

## Fipronil

### Méthode d'analyse dans les sédiments

Généralités .....	2
Protocole analytique .....	3
— Prétraitement .....	3
— Analyse .....	4
Références de la méthode.....	7
Paramètres de validation de la méthode .....	7
Contacts.....	9

---

**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

Insecticide – Phénylpyrazoles

### ▪ Nom des substances individuelles

Fipronil (CAS : 120068-37-3)

### ▪ Code SANDRE des substances individuelles\*

Fipronil (2009)

### ▪ Matrice analysée

Sédiments [6]

### ▪ Principe de la méthode

Extraction QuEChERS suivie d'une étape de purification par SPE dispersive (d-SPE) et d'une analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

### ▪ Acronyme : QuEChERS-GC-MS/MS

### ▪ Domaine d'application

De 0,02 à 100 ng/g de matière sèche

### ▪ Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse

- Granulométrie
- COT
- Taux d'humidité

### ▪ Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode :

La méthode utilisée fait appel à une extraction de type QuEChERS, décrite par la suite. L'ajout de grande quantité de sel entraîne la formation d'agrégats si l'agitation ne se fait pas immédiatement, et peut ainsi compromettre les performances de la méthode.

### ▪ Interférents (préciser la matrice)

- Interférents identifiés : pas d'interférents rencontrés

## Protocole analytique

### — Prétraitement

#### ■ Fraction analysée

Sédiments :

- Fraction analysée inférieure à 2 mm [32]

#### ■ Conditionnement et conservation des échantillons

##### | Nature du contenant de stockage

Flacon en verre ambré ou en verre clair protégé de la lumière par une feuille en aluminium avec bouchon avec membrane en PTFE ou en aluminium.

##### | Lavage du contenant

Les flacons sont rincés à l'eau ultra pure et calcinés à 500°C pendant 8h

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

Une fois prétraités, les échantillons sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière dans des flacons en verre.

La stabilité a été évaluée par dopage en triplicat à une concentration connue d'un échantillon réel de sédiment sec à plusieurs pas de temps. Après évaporation du solvant de dopage et maturation de 16h à température ambiante, les échantillons dopés sont conservés à 4°C.

La stabilité a été déterminée selon l'approche pseudo-isochrone de type 1 définie dans le rapport Aquaref associé<sup>1</sup>.

Le critère d'instabilité maximale acceptable (IMA) a été fixé à 20%.

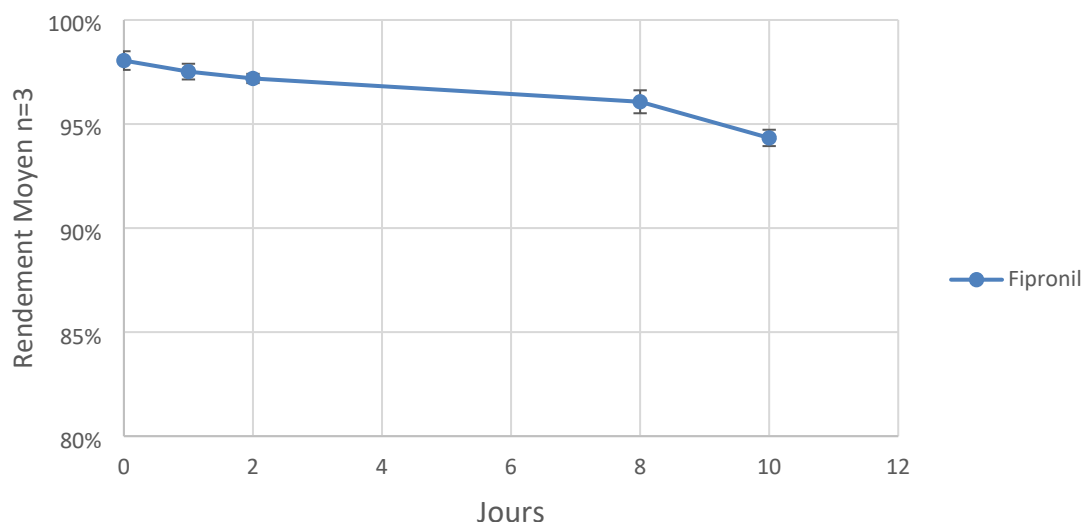


Figure 1 : Etude de stabilité à 4°C du sédiment 12AA614 dopé

La stabilité est de minimum **10 jours** dans ces conditions.

