAZOLE DANS DES ECHANTILLONS D'EAU DE SURFACE ET/OU SOUTERRAINE*

Pauline Moreau - Marion Revalor - Jean-Philippe Ghestem

## RESUME

La fiabilité des résultats d'analyse d'échantillons d'eau est fortement conditionnée par le délai entre le prélèvement et la mise en analyse. Afin de préciser les recommandations opérationnelles sur ce sujet, AQUAREF réalise depuis 2014 des études techniques et documentaires. Notamment, un premier bilan des données bibliographiques disponibles sur la stabilité d'environ 450 substances a été réalisé. Pour de nombreuses substances, les données bibliographiques sont incomplètes ou incohérentes et des données complémentaires sont nécessaires. En parallèle, AQUAREF a publié un guide établissant des recommandations pour la réalisation d'études de stabilité, afin d'assurer la comparabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires.

Pour apporter des informations sur la stabilité de certaines substances, et pour mettre en application le protocole et le mode de traitement des résultats détaillés dans ce guide, AQUAREF a mené, depuis 2015, des essais en laboratoires sur différentes familles de composés organiques (pesticides, HAP, ...) pour caractériser leur stabilité dans des eaux de surface.

Dans la continuité de ces travaux, ce rapport présente une étude de stabilité sur deux substances organiques dans des eaux de surface et/ou souterraines. Le protocole utilisé pour la réalisation des essais est celui décrit dans le guide AQUAREF, mais une seule température ( $5\pm 3^\circ\text{C}$ ) et une seule concentration ont été testées. Il a été choisi de privilégier le nombre d'échantillons différents (4 pour chaque molécule). La première étude a été réalisée sur l'hydrazide maléique (herbicide et inhibiteur de la croissance végétale), qui fait partie des listes réglementaires pour les eaux souterraines, avec deux échantillons d'eau souterraine et deux échantillons d'eau de surface, sur une durée de 7 jours. La seconde étude a été réalisée sur le 1,2,4-triazole (métabolite d'herbicides et fongicides), avec 3 échantillons d'eau souterraine et une eau embouteillée sur une durée de 6 jours.

La stabilité des molécules est qualifiée avec un critère générique, utilisé dans les précédents travaux AQUAREF, à savoir une perte maximale de 20% sur 3 jours (durée minimum). Un second critère a été testé, qui évalue la stabilité en regard de l'incertitude de la méthode d'analyse utilisée. Dans les conditions de réalisation des essais, l'hydrazide maléique est stable au moins 7 jours à  $5^\circ\text{C}$  dans les échantillons d'eaux de surface et souterraine et le 1,2,4-triazole est stable au moins 6 jours à  $5^\circ\text{C}$  dans des échantillons d'eau souterraine et embouteillée. Ces essais ont permis de tester l'approche chronologique décrite dans le guide AQUAREF et de mettre en œuvre une étude de stabilité pour un produit de dégradation. La mise en application des recommandations du guide n'a pas posé de difficultés.

### **Mots clés** (thématique et géographique) :

stabilité, eau douce, micropolluant organique, substance pertinente à surveiller (SPAS), dégradation, pesticide, produit de dégradation

*STABILITY STUDIES OF MALEIC HYDRAZIDE AND 1,2,4-TRIAZOLE IN DIFFERENT WATER SAMPLES (SURFACE AND UNDERGROUND WATER SAMPLES)*

Moreau P., Revalor M., Ghestem J.P.

This report was prepared by the BRGM according to the 2018 AQUAREF agenda and a partnership convention with the AFB. The reliability of analysis results of water samples is strongly dependent on the extension of time between sampling and analysis operations. AQUAREF has been working for a few years on these questions. A documentary review was published in 2015 by AQUAREF establishing a first compilation of bibliographic data for 450 substances. For some substances, data are sometimes inexistent or available data are contradictory. Acquisition of data is thus necessary. In parallel, AQUAREF has published a guide to provide guidance to realize stability studies in laboratory, but also to interpret results.

Since 2015, AQUAREF performed stability studies for different substances (pesticides, HAP, emerging pollutants) to apply the protocol described in the guide, but also to get information about stability for substances for which data were lacking.

In 2018, this study was performed by the BRGM on 2 substances : maleic hydrazide and 1,2,4-triazole. Maleic hydrazide is a herbicide which belongs to regulatory documents for underground waters and 1,2,4-triazole is a pesticide metabolite. The trials were performed as described in the guide, but only one temperature and one concentration was tested. Testing several different samples was preferred. The trials were performed on surface waters or/and underground waters, at 5°C. Results were interpreted with a generic criterion previously used for equivalent studies by AQUAREF: an “acceptable maximal loss” of 20% after 3 days (minimum). A second criterion was also tested which evaluated stability regarding to the analytical method uncertainty. As a results, maleic hydrazide and 1,2,4-triazole are respectively stable 7 and 6 days at 5°C.

**Key words** (thematic and geographical area) :

Stability, water, micropollutant, degradation, pesticide, dégradation product



# Etude de la stabilité de l'hydrazide maléique et du 1,2,4-triazole dans des échantillons d'eau de surface et/ou souterraine

Rapport final

BRGM/RP-68631-FR

Décembre 2018



Géosciences pour une Terre durable

**brgm**

# Etude de la stabilité de l'hydrazide maléique et du 1,2,4-triazole dans des échantillons d'eau de surface et/ou souterraine

Rapport final

**BRGM/RP-68631-FR**  
Décembre 2018

Étude réalisée dans le cadre des opérations  
de Service public (Recherche) du BRGM 2018  
**P. Moreau, M. Revalor, J-P Ghestem**

<p><b>Vérificateur :</b></p> <p>Nom : BRISTEAU S.</p> <p>Fonction : Ingénieur</p> <p>Date : 24/01/2019</p> <p>Signature : </p>
---

<p><b>Approbateur :</b></p> <p>Nom : Amalric L.</p> <p>Fonction Responsable d'unité :</p> <p>Date : 28/01/2019</p> <p>Signature : </p>
---

**Le système de management de la qualité et de l'environnement  
est certifié par AFNOR selon les normes ISO 9001 et ISO 14001.**

**Mots-clés** : stabilité, eau douce, micropolluant organique, substances pertinentes à surveiller (SPAS), dégradation, hydrazide maléique, 1,2,4 triazole

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

**Moreau P., Revalor M., Ghestem J.P.** (2018) – Etude de la stabilité de l'hydrazide maléique et du 1,2,4-triazole dans des échantillons d'eau de surface et/ou souterraine. Rapport final. BRGM/RP-68631-FR, 46p.

© BRGM, 2011, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

## Synthèse

La fiabilité des résultats d'analyse d'échantillons d'eau est fortement conditionnée par le délai entre le prélèvement et la mise en analyse. Afin de préciser les recommandations opérationnelles sur ce sujet, AQUAREF réalise depuis 2014 des études techniques et documentaires. Notamment, un premier bilan des données bibliographiques disponibles sur la stabilité d'environ 450 substances a été réalisé. Pour de nombreuses substances, les données bibliographiques sont incomplètes ou incohérentes et des données complémentaires sont nécessaires. En parallèle, AQUAREF a publié un guide établissant des recommandations pour la réalisation d'études de stabilité, afin d'assurer la comparabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires.

Pour apporter des informations sur la stabilité de certaines substances, et pour mettre en application le protocole et le mode de traitement des résultats détaillés dans ce guide, AQUAREF a mené, depuis 2015, des essais en laboratoires sur différentes familles de composés organiques (pesticides, HAP, ...) pour caractériser leur stabilité dans des eaux de surface.

Dans la continuité de ces travaux, ce rapport présente une étude de stabilité sur deux substances organiques dans des eaux de surface et/ou souterraines. Le protocole utilisé pour la réalisation des essais est celui décrit dans le guide AQUAREF, mais une seule température ( $5\pm 3^\circ\text{C}$ ) et une seule concentration ont été testées. Il a été choisi de privilégier le nombre d'échantillons différents (4 pour chaque molécule). La première étude a été réalisée sur l'hydrazide maléique (herbicide et inhibiteur de la croissance végétale), qui fait partie des listes réglementaires pour les eaux souterraines, avec deux échantillons d'eau souterraine et deux échantillons d'eau de surface, sur une durée de 7 jours. La seconde étude a été réalisée sur le 1,2,4-triazole (métabolite d'herbicides et fongicides), avec 3 échantillons d'eau souterraine et une eau embouteillée sur une durée de 6 jours.

La stabilité des molécules est qualifiée avec un critère générique, utilisé dans les précédents travaux AQUAREF, à savoir une perte maximale de 20% sur 3 jours (durée minimum). Un second critère a été testé, qui évalue la stabilité en regard de l'incertitude de la méthode d'analyse utilisée. Dans les conditions de réalisation des essais, l'hydrazide maléique est stable au moins 7 jours à  $5^\circ\text{C}$  dans les échantillons d'eaux de surface et souterraine et le 1,2,4-triazole est stable au moins 6 jours à  $5^\circ\text{C}$  dans des échantillons d'eau souterraine et embouteillée. Ces essais ont permis de tester l'approche chronologique décrite dans le guide AQUAREF et de mettre en œuvre une étude de stabilité pour un produit de dégradation. La mise en application des recommandations du guide n'a pas posé de difficultés.