<sup>1</sup> Sophie Lardy-Fontan et Béatrice Lalere – Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau – Rapport AQUAREF 2006 –45 p

**▪ Filtration**

Sans objet

**▪ Pré-traitement des échantillons liquides ou solides**

Les échantillons sont congelés (-18°C) puis lyophilisés. Ils sont ensuite tamisés à 2 mm et broyés.

**— Analyse****▪ Volume de la prise d'essai**

2,5 g de sédiments (poids sec)

**▪ Extraction****Quechers**

1. Peser 2,5 g de sédiments dans un tube de 50 mL en PP adapté à la centrifugation
2. Ajouter 2,5 mL d'Eau Milli-Q et agiter manuellement pour homogénéiser
3. Doper ces sédiments avec 10 µL d'une solution de Fipronil  $^{15}\text{N}_2\text{-}^{13}\text{C}_2$  à 10 µg/mL dans l'acétate d'éthyle (EtOAc)
4. Ajouter 10 mL d'acétonitrile (ACN) et agiter manuellement pour homogénéiser
5. Ajouter les sels d'extraction : 4 g  $\text{MgSO}_4$  + 1 g NaCl (kit disponible : SST640, Interchim par exemple) et agiter immédiatement manuellement pour éviter la prise en masse du sulfate de magnésium.
6. Agiter au vortex pendant 2min
7. Centrifuger pendant 5 min à environ 1700 g
8. Récupérer le surnageant (~ 9 mL) dans un tube de 50 mL en PP adapté à la centrifugation

**▪ Purification****d-SPE**

1. Ajouter le kit d-SPE : 900 mg  $\text{MgSO}_4$  + 150 mg PSA (kit disponible : SST310, Interchim par exemple)
2. Agiter au vortex pendant 2min
3. Centrifuger pendant 5 min à 1730 g
4. Récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette puis le transférer dans une seringue de 10 mL en PE équipée d'un filtre seringue de 0,2 µm en HPTFE. Filtrer le surnageant dans un tube en verre préalablement calciné.
5. Concentrer le filtrat sous flux d'azote à 40°C maximum jusqu'à 0,1 mL
6. Récupérer qsp 0,5 mL avec de l'EtOAc

### ■ Conservation de l'extrait

Les extraits sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière.

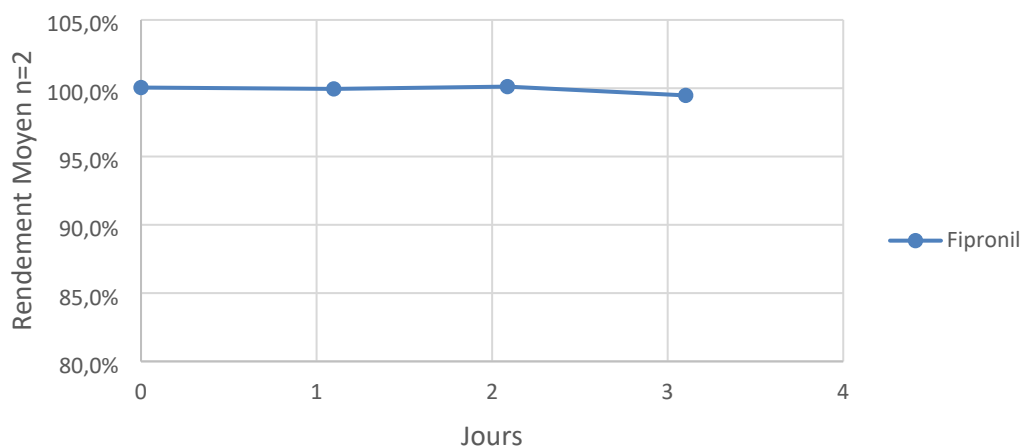


Figure 2 : Etude de stabilité de l'extrait du sédiment 12AA614 à 4°C dans l'EtOAc

Les extraits sont stables à minima **3 jours** dans ces conditions.