## Sommaire

<b>1. Introduction</b> .....	<b>13</b>
<b>2. Etude de la stabilité de l'hydrazide maléique dans des eaux souterraines et superficielles</b> .....	<b>15</b>
2.1. METHODOLOGIE .....	15
2.1.1. Choix de la molécule pour l'essai.....	15
2.1.2. Protocole général .....	15
2.1.3. Choix des matériaux d'étude .....	16
2.1.4. Echantillonnage .....	16
2.1.5. Mise en flacons.....	17
2.1.6. Protocoles de dopage, extraction et analyse .....	17
2.1.7. Analyses physico-chimiques des eaux le jour du dopage (J0) .....	18
2.2. RESULTATS .....	19
2.2.1. Principe de traitement des données à J <sub>0</sub> .....	19
2.2.2. Application aux résultats de l'étude.....	20
<b>3. Etude de la stabilité du 1,2,4-triazole dans des eaux souterraines</b> .....	<b>25</b>
3.1. METHODOLOGIE .....	25
3.1.1. Choix de la molécule pour l'essai.....	25
3.1.2. Protocole général .....	26
3.1.3. Choix des matériaux d'étude .....	27
3.1.4. Echantillonnage .....	27
3.1.5. Mise en flacons.....	27
3.1.6. Protocoles de dopage et analyse.....	27
3.1.7. Analyses physico-chimiques des eaux le jour du dopage (J <sub>0</sub> ) .....	29
3.2. RESULTATS .....	30
3.2.1. Principe de traitement des données à J <sub>0</sub> .....	30
3.2.2. Application aux résultats de l'étude.....	30
<b>4. Conclusion</b> .....	<b>37</b>
<b>5. Bibliographie</b> .....	<b>39</b>

## Liste des figures

- Figure 1 : Présentation de l'approche chronologique, utilisée pour l'étude de stabilité portant sur l'hydrazide maléique [3] ..... 15
- Figure 2 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans les 4 échantillons d'eau confondus (souterraines et eaux de surface). Les résultats sont normalisés par les moyennes à  $J_0$  ..... 21
- Figure 3 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans l'échantillon d'eau souterraine Charente. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$  ..... 22
- Figure 4 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans l'échantillon d'eau souterraine piezomètre BRGM. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$  ..... 22
- Figure 5 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans l'échantillon d'eau de surface Loire. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$  ..... 23
- Figure 6 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans l'échantillon d'eau de surface Cosson. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$  ..... 23
- Figure 7 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau embouteillée CONTREX® après dopage par une solution de 1,2,4-triazole. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$  ..... 32
- Figure 8 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine du piezomètre BRGM après dopage par une solution de 1,2,4-triazole. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$  ..... 33
- Figure 9 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine « puits » après dopage par une solution de 1,2,4-triazole. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$  ..... 33
- Figure 10 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine « puits » dans l'échantillon non dopé (en orange) et dans un échantillon dopé par une solution contenant 15 molécules parents de 1,2,4-triazole (en marron). Ces valeurs sont inférieures à la limite de quantification et sont données à titre indicatif uniquement ..... 34
- Figure 11 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine « Charente » après dopage par une solution de 1,2,4-triazole. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$  ..... 34
- Figure 12 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine « Charente » dans l'échantillon non dopé (en orange) et dans un échantillon dopé par une solution contenant 15 molécules parents de 1,2,4-triazole (en marron). Ces valeurs sont inférieures à la limite de quantification et sont données à titre indicatif uniquement ..... 35

## Liste des tableaux

- Tableau 1 : Descriptif de la substance hydrazide maléique analysée au cours de l'essai, code SANDRE, utilisation et LQ dans l'avis agrément des laboratoires [4] ..... 15
- Tableau 2 : Données de validation initiale de la méthode analytique de l'hydrazide maléique .. 18

Tableau 3 : Caractérisation physico-chimique des eaux au début de l'étude de stabilité de l'hydrazide maléique .....	19
Tableau 4: Calcul des écarts normalisés à $J_0$ pour l'hydrazide maléique .....	20
Tableau 5: Valeurs des ImO (n=6) et IMA de l'étude .....	21
Tableau 6 : Molécules parents pouvant conduire à la formation de 1,2,4-triazole par dégradation : descriptions et informations relatives à l'utilisation en France et à la stabilité (cellule vide : molécules non étudiée dans le rapport [1]) .....	25
Tableau 7 : Concentrations ciblées, LQ des laboratoires, laboratoire réalisant l'analyse et principe de la méthode d'analyse pour l'étude de stabilité de 1,2,4-triazole -.....	28
Tableau 8 : Données de validation initiale de la méthode analytique du 1,2,4-triazole .....	29
Tableau 9: Caractérisation physico-chimique des eaux (souterraines ou embouteillée) au début de l'étude de stabilité du 1,2,4-triazole .....	30
Tableau 10: Calcul des écarts normalisés à $J_0$ obtenus pendant l'étude de stabilité du 1,2,4-triazole .....	31
Tableau 11: Valeurs des ImO (n=6) et IMA pour l'étude de stabilité de 1,2,4-triazole.....	31

## Liste des illustrations

Illustration 1 : Flacons en verre vert de 1 litre.....	17
Illustration 2 : Analyseur SPE en ligne couplée à la UPLC-MS/MS (2D) en mode d'ionisation Unispray .....	18

## Liste des abréviations

ESO : eau souterraine

ESU : eau de surface

UPLC – MS/MS : chromatographie liquide à haute pression couplée à un spectromètre de masse en mode tandem

SPE : extraction sur phase solide

# 1. Introduction

Depuis 2014, différentes actions sont menées par AQUAREF concernant les exigences en termes de délai maximal avant analyse (DMAA) pour les substances de la surveillance des masses d'eau. Cette problématique est notamment en lien avec les contraintes rencontrées dans les DROM, puisque de nombreux échantillons d'eau prélevés dans ces territoires sont envoyés en métropole pour être analysés. Des difficultés similaires existent également en métropole dans certaines régions. Dans ce cadre, des contraintes fortes existent en ce qui concerne les délais et les températures de transport. La question de la fiabilité des résultats se pose lorsqu'il y a un dépassement de délai ou de température, y compris pour certains échantillons prélevés en métropole.

En 2015, AQUAREF a publié une synthèse documentaire et bibliographique [1] sur les données de stabilité et les DMAA pour environ 450 substances, dont la plupart font partie des listes de surveillance actuelles. L'objectif était d'établir des recommandations afin de distinguer les substances qui doivent être analysées dans les 24h ( $DMAA \leq 24h$ ), donc sur place dans le cas des DROM, de celles qui pourraient être envoyées en métropole si nécessaire ( $DMAA \geq 72h$ ). Des recommandations ont pu être émises pour environ un tiers des substances. Elles sont reprises dans le guide technique AQUAREF spécifique DROM [2]. Pour les autres, des données manquent ou sont contradictoires, soulignant la nécessité de réaliser des études de stabilité complémentaires en laboratoire.

AQUAREF a également publié un guide « Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau » [3]. Ce document établit des recommandations pratiques pour la réalisation des essais ; concernant le protocole à mettre en œuvre, mais également en ce qui concerne le traitement des résultats, afin d'assurer la fiabilité et la comparabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires. Il est actuellement porté en normalisation (FDT 90-240).

Ainsi, AQUAREF a mené, depuis 2015, des essais en laboratoires pour caractériser la stabilité, dans des eaux de surface, des substances suivantes :

- 46 pesticides en 2015 ;
- 17 HAP et 11 substances pertinentes à surveiller (SPAS) en 2016 (benzotriazole, tolyltriazole, bisphénol A, caféine, carbamazépine, paracétamol, triclosan, triclocarban, méthyl-parabène, éthyl-parabène et propyl-parabène) ;
- 4 substances pertinentes à surveiller en 2017 (Sotalol, Beflubutamide, N-butylbenzenesulfonamide (NBBS) et N,N-diméthyl-N'-P-tolylsulphamide (DMST)).

Le présent travail s'inscrit dans la continuité des travaux précédents et porte sur l'étude de la stabilité de l'hydrazide maléique et du 1,2,4-triazole. Il s'agit de molécules pour lesquelles AQUAREF réalise des développements analytiques compte tenu de difficultés analytiques particulières ou de l'absence de méthode d'analyse pour ces substances. Ainsi, pour fournir des informations aussi complètes que possible, ces substances ont été choisies pour cette étude de stabilité. L'hydrazide maléique fait partie des listes de surveillance pour les eaux souterraines [4], ce qui n'est pas le cas de 1,2,4-triazole. Mais ce composé est un métabolite intéressant, produit par de nombreux pesticides. Pour l'étude de la stabilité de ce composé, une quinzaine de molécules parents, dont il est susceptible d'être un métabolite, ont été prises en compte. Les

résultats sont présentés respectivement dans les chapitres 2 et 3. Dans chaque cas, le protocole de l'étude est détaillé, puis les résultats sont discutés.

L'intérêt de ces essais est double :

- apporter des informations chiffrées concernant la stabilité de substances pour lesquelles peu de données sont disponibles à ce jour et ainsi compléter les informations bibliographiques recensées en 2015, et complétées en 2017 [1].
- Tester les lignes directrices proposées par AQUAREF pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau [3].

## 2. Etude de la stabilité de l'hydrazide maléique dans des eaux souterraines et superficielles

### 2.1. METHODOLOGIE

#### 2.1.1. Choix de la molécule pour l'essai

Le Tableau 1 présente le composé d'intérêt analysée au cours de cet essai avec son code sandre, son utilisation et la LQ donnée dans l'avis agrément, entrant en vigueur au 31/12/2018. Elle fait partie de la liste « substances pertinentes à surveiller ». Dans la synthèse documentaire [1], l'hydrazide maléique a pour conclusion « données à rechercher », attestant du manque d'information en bibliographie concernant la stabilité de cette substance.

Composé	Code SANDRE	LQ avis agrément (ng/L) [4]	Utilisation
Hydrazide maléique	5645	30	Herbicide et régulateur de croissance

Tableau 1 : Description de la substance hydrazide maléique analysée au cours de l'essai

#### 2.1.2. Protocole général

Parmi les approches décrites dans le guide AQUAREF [3], c'est une approche chronologique qui a été retenue, du fait que l'analyse est réalisée par extraction sur phase solide (SPE) en ligne avec l'analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/MSMS) (cf. § 2.1.6). Le principe de l'approche est présenté dans la Figure 1.

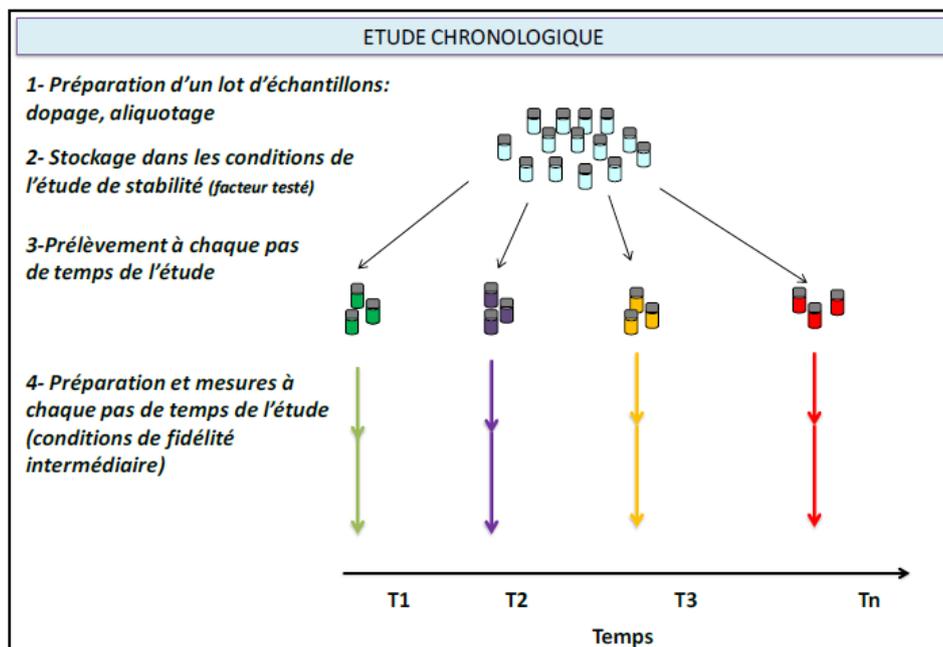


Figure 1 : Présentation de l'approche chronologique, utilisée pour l'étude de stabilité portant sur l'hydrazide maléique [3]

Le détail des opérations est donné ci-dessous :

- Dopage dans un ordre aléatoire des flacons le premier jour de l'essai ( $J_0$ ), avec un dopage par flacon. Etant donné le faible volume nécessaire pour l'analyse (injection de 1 mL d'échantillon), il a été décidé de travailler à partir d'un flacon par type d'eau et de faire un prélèvement d'un aliquot pour analyse à chaque pas de temps dans Le même flacon. Le volume total prélevé est d'environ 60mL sur le litre initial, comme cela est détaillé dans le paragraphe 2.1.6. Il est supposé que cette variation de volume n'engendrera pas de biais pour l'étude.
- Stockage des flacons à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .
- Extraction en ligne et analyse instrumentale des échantillons dans des conditions de répétabilité dans un ordre aléatoire à différents pas de temps entre  $J_0$ , et  $J_7$ .
- Nombre de réplicats à chaque pas de temps : 6 à  $J_0$  puis 3 à  $J_1$ ,  $J_2$ ,  $J_3$ , et  $J_7$ . Le nombre de réplicats à réaliser à  $J_0$  est défini dans le guide [2] en fonction de l'écart type de fidélité de la méthode mise en œuvre, qui est inférieur à 5% dans cette étude.
- Quatre échantillons d'eau ont été utilisés pour cet essai (2 eaux de surface et 2 eaux souterraines).

Une seule concentration a été testée, à un niveau au moins 5 fois supérieur à la limite de quantification et dans le premier quart du domaine d'étalonnage, comme cela est recommandé dans le guide [2]. Les valeurs cibles de dopage sont données dans le § 2.1.6.

Une analyse des échantillons d'eau non dopés a également été réalisée afin de caractériser les échantillons d'eau utilisés, ils sont appelés « témoin » dans la suite du rapport.

### 2.1.3. Choix des matériaux d'étude

Plusieurs options sont possibles pour le choix des matrices. Le but de cette étude de stabilité est de tester des échantillons d'eau ayant des caractéristiques différentes et représentatifs des échantillons couramment rencontrés dans les milieux naturels, en particulier en ce qui concerne les teneurs en MES et carbone organique total (COT) puisque ces paramètres peuvent impacter la stabilité des substances. Il a donc été choisi de travailler avec deux échantillons d'eaux souterraines et deux échantillons d'eaux de surface naturelles (matrice considérée comme plus problématique du point de vue de la stabilité notamment en raison des niveaux de concentration en MES/COT plus élevés) afin d'élargir la portée des conclusions de l'étude, par rapport aux eaux souterraines. Des essais préliminaires avaient été réalisés sur des eaux de surface pour vérifier la faisabilité de l'étude.

### 2.1.4. Echantillonnage

Les échantillons d'eau ont les origines suivantes :

- Pour les eaux de surface :
  - la Loire, en aval d'Orléans
  - le Cosson à la Ferté Saint Aubin
- Pour les eaux souterraines :
  - un piézomètre sur le site du BRGM à Orléans
  - un piézomètre en Charente

Pour chaque station de mesure, 10 L d'eau ont été prélevés dans des flacons en verre de 2,5 L, préalablement nettoyées et calcinées à  $500^\circ\text{C}$ . Les échantillons ont été prélevés quelques jours avant la réalisation de l'étude et stockés à  $5^\circ\text{C}$ , à l'abri de la lumière.

### 2.1.5. Mise en flacons

Chaque eau a été homogénéisée en jerricane de 25 L par agitation manuelle puis un fractionnement a été réalisé pour la mise en flacon de 1 L. Il n'y a pas eu d'étape de filtration ni de décantation avant la répartition dans les flacons d'1 L. Les flacons utilisés pour l'étude sont des flacons en verre vert de 1 L (Illustration 1).



Illustration 1 : Flacons en verre vert de 1 litre

Les flacons ont été pesés pour contrôler le volume d'eau contenu dans chacun. Des flacons ont également été préparés afin de réaliser une caractérisation physico-chimique des eaux à  $J_0$ .

### 2.1.6. Protocoles de dopage, extraction et analyse

Le dopage a été réalisé le lendemain de la mise en flacon. La concentration ciblée était de 200 ng/L. Le dopage s'est fait par ajout de 100  $\mu$ L d'une solution mère (solvant méthanol) dans 1 L d'eau. Après chaque dopage, les flacons ont été refermés immédiatement, et agités.

Le jour du dopage des flacons, 6 répliqués de chaque eau ont été prélevés puis analysés (obtention des données pour  $J_0$ ). Les flacons ont ensuite été stockés au réfrigérateur ( $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Chaque prélèvement pour analyse pour  $J_1$ ,  $J_2$ ,  $J_3$  et  $J_7$  a été réalisé en triplicat directement dans les flacons de 1 L dans lesquels le dopage a été effectué, après une remise à température ambiante de 1 h. Ces prélèvements ont représenté un faible volume (environ 60 mL sur 1 L) minimisant le volume d'air dans chaque flacon et l'influence que ce paramètre peut avoir.

Concernant le protocole analytique, l'hydrazide maléique a été extrait directement sur SPE en ligne (extraction en phase solide) couplée à un analyseur UPLC-MS/MS. Cette méthode est décrite dans la fiche méthode AQUAREF MA-73 [5]. Elle a été validée pour des eaux souterraines, contenant une teneur en MES faible (inférieure à 2 mg/L). Cependant, pour les composés qui ont un coefficient de partage octanol-eau ( $\log K_{ow}$  et/ou  $\log D$ ) inférieur à 2,5 (cas de l'hydrazide maléique), le résultat de l'analyse dans la fraction dissoute est jugé équivalent au résultat de l'analyse sur l'eau brute [6]. Il a donc été décidé d'appliquer cette méthode pour les échantillons de cette étude dont les teneurs en MES vont jusqu'à 11 mg/L. La justesse des résultats obtenus à  $J_0$  permet également de conforter ce choix. La LQ du laboratoire est de 30 ng/L.



Illustration 2 : Analyseur SPE en ligne couplée à la UPLC-MS/MS (2D) en mode d'ionisation Unispray

Au cours de ces essais, tous les contrôles qualités effectués au laboratoire étaient conformes aux critères qualité du laboratoire, validant ainsi l'intégralité des données acquises.

Le Tableau 2 donne les incertitudes de la méthode pour différents niveaux de concentration, calculées selon la norme NF EN ISO 11352.

	Incertitude U (k=2)	
	entre la LQ et 100 ng/L	entre 100 et 1000 ng/L
<b>hydrazide maléique</b>	20%	15%

Tableau 2 : Données de validation initiale de la méthode analytique de l'hydrazide maléique

### 2.1.7. Analyses physico-chimiques des eaux le jour du dopage (J0)

Des analyses physico-chimiques des eaux ont été réalisées à J<sub>0</sub>. Les résultats sont consignés dans le Tableau 3.

	unité	Charente (ESO)	Piezomètre BRGM (ESO)	Loire (ESO)	Cosson (ESO)
pH	U	7.6	7.7	7.6	7.3
MES	mg/L	< 2	< 2	11	4
Conductivité à 25°C	µS/cm	659	444	326	185
COT	mg/L	1	0.5	3.3	9.4
CO <sub>3</sub>	mg/L	< 10	< 10	< 10	< 10
HCO <sub>3</sub>	mg/L	275	231	120	40
Ca	mg/L	118.8	73.5	41.9	17
Fe	mg/L	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
K	mg/L	1.3	3.4	3.5	4.2
Mg	mg/L	4.1	4.4	4.6	2.7
Na	mg/L	10.4	10.9	14.1	11.3
SiO <sub>2</sub>	mg/L	6.3	36.2	11.6	19.4
Cl	mg/L	22	19.6	20.5	19.1
F	mg/L	0.2	< 0.1	0.1	< 0.1
NH <sub>4</sub>	mg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
NO <sub>2</sub>	mg/L	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.02
NO <sub>3</sub>	mg/L	64.8	2.5	13.7	7.7
PO <sub>4</sub>	mg/L	< 0.05	< 0.05	0.14	0.06
SO <sub>4</sub>	mg/L	21.6	4.8	14.4	12.6

Tableau 3 : Caractérisation physico-chimique des eaux au début de l'étude de stabilité de l'hydrazide maléique

Selon les échantillons d'eau, les taux de MES varient entre <2 et 11 mg/L. Etant donnée la méthode d'analyse (SPE en ligne couplée à UPLC –MS/MS), il a été choisi de ne pas travailler avec une teneur en MES plus élevée. Néanmoins, les 2 échantillons d'eau de surface ont des teneurs en MES supérieures à la médiane des eaux superficielles françaises (3,4 mg/L), mais inférieures au percentile 95 (34,3 mg/L) [7]. Les teneurs en COT varient entre 0,5 et 9,4 mg/L. Concernant le calcium, on observe une variation de 17 à 119 mg/L. Enfin, les nitrates varient de 2,5 à 64,8 mg/L. Les eaux utilisées lors de cette étude ont donc des propriétés physico-chimiques variées ce qui permet d'élargir les conditions d'essai et de consolider les résultats obtenus.

## 2.2. RESULTATS

### 2.2.1. Principe de traitement des données à J<sub>0</sub>

Le traitement des données obtenues à J<sub>0</sub> s'appuie sur le guide d'AQUAREF [3]. Il reprend aussi la méthode décrite lors de « l'étude de la stabilité de 11 substances pertinentes à surveiller (SPAS) dans les échantillons d'eau de surface » [8] et repose sur les vérifications suivantes :

- Validation des données à J<sub>0</sub> en vérifiant l'exactitude de la concentration moyenne retrouvée par calcul d'un écart normalisé entre la concentration cible et la concentration mesurée à J<sub>0</sub>. L'exactitude est vérifiée si l'écart normalisé est inférieur à 2.
- Détermination de l'« instabilité minimale Observable » (ImO) qui correspond à 2 fois le coefficient de variation des données à J<sub>0</sub> (CV<sub>r</sub>(J<sub>0</sub>) %). Cette borne est considérée comme la plus petite variation de concentration attribuable à une instabilité que l'étude est capable de mettre en évidence. Ainsi, si les données expérimentales sortent de cette borne, cela signifie qu'il y a d'autre(s) phénomène(s) que l'inhomogénéité du matériau à prendre en compte pour expliquer la tendance observée, en particulier une possible dégradation de la substance.

- Choix d'un critère opérationnel pour déterminer l'« instabilité Maximale Acceptable » (IMA). Pour ce travail, deux critères ont été présentés :
  - Le premier est celui qui a été utilisé dans plusieurs travaux AQUAREF :  $IMA_1 = 20\%$  [8-11]. Il s'agit du critère principal pour évaluer la stabilité d'une molécule. Tant que la moyenne des essais ne sort pas de cet IMA, la substance est considérée stable.
  - Le second est basé sur l'incertitude de la méthode,  $IMA_2=U/2$  (U étant l'incertitude élargie). Ce critère est différent de celui proposé dans le guide [3], en raison de la valeur faible de l'incertitude de la méthode.
- Vérification que  $ImO < IMA$  pour conclure avec le critère opérationnel choisi.

### 2.2.2. Application aux résultats de l'étude

#### **Validation des données à $J_0$**

Pour chacun des 4 échantillons d'eau, un extrait non dopé « témoin » a été analysé à  $J_0$ . Toutes les concentrations mesurées étaient inférieures à la limite de quantification.

Pour chaque échantillon, les tests d'exactitude ont donné des résultats satisfaisants (écart normalisé < 2). Ils sont donnés dans le Tableau 4.

Eau	Ecart normalisé
Charente (ESO)	0,21
Piézomètre BRGM (ESO)	0,14
Loire (ESU)	0,26
Cosson (ESU)	0,30

Tableau 4: Calcul des écarts normalisés à  $J_0$  pour l'hydrazide maléique

La répétabilité (CV% des 6 mesures) à  $J_0$  est faible. L'  $ImO$  est donnée pour chaque matrice dans le Tableau 5, ainsi que l'IMA opérationnelle basée sur une variation maximale de 20% de la concentration ( $IMA_1$ ). Pour les 4 échantillons testés, on respecte bien :  $ImO < IMA_1$ , ce qui permet de travailler avec ce critère opérationnel pour statuer sur la stabilité de la substance. Le second critère utilisé ( $IMA_2$ ) est basé sur l'incertitude de la méthode (évaluée sur des ESO). Pour 3 échantillons, le critère  $ImO < IMA_2$  est bien vérifié et pourra être utilisé pour statuer sur la stabilité de la substance.

Eau	ImO (%) = $2CVr(J_0)$ (%)	IMA <sub>1</sub> (%)	IMA <sub>2</sub> : U/2 (%)
Charente (ESO)	4	20	7,5
Piézomètre BRGM (ESO)	4	20	7,5
Loire (ESU)	8	20	7,5
Cosson (ESU)	4	20	7,5

Tableau 5: Valeurs des ImO (n=6) et IMA de l'étude

Les résultats sont présentés pour tous les échantillons confondus dans la Figure 2, et pour chaque échantillon d'eau dans les Figure 3 à Figure 6, avec la légende suivante :

- Données expérimentales après dopage
- ◆ Moyennes
- - IMA<sub>1</sub>: critère 20%
- - IMA<sub>2</sub>: U/2

Dans les représentations graphiques, les concentrations données sont les concentrations normalisées par rapport à la moyenne des mesures à J<sub>0</sub>.

## Résultats

Dans les 4 échantillons « témoins », la concentration en hydrazide maléique est inférieure à la limite de quantification.

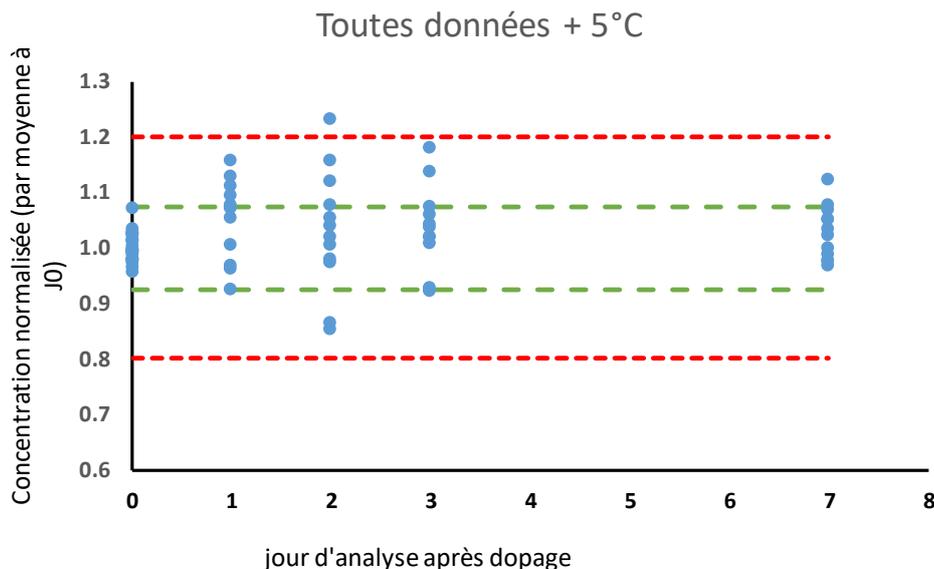


Figure 2 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans les 4 échantillons d'eau confondus (eaux souterraines et de surface). Les résultats sont normalisés par les moyennes à J<sub>0</sub>

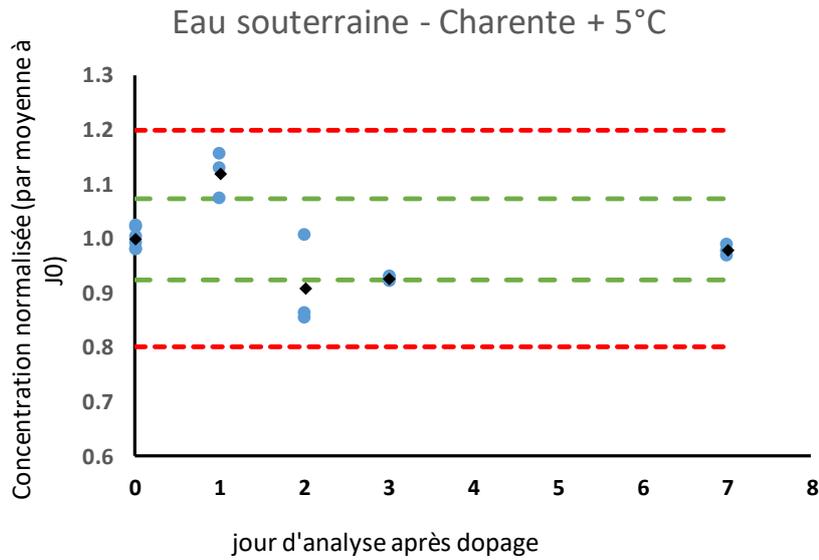


Figure 3 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans l'échantillon d'eau souterraine « Charente ». Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$

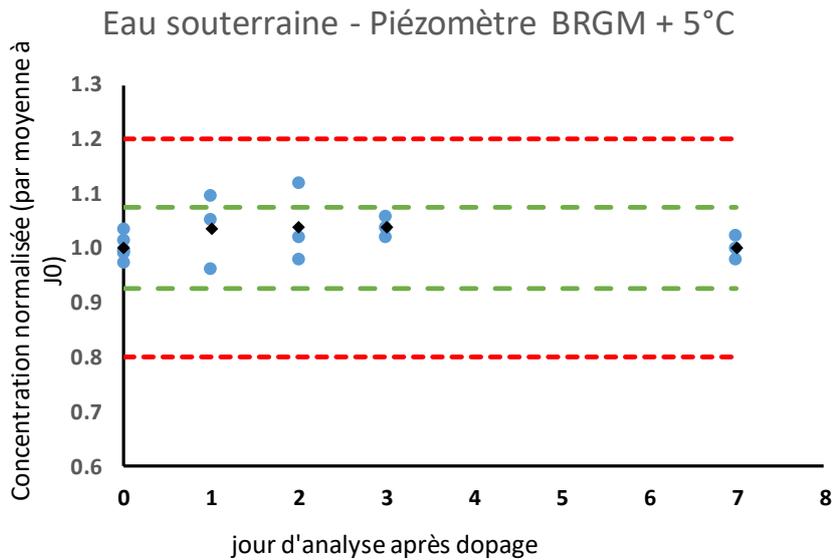


Figure 4 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans l'échantillon d'eau souterraine « piézomètre BRGM ». Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$

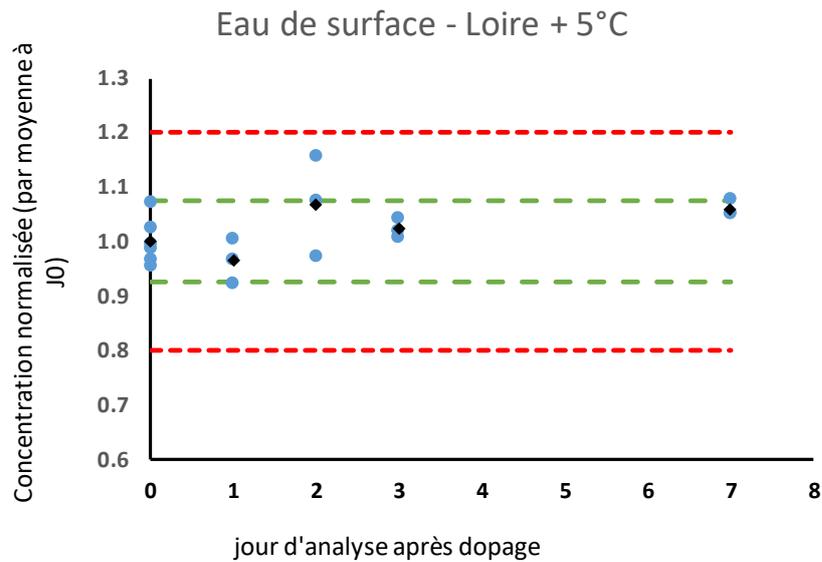


Figure 5 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans l'échantillon d'eau de surface « Loire ». Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$

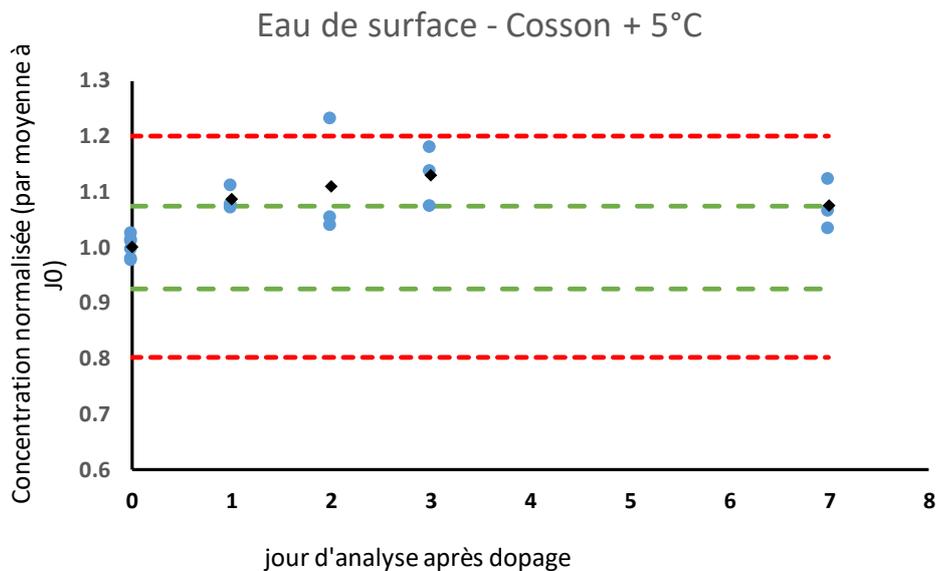


Figure 6 : Evolution temporelle des concentrations en hydrazide maléique dans l'échantillon d'eau de surface « Cosson ». Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$

Pour les quatre échantillons, la dispersion à  $J_2$  est plus importante que pour les autres jours et certains points expérimentaux sont en dehors de la borne  $IMA_2$  (basé sur l'incertitude de la méthode). Cela est dû au fait que l'incertitude de la méthode, relativement faible pour une molécule organique, est issue d'un dossier de caractérisation initiale. Elle est peut-être sous-estimée actuellement et est amenée à être ré-évaluée avec la mise en routine de la méthode. Néanmoins, les points expérimentaux restent dans les bornes  $IMA_1$  (variation de 20%), sauf un point dans le cas de l'échantillon « Cosson ». De plus, les dispersions à  $J_3$  et  $J_7$  sont plus faibles qu'à  $J_2$ .

Pour l'échantillon « Cosson » (voir Figure 6), la valeur à  $J_0$  est sensiblement plus faible que les valeurs des autres jours. Aucune raison n'a pu être identifiée. De ce fait, sur le graphique, on

pourrait croire à une augmentation de la concentration entre  $J_0$  et  $J_1$ . Mais l'hydrazide maléique n'étant pas un produit de dégradation, elle ne peut pas être produite ainsi au cours du temps. Du fait que la concentration est plus faible à  $J_0$  qu'à  $J_1$ , certains points expérimentaux sont en dehors des bornes de l'IMA<sub>2</sub> ( $U/2$ ), mais restent dans les bornes définies par l'IMA<sub>1</sub> (sauf 1 point à  $J_2$  qui est en dehors de la borne IMA<sub>1</sub>). Cela met en évidence l'importance de travailler avec des triplicats.

Pour les 4 échantillons testés, les points expérimentaux et les moyennes calculées chaque jour restent généralement dans la borne IMA<sub>1</sub> (variation de 20% maximum) pendant toute la durée de l'étude. Certains points expérimentaux sont en dehors de la borne IMA<sub>2</sub> du fait que l'incertitude élargie est faible (15%), comme cela a été discuté précédemment.

On peut donc conclure que l'hydrazide maléique est stable dans ces 4 échantillons stockés à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  pendant 7 jours.

### **Conclusion**

L'hydrazide maléique est stable pendant 7 jours dans des échantillons d'eau de surface et souterraine (COT de 0,5 à 9,4 mg/L et MES jusqu'à 11 mg/L), à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

### 3. Etude de la stabilité du 1,2,4-triazole dans des eaux souterraines

#### 3.1. METHODOLOGIE

##### 3.1.1. Choix de la molécule pour l'essai

La molécule analysée au cours de cet essai n'est pas citée dans l'avis agrément [4]. Elle n'a pas de LQ réglementaire.

Le 1,2,4-triazole (code SANDRE 6808) est un métabolite de plusieurs pesticides (une quinzaine) [12] faisant partie des familles chimique SANDRE « Triazoles et imidazoles » ou « Triazines et métabolites ». Ils sont listés dans le Tableau 6, avec leur code SANDRE, leur utilisation, le niveau de connaissance sur leur stabilité et leur autorisation en France. Dans une des autorisations de mise sur le marché disponible pour les composés parents (difénoconazole), une exigence porte sur la mise en place d'une surveillance dédiée au métabolite 1,2,4-triazole dans les eaux souterraines. Dans le dossier d'homologation de l'amitrole, le métabolite 1,2,4-triazole est classé pertinent pour la toxicité suivant la classification Rep Cat2 H361d (substance suspectée toxique pour la reproduction humaine) [12]. Actuellement, ce composé est très peu recherché dans les eaux souterraines d'après les données disponibles dans la base ADES (portail national d'accès aux données sur les eaux souterraines). Tous ces éléments montrent l'importance d'acquérir de nouvelles données sur le métabolite 1,2,4-triazole. Cette étude permet de préciser les recommandations opérationnelles pour son analyse.

Le guide [3] recommande de prendre en compte les molécules « parents » lors de l'étude de la stabilité d'un produit de dégradation. De plus, la stabilité de ce dernier ne peut être supérieure à celle des molécules « parents ». La stabilité de certaines de ces molécules a été documentée [1]. Ces données sont reportées dans le Tableau 6.

Composé	Code SANDRE	Utilisation	Famille SANDRE	Approuvé en France (à la date de Février 2019) ?	Conclusion sur la stabilité [1]	Testé dans cette étude ?
Amitrole	1105	Herbicide	Triazoles et imidazoles	non	confirmation nécessaire	oui
Bitertanol	1529	Fongicide	Triazines et métabolites	non		oui
Cyproconazole	1680	Fongicide	Triazines et métabolites	oui	stable	oui
Difénoconazole	1905	Fongicide	Triazoles et imidazoles	oui	confirmation nécessaire	oui
Epoxiconazole	1744	Fongicide	Triazines et métabolites	oui	stable	oui
Fenbuconazole	1906	Fongicide	Triazines et métabolites	oui		oui
Fluquinconazole	2056	Fongicide	Triazines et métabolites	oui mais aucun produit commercial autorisé		oui
Hexaconazole	1405	Fongicide	Triazines et métabolites	non		oui
Ipconazole	7508	Fongicide	Triazoles et imidazoles	oui		oui
Mefentrifluconazole	non référencé	Fongicide	non référencé	oui mais aucun produit commercial existant		non
Myclobutanil	1881	Fongicide	Triazines et métabolites	oui		oui
Pacloubutrazol	2545	Régulateur de croissance	Triazines et métabolites	oui		oui
Penconazole	1762	Fongicide	Triazines et métabolites	oui		oui
Propiconazole	1257	Fongicide	Triazines et métabolites	oui	confirmation nécessaire	oui
Tébuconazole	1694	Fongicide	Triazoles et imidazoles	oui	stable	oui
Triadimenol	1280	Fongicide	Triazoles et imidazoles	oui	confirmation nécessaire	oui

Tableau 6 : Molécules parents pouvant conduire à la formation de 1,2,4-triazole par dégradation : descriptions et informations relatives à l'utilisation en France et à la stabilité (cellule vide : molécules non étudiée dans le rapport [1])

La dégradation de 15 molécules « parents » entraînant la formation du métabolite 1,2,4-triazole a donc été prise en compte dans cette étude. Le composé mefentrifluconazole n'a pas été utilisé dans cette étude car le dossier EFSA de ce composé est sorti en juillet 2018 et le dimensionnement de l'étude était déjà finalisé (fabrication des solutions pour le dopage). Le but de ces essais était d'adapter le protocole afin d'évaluer si ces molécules se dégradent en 1,2,4-triazole pendant la durée de l'étude, mais il ne s'agissait pas de déterminer la durée de stabilité des 15 molécules « parents ».

### 3.1.2. Protocole général

Parmi les approches décrites dans le guide [3], c'est une approche chronologique qui a été retenue pour cette molécule. Le principe est présenté dans la Figure 1 (§2.1.2).

Pour cette étude, les teneurs en 1,2,4 triazole ont été mesurées, pour chaque échantillon d'eau et à chaque pas de temps dans les 3 échantillons suivants :

- un échantillon dopé avec le 1,2,4 triazole,
- un échantillon non dopé (témoin) afin de caractériser les échantillons d'eau utilisés. Cela permet de surveiller l'apparition de 1,2,4-triazole qui pourrait être due à la dégradation de molécules parents initialement présentes dans les eaux avant dopage,
- un échantillon dopé avec les 15 molécules parents listées dans le Tableau 6.

Les échantillons « témoin » ont également été analysés par un laboratoire extérieur au début et à la fin de l'étude afin de contrôler la présence de ces composés au début de l'étude et leur apparition sur la durée de l'étude.

Quatre échantillons d'eau différents ont été utilisés et une seule concentration a été testée, à un niveau au moins 5 fois supérieur à la limite de quantification et dans le premier quart du domaine d'étalonnage. Les valeurs cibles de dopage sont données dans le § 3.1.6.

Le nombre de réplicats à réaliser à  $J_0$  est défini dans le guide [3] en fonction de l'écart type de fidélité de la méthode. Dans cette étude, il est inférieur à 5% ; 6 réplicats pour  $J_0$  sont donc à mettre en œuvre.

Pour récapituler, le détail des opérations pour la réalisation de cette étude est donné ci-dessous :

- Dopage dans un ordre aléatoire de tous les flacons le premier jour de l'essai ( $J_0$ ). Comme dans le cas de l'hydrazide maléique, le volume nécessaire pour l'analyse est faible (injection de 0,5 mL d'échantillon). Il a été décidé de travailler à partir d'une bouteille par type d'eau et de prélever à chaque pas de temps dans la même bouteille. Pour chaque eau testée, les flacons suivants ont été préparés :
  - 1 flacon de 1 litre non dopé,
  - 1 flacon de 1 litre dopé à 500 ng/L en 1,2,4-triazole,
  - 1 flacon de 1 litre dopé à 500 ng/L pour chaque molécule « parent ».
- Stockage des flacons à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$
- Injection directe et analyse instrumentale des échantillons dans des conditions de répétabilité à différents pas de temps entre  $J_0$  et  $J_6$
- Nombre de réplicats à chaque pas de temps :
  - pour les flacons non dopés : 6 à  $J_0$  puis 3 à  $J_1$ ,  $J_2$ ,  $J_3$ , et  $J_6$
  - pour les dopages en 1,2,4-triazole : 6 à  $J_0$  puis 3 à  $J_1$ ,  $J_2$ ,  $J_3$ , et  $J_6$
  - pour les dopages en molécules parents : 3 à  $J_0$ ,  $J_1$ ,  $J_2$ ,  $J_3$ , et  $J_6$

### 3.1.3. Choix des matériaux d'étude

Le but de cette étude de stabilité est de tester des échantillons d'eau ayant des caractéristiques différentes. Il a été choisi dans le cadre de cette étude, de travailler avec trois échantillons d'eaux souterraines et une eau embouteillée. L'étude n'a pas été menée sur une eau de surface car aucun test préliminaire sur ce type de matrice n'avait été réalisé auparavant pour cette molécule.

### 3.1.4. Echantillonnage

Les échantillons d'eau ont les provenances suivantes :

- Une eau souterraine provenant d'un piézomètre présent sur le site du BRGM (Loiret)
- Une eau souterraine provenant de Charente
- Une eau souterraine prélevée dans un puits (Loiret)
- Une eau embouteillée : Contrex®

Pour chaque station de mesure, 10 L d'eau ont été prélevés dans des flacons en verre de 2,5 L, préalablement nettoyées et calcinées à 500°C. En attente de la mise en flacons (cf 3.1.5), les flacons ont été stockés à 5±3°C, à l'abri de la lumière.

### 3.1.5. Mise en flacons

Chaque eau a ensuite été homogénéisée en jerricane de 25 L avec agitation manuelle puis un fractionnement a été réalisé pour la mise en flacons de 1L. Les flacons utilisés pour l'étude sont des flacons en verre vert de 1 L, identiques à ceux utilisés pour l'étude de l'hydrazide maléique (cf Illustration 1).

Les flacons ont été pesés pour contrôler le volume d'eau contenu dans chacun. Des flacons ont été préparés afin de réaliser une caractérisation physico-chimique des eaux à J<sub>0</sub>.

### 3.1.6. Protocoles de dopage et analyse

Le dopage a été réalisé le lendemain de la mise en flacon. Les concentrations ajoutées pour chaque molécule sont données dans le Tableau 7. Pour chaque eau testée, les dopages se sont faits par ajout de 100µL de la solution mère en 1,2,4-triazole dans 1 L d'eau et par ajout de 500µL de la solution mère en molécules « parents » dans 2,5L d'eau. Après chaque dopage, les flacons ont été refermés immédiatement, et agités.

Il a été choisi de travailler avec des concentrations élevées en molécules « parents » (500 ng/L pour chaque molécule) dans l'échantillon dopé avec les molécules « parents », afin de pouvoir quantifier le sous-produit 1,2,4-triazole, s'il se forme, même si seulement une faible proportion des molécules parents se dégrade au cours de l'étude. Pour préparer la solution de dopage en molécules « parents », une solution faite à façon chez un fournisseur spécialisé a été commandée.

Composé	Concentration cible (ng/L)	LQ laboratoire (ng/L)	Laboratoire d'analyse	Méthode d'analyse
1,2,4-triazole	500	50	BRGM	injection directe LC-MS/MS
Amitrole	500	50	laboratoire extérieur	Dérivation – LC : fluorimétrie
Bitertanol	500	10	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Cyproconazole	500	10	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Difenoconazole	500	10	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Epoxiconazole	500	20	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Fenbuconazole	500	20	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Fluquinconazole	500	20	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Hexaconazole	500	10	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Ipconazole	500	Non analysé	Non analysé	Non analysé
Myclobutanil	500	20	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Paclobutrazole	500	5	laboratoire extérieur	SBSE – GC-MS/MS
Penconazole	500	10	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Propiconazole	500	20	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Tebuconazol	500	10	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS
Triadimenol	500	20	laboratoire extérieur	injection directe LC-MS/MS

Tableau 7 : Concentrations ciblées, LQ des laboratoires, laboratoire réalisant l'analyse et principe de la méthode d'analyse pour l'étude de stabilité de 1,2,4-triazole -

### **Analyse de 1,2,4-triazole**

Le jour du dopage des flacons, pour les 4 échantillons d'eau, les prélèvements pour analyse suivants ont été réalisés, directement dans les flacons de 1 L en verre ayant servi aux dopages, puis la concentration en 1,2,4-triazole a été mesurée :

- 6 réplicats de l'échantillon non dopé
- 6 réplicats de l'échantillon dopé avec 1,2, 4-triazole.
- 3 réplicats de l'échantillon dopé avec les « parents ».

Les concentrations en 1,2,4-triazole dans les solutions de dopage ont également été contrôlées. Les flacons ont ensuite été stockés au réfrigérateur ( $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Chaque prélèvement pour J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub> et J<sub>7</sub> a été réalisé en triplicat, directement à partir de chaque flacon de 1 L ayant été dopé. A la fin de l'essai, le volume total prélevé dans chaque flacon de 1 L est d'environ 250mL. Les prélèvements ont été réalisés après une remise à température ambiante de 1 h.

L'analyse de 1,2,4-triazole a été réalisée par injection directe UPLC-MS/MS. La méthode d'analyse du 1,2,4-triazole est décrite dans la fiche méthode AQUAREF MA-77. Cette méthode a été validée pour les eaux souterraines, contenant donc une teneur en MES faible (inférieure à 2 mg/L).

Au cours de ces essais, tous les contrôles qualité effectués au laboratoire étaient conformes aux critères qualité du laboratoire, validant ainsi l'intégralité des données acquises.

Le Tableau 8 donne les incertitudes de la méthode pour différents niveaux de concentration (NF EN ISO 11352).

	Incertitude U (k=2)		
	Entre la LQ et 100 ng/L	Entre 100 et 300 ng/L	Entre 300 et 1000 ng/L
1,2,4-triazole	20%	15%	10%

Tableau 8 : Données de validation initiale de la méthode analytique du 1,2,4-triazole

### **Analyse des molécules « parents » dans les échantillons « témoin »**

Les informations fournies par le laboratoire extérieur sur les méthodes et performances analytiques pour l'analyse des molécules parents sont données dans le Tableau 7.

Les molécules « parents » ont été analysées dans les échantillons « témoin » à deux pas de temps :

- Au début de l'étude (J<sub>2</sub>)
- Juste après la fin de l'étude (J<sub>7</sub>)

*Remarque* : initialement, il était prévu que les échantillons soient analysés à J<sub>1</sub>, mais un problème de transport a retardé l'arrivée des échantillons au laboratoire et l'analyse a été faite à J<sub>2</sub>.

Aucun calcul statistique n'est réalisé sur ces résultats.

#### **3.1.7. Analyses physico-chimiques des eaux le jour du dopage (J<sub>0</sub>)**

Des analyses physico-chimiques des eaux ont été réalisées à J<sub>0</sub>. Les résultats sont consignés dans le Tableau 9.

	unité	CONTREX (Embouteillée)	Charente (ESO)	Piézomètre BRGM (ESO)	Puits (ESO)
pH	U	7.7	7.9	7.8	7.8
MES	ml/L	< 2	< 2	< 2	< 2
Conductivité à 25°C	µS/cm	2190	613	444	167
COT	ml/L	< 0.5	< 0.5	0.7	1.6
CO <sub>3</sub>	ml/L	< 10	< 10	< 10	< 10
HCO <sub>3</sub>	ml/L	357	273	231	66
Ca	ml/L	470.1	110.4	72	20.4
Fe	ml/L	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
K	ml/L	3.2	1.6	3.5	2
Mg	ml/L	74.3	3.1	4.3	2.6
Na	ml/L	8.7	9.8	10.8	6.1
SiO <sub>2</sub>	ml/L	9	8.3	35.2	11.1
Cl	ml/L	10.3	19.7	20	7.2
F	ml/L	0.3	0.1	< 0.1	0.1
NH <sub>4</sub>	ml/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
NO <sub>2</sub>	ml/L	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
NO <sub>3</sub>	ml/L	3.3	56.6	1.9	1.9
PO <sub>4</sub>	ml/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05	0.22
SO <sub>4</sub>	ml/L	1197.1	11	4.9	10.6

Tableau 9: Caractérisation physico-chimique des eaux (souterraines ou embouteillée) au début de l'étude de stabilité du 1,2,4-triazole

L'eau Contrex® a une conductivité nettement supérieure aux eaux souterraines. La Contrex® étant une eau de consommation connue pour son taux de minéralisation élevé, on observe effectivement des concentrations plus importantes en bicarbonates, calcium, magnésium et sulfates. On note une concentration de 35,2 mg/L en silice dans le piézomètre du BRGM, environ trois fois plus élevées que celle des autres eaux ainsi qu'une concentration en nitrate beaucoup plus élevée (56,6 mg/L) dans l'eau souterraine de Charente.

## 3.2. RESULTATS

### 3.2.1. Principe de traitement des données à J<sub>0</sub>

Le principe de traitement des données à J<sub>0</sub> est identique à celui détaillé dans le paragraphe §2.2.1.

### 3.2.2. Application aux résultats de l'étude

#### **Validation des données à J<sub>0</sub>**

Pour chacun des 4 échantillons d'eau, un extrait non dopé « témoin » a été analysé à J<sub>0</sub> en triplicat. Des traces de 1,2,4-triazole ont été détectées dans les échantillons « Puits » et « Charente » (cf respectivement Figure 10 et Figure 12) et dans la solution de dopage parents, mais avec des concentrations <LQ. Elles n'ont donc pas été prises en compte pour les calculs.

Les tests d'exactitude (écarts normalisés < 2) ont donné des résultats satisfaisants, comme cela est présenté dans le Tableau 10.

<b>Eau</b>	<b>Ecart normalisé</b>
Charente (ESO)	0,64
BRGM Loiret (ESO)	0,42
Puits (ESO)	0,03
Contrex® (embouteillée)	0,49

Tableau 10: Calcul des écarts normalisés à  $J_0$  obtenus pendant l'étude de stabilité du 1,2,4-triazole

La répétabilité à  $J_0$  est faible. Elle est donnée pour chaque matrice dans le Tableau 11, ainsi que les valeurs de  $IMA_1$  et  $IMA_2$  utilisées pour conclure quant à la stabilité de la substance. Pour 2 échantillons, on ne vérifie pas la condition  $ImO < IMA_2$ . Le critère opérationnel  $IMA_2$  ne pourra donc pas être utilisé pour statuer sur la stabilité de 1,2,4-Triazole, seul le critère  $IMA_1$  (variation de la concentration moyenne de 20% maximum) sera utilisé. A titre indicatif,  $IMA_2$  sera toutefois présenté sur les graphiques.

<b>Eau</b>	<b>ImO (%) = <math>2Cv_r(J_0)</math> (%)</b>	<b>IMA<sub>1</sub> (%)</b>	<b>IMA<sub>2</sub> : U/2 (%)</b>
Charente	4	20	5
BRGM Loiret	6	20	5
Puits	2	20	5
Contrex®	8	20	5

Tableau 11: Valeurs des  $ImO$  ( $n=6$ ) et  $IMA$  pour l'étude de stabilité de 1,2,4-triazole

## Résultats

La présence des molécules « parents » dans les échantillons non dopés a été recherchée au début et à la fin de l'étude. Pour chaque échantillon d'eau, et à chaque pas de temps analysé, aucune molécule n'a été quantifiée. Les LQ pour l'analyse des molécules « parents » sont données dans le Tableau 7.

Les résultats pour les mesures de 1,2,4-triazole sont présentés sous forme graphiques. Pour chaque échantillon, la légende est la suivante :

- Concentration dans l'échantillon témoin (non dopé)
- Concentration dans l'échantillon dopé avec 1,2,4-triazole
- Concentration dans l'échantillon dopé avec les molécules « parents »
- ◆ Moyennes (échantillon dopé avec 1,2,4-triazole)
- - IMA<sub>1</sub>: critère 20%
- - IMA<sub>2</sub>: U/2
- .....LQ 1,2,4-triazole

Pour Les échantillons « Charente » et « puits », des graphiques supplémentaires présentent les concentrations en 1,2,4-triazole dans les flacons « témoin » et dans les flacons dopés avec les molécules « parents » Il s'agit de concentrations faibles, proches, ou inférieures à la LQ validée. Elles ont été données à titre informatif, il y a en a, en effet, une incertitude importante pour ces valeurs.

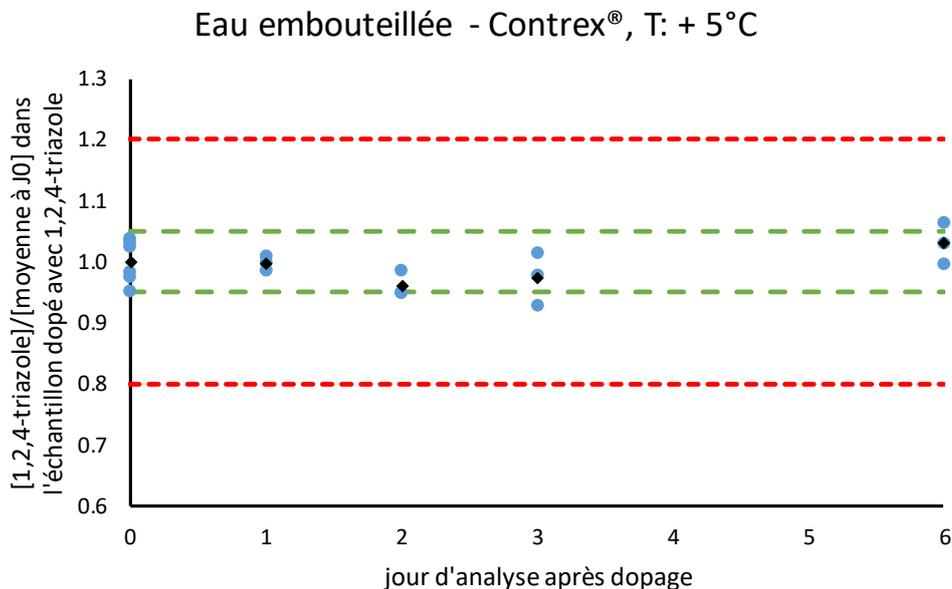


Figure 7 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau embouteillée CONTREX® après dopage par une solution de 1,2,4-triazole. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à J<sub>0</sub>

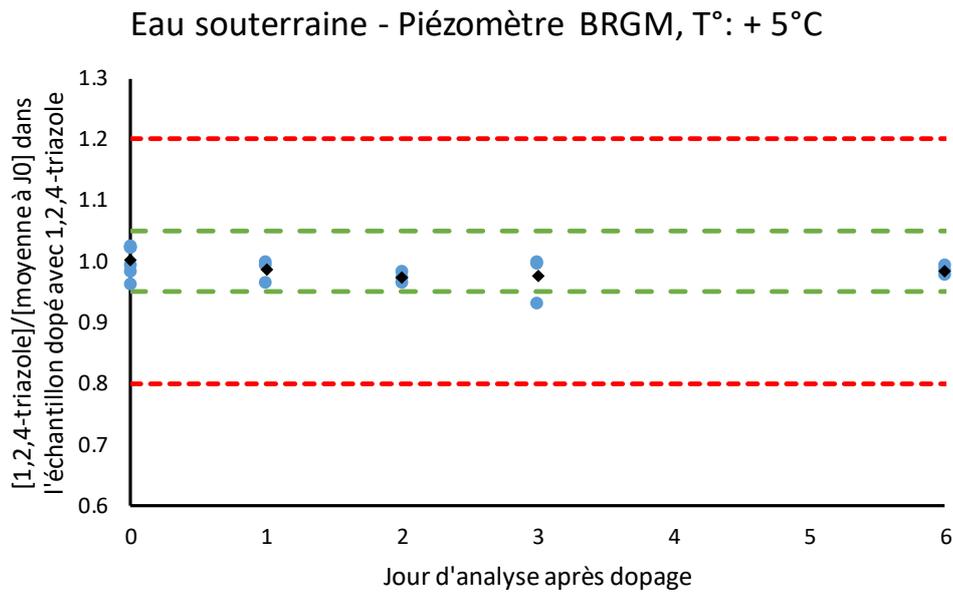


Figure 8 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine du piézomètre BRGM après dopage par une solution de 1,2,4-triazole. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$

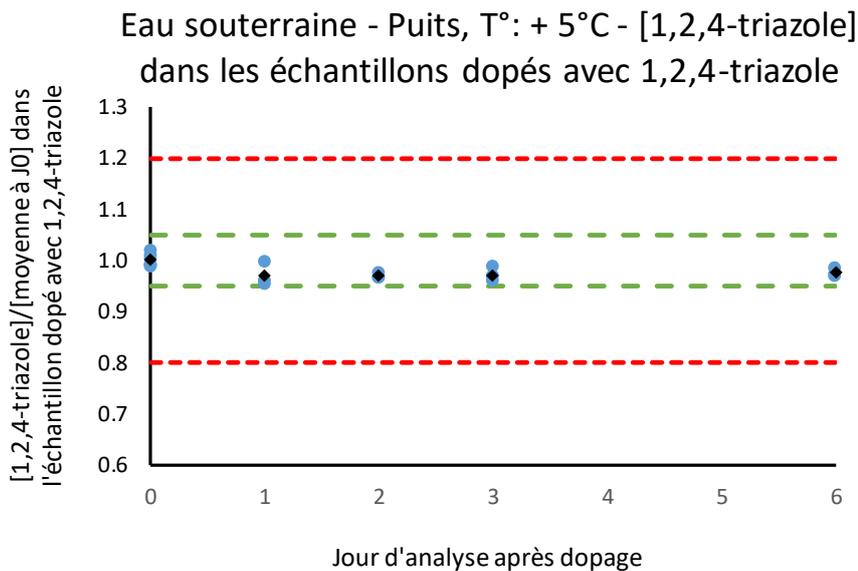


Figure 9 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine « puits » après dopage par une solution de 1,2,4-triazole. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$

Eau souterraine- Puits, T: + 5°C - [1,2,4-triazole]  
dans les échantillons non dopés et dans ceux dopés  
avec les molécules parents

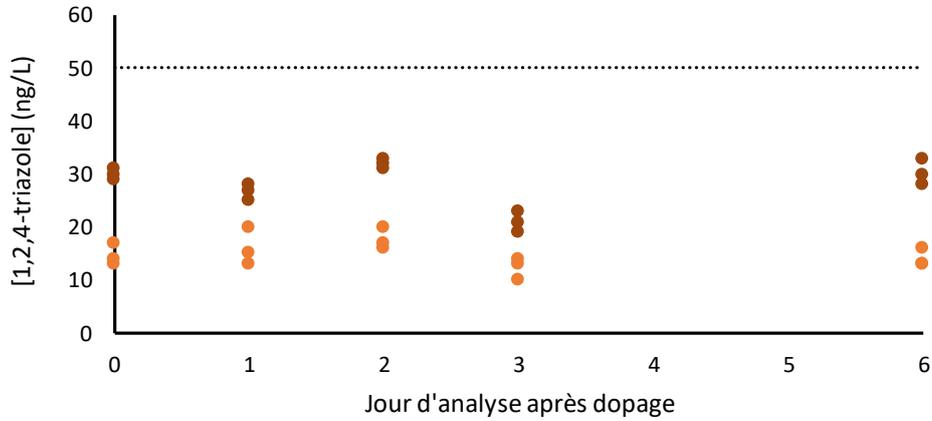


Figure 10 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine « puits » dans l'échantillon non dopé (en orange) et dans un échantillon dopé par une solution contenant 15 molécules parents de 1,2,4-triazole (en marron). Ces valeurs sont inférieures à la limite de quantification et sont données à titre indicatif

Eau souterraine- Charente, T: + 5°C - [1,2,4-triazole]  
dans les échantillons dopés avec 1,2,4-triazole

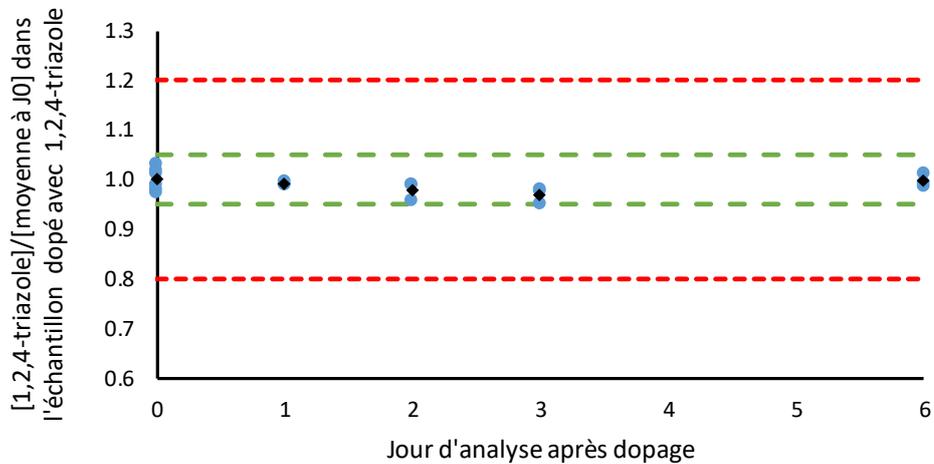


Figure 11 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine « Charente » après dopage par une solution de 1,2,4-triazole. Les résultats sont normalisés par la moyenne des mesures à  $J_0$

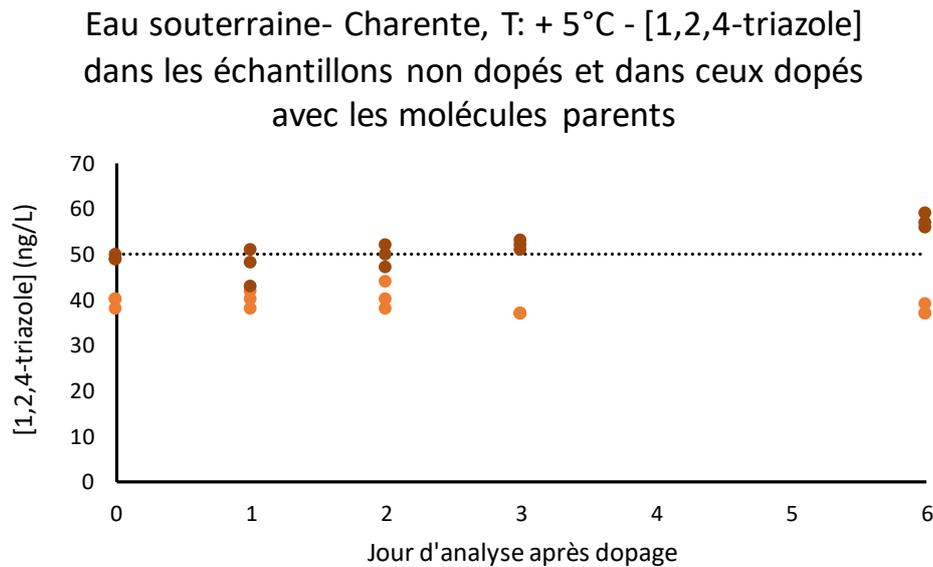


Figure 12 : Evolution temporelle des concentrations en 1,2,4-triazole dans l'eau souterraine « Charente » dans l'échantillon non dopé (en orange) et dans un échantillon dopé par une solution contenant 15 molécules parents de 1,2,4-triazole (en marron). Ces valeurs sont inférieures à la limite de quantification et sont données à titre indicatif

L'exactitude à  $J_0$  est vérifiée pour les 4 matrices testées et la dispersion à  $J_0$  est faible.

Dans les échantillons témoins « piézomètre BRGM » et de l'eau embouteillée Contrex®, le 1,2,4-triazole n'est pas quantifié. En effet dans ces échantillons, la concentration en 1,2,4-triazole est inférieure à 50 ng/L.

Concernant les dopages en molécules parents, des traces de 1,2,4-triazole aient été initialement retrouvées dans la solution de dopage initiale (à hauteur environ de 10 ng/L dans la solution de dopage des molécules parents). Aucune concentration > LQ de 1,2,4-triazole n'est quantifiée de  $J_0$  à  $J_6$  dans les échantillons dopés avec cette solution provenant du « piézomètre BRGM » et l'eau embouteillée Contrex®.

Dans les échantillons « Charente » et « puits », le 1,2,4-triazole est détecté dès  $J_0$ , aussi bien dans l'échantillon « témoin » (non dopé) que dans l'échantillon dopé avec les molécules « parents » avec une concentration proche de la LQ (50 ng/L, cf. Figure 12) pour l'échantillon « Charente », et une concentration de l'ordre de 30 ng/L (cf Figure 10) pour l'échantillon « puits ». La concentration en 1,2,4-triazole est plus élevée dans l'échantillon dopé avec les parents par rapport aux échantillons « témoins ». Comme précisé précédemment, cette différence vient de la solution de dopage des parents, qui contient environ 10 ng/L de 1,2,4-triazole. La concentration reste constante au cours de l'étude. Cela ne met pas en évidence de formation de 1,2,4-triazole (via la dégradation des molécules parents), ni de dégradation de la molécule pour les deux échantillons.

Pour les 4 échantillons d'eau, les données expérimentales restent dans les bornes définies par  $IMA_1$  et cette étude n'a pas mis en évidence de formation de 1,2,4-triazole du fait de la dégradation des molécules « parents » (15 molécules testées). Il est important de rappeler que cette étude n'était pas dimensionnée pour statuer sur la stabilité des 15 molécules parents. En effet, seul un produit de dégradation commun à toutes ces molécules « parents », 1,2,4-triazole, a été étudié, et d'autres voies de dégradation existe pour chaque composé.

## **Conclusion**

La stabilité du 1,2,4-triazole est vérifiée pendant 6 jours dans les eaux souterraines et embouteillées (COT jusqu'à 1,6 mg/L et conductivité de 170 à 2200  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

## 4. Conclusion

Cette étude avait pour objectif d'étudier la stabilité en laboratoire de l'hydrazide maléique et du 1,2,4-triazole dans des échantillons d'eau. L'hydrazide maléique est un herbicide et un inhibiteur de la croissance végétale qui fait partie des listes réglementaires pour les eaux souterraines. Le 1,2,4-triazole est un métabolite commun à de nombreux herbicides et fongicides.

Les objectifs de ces études sont multiples. D'une part, cela permet d'acquérir de la connaissance sur la stabilité de ces substances organiques pour laquelle très peu de données sont disponibles, notamment pour la révision de norme NF EN ISO 5667-3. D'autre part, cela permet de mettre en application les recommandations du guide méthodologique AQUAREF intitulé « lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau » [3] et d'alimenter les discussions avec les laboratoires nationaux dans le cadre de la préparation d'un document normatif pour la réalisation de telles études de stabilité.

Deux études distinctes ont été réalisées pour les 2 molécules du fait que les méthodes analytiques sont différentes.

Pour l'hydrazide maléique, 2 échantillons d'eau de surface et 2 échantillons d'eau souterraine ont été utilisés, et l'étude a été réalisée sur 7 jours.

Pour le 1,2,4-triazole, 3 échantillons d'eau souterraine et 1 échantillon d'eau embouteillée ont été utilisés et l'étude a été réalisée sur 6 jours. L'originalité de l'étude portant sur 1,2,4-triazole réside dans le fait que la dégradation des molécules « parents » (entraînant la formation du métabolite 1,2,4-triazole) a été prise en compte. Le protocole a été adapté afin d'évaluer si ces molécules se dégradent en 1,2,4-triazole pendant la durée de l'étude mais la stabilité des 15 molécules « parents » n'a pas été évaluée pour chaque molécule.

Pour le traitement des résultats, l'exactitude des données à  $J_0$  ( $CVr(J_0)$ , %) a été contrôlée et vérifiée. Cette condition permet de s'assurer de la bonne maîtrise de la méthode d'analyse. La dispersion des données à  $J_0$  permet de définir la variation minimale que l'étude est capable de détecter. Des limites de tolérance plus opérationnelles sont ensuite fixées, appelées « Instabilité Maximale Acceptable » (IMA). Dans ce travail, la stabilité est évaluée en utilisant un critère qui a été utilisé dans d'autres études AQUAREF (perte acceptable de 20% après 7 jours).

Ces essais ont montré que l'hydrazide maléique est stable au moins 7 jours à  $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$  dans des échantillons d'eaux (eaux de surface et souterraines), stockés à l'abri de la lumière ayant des teneurs en MES jusqu'à 11,0 mg/L et COT jusqu'à 9,4 mg/L. De même, 1,2,4-triazole est stable au moins 6 jours à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  dans des échantillons d'eaux (eaux souterraines et avec une minéralité élevée), stockés à l'abri de la lumière, ayant des teneurs en COT jusqu'à 1,6 mg/L et une conductivité de 170 à 2200  $\mu\text{S/cm}$ .

Ces essais ont permis de tester l'approche chronologique décrite dans le guide AQUAREF et de mettre en œuvre une étude de stabilité pour un produit de dégradation. La mise en application des recommandations du guide n'a pas posé de difficultés. Ils ont été menés sur un nombre restreint d'échantillons et ne constituent pas une étude générale sur la stabilité de ces substances. Mais ils permettent néanmoins d'apporter de l'information sur ces molécules pour lesquelles il n'y pas d'information sur la stabilité et serviront pour la mise à jour de l'étude bibliographique [1].



## 5. Bibliographie

1. **P. Moreau, J.-P. Ghestem, and B. Lepot**, "Délais de mise en analyse de paramètres surveillés dans les eaux naturelles continentales : synthèse documentaire et recommandations - version 2017 -rapport AQUAREF 2017 - BRGM/RP-68012-FR", (2017).
2. **AQUAREF**, "Opérations d'échantillonnage d'eau pour la surveillance des milieux aquatiques - Module spécifique DOM - Recommandations techniques - Edition 2017", (2017).
3. **S. Lardy-Fontan and B. Lalere**, "Lignes directrice pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau - rapport AQUAREF LNE 2016", (2016).
4. **Ministère de l'écologie du développement durable et de l'énergie**, "Avis relatif aux limites de quantification des couples 'paramètres-matrice' de l'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques du 8 novembre 2015", (2015).
5. **S. Bristeau**, "Hydrazide maléique - Méthode d'analyse dans l'eau (fraction aqueuse) - Fiche méthode AQUAREF MA-73", (2018).
6. **AQUAREF**, "Opérations d'analyse physico-chimique des eaux et des sédiments en milieu continental dans le cadre des programmes de surveillance DCE - Recommandations techniques - Edition 2016", (2016).
7. "PR FD T90-230 -Qualité de l'eau - caractérisation des méthodes d'analyses - Guide pour la sélection d'une matrice représentative d'un domaine d'application."
8. **Moreau P. and Ghestem J.P.**, "Etude de la stabilité de 11 substances pertinentes à surveiller (SPAS) dans des échantillons d'eau de surface - rapport AQUAREF 2016 - BRGM/RP-66632-FR - 54p", (2016).
9. **P. Moreau, A. Yari, and J. P. Ghestem**, "Etude de stabilité de 46 pesticides dans des échantillons d'eau de surface - AQUAREF 2015 - BRGM/RP-64034-FR", (2015).
10. **S. Ngo, B. Lepot, and S. Lardy-Fontan**, "Etude de la stabilité de 17 HAP dans des échantillons d'eau de surface - rapport AQUAREF 2016 - 62p", (2016).
11. **P. Moreau and J.-P. Ghestem**, "Etude de la stabilité de sotalol, béflubutamide, Nbutylbenzènesulfonamide (NBBS) et N,N-diméthyl-N'-p-tolylsulphamide (DMST) dans des échantillons d'eau de surface. Rapport final AQUAREF 2017 - BRGM/RP-67510-FR, 40p.", (2017).
12. **N. Baran and S. Bristeau**, "Besoins Analytiques sur les métabolites de pesticides: liste des substances issues des dossiers d'homologation et capacités actuelles des laboratoires - bilan 2015-2018 - rapport AQUAREF-rapport final RBRGM-RP-68112-FR", (2018).







**Centre scientifique et technique**  
**Direction des laboratoires**  
3, avenue Claude-Guillemin

BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34

[www.brgm.fr](http://www.brgm.fr)