### ■ Volume ou masse finale avant analyse

0,5 mL ACN/EtOAc (1:4, v:v)

### ■ Méthode analytique utilisée

#### • Injection

- Volume d'injection : 1 µL
- Type d'injection : Split, Liner Restek 23 330 (Liner Split avec fritté en verre), Mode split ratio 2, Température : 250 °C
- Mode d'injection : Mode sandwich avec Analyte Protectant (solution de D-Gluconolactone à 600 µg/mL et de D-Sorbitol à 300 µg/mL dans de l'ACN)

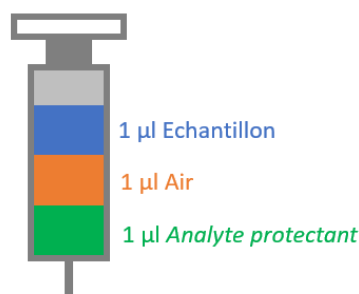


Figure 3 : Schéma de l'injection en « mode sandwich »

#### • Chromatographie

- Colonne HP-5 ms Ultra Inert 30 m x 250 µm, 0,25 µm Agilent ®
- Programme de température :
  - Initial : 50 °C pendant 1 min
  - Puis rampe de 15 °C/min jusqu'à 250 °C
  - Puis rampe de 30 °C/min jusqu'à 300 °C
- Gaz vecteur : 1,3 mL/min

- **Spectrométrie de Masse**
  - Source : HES
  - Ionisation : par Impact Electronique (EI) à 70 eV
  - Température de la ligne de transfert : 290°C
  - Température de la source : 230°C
  - Température des quadripôles : 150°C
  - Courant du filament : 100  $\mu$ A
  - Gaz de Collision : N<sub>2</sub> à 1,5 mL/min

Tableau 1 : Exemple de transitions spectrométriques

Nom	Temps de rétention (min)	Transition de quantification	Transition de qualification	Collision(eV)
Fipronil	14,18	367 > 213	367 > 255	25
			351 > 255	15
Fipronil <sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	14,18	371 > 213	373 > 215	30

- **Equipements<sup>2</sup>(modèles utilisés)**  
Chromatographie gazeuse (Agilent 7890B) couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle (Agilent 7010B)
- **Type d'étalonnage**  
Interne
- **Modèle utilisé**  
Polynomiale quadratique pondéré 1/X
- **Etalons / Traceurs utilisés :**  
L'étalon d'extraction utilisé est le Fipronil <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>
- **Domaine de concentration :**  
0,1 ng/mL à 600 ng/mL
- **Méthodes de calcul des résultats**  
Des contrôles qualité - blancs et échantillons dopés - sont mis en œuvre à chaque série d'analyses.
  - | **Rendement :**
    - Correction par le rendement : non
    - Utilisation de l'étalons interne marqué : oui
  - | **Blancs :**
    - Appareillage : Acétate d'éthyle + Analyte Protectant
    - Méthode : Sable de fontainebleau ou autre
    - Soustraction du blanc : non

<sup>2</sup> Les matériels cités ici constituent des exemples d'application satisfaisante. Ces mentions ne constituent pas une recommandation exclusive, ni un engagement quelconque de la part du rédacteur ou d'AQUAREF

## Références de la méthode

### La méthode est dérivée de la publication suivante

Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int. 86, 412–431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>

### Norme dont est tirée la méthode

Sans objet

### Niveau de validation selon Norman

Niveau 1

## Paramètres de validation de la méthode

### Norme utilisée

- XP X31-131 (2020) Caractérisation des performances initiales de la méthode
- NF ISO 11352 (2013) pour la détermination de l'incertitude de mesure. Les valeurs d'incertitudes ont été estimées à l'aide du logiciel MUKit, il s'agit d'incertitudes relatives élargies pour un niveau de confiance de 95% ( $k = 2$ )

Domaine de validation : De 0,02 ng/g à 96 ng/g

### Matériaux de référence utilisés

Pas de matériau de référence disponible.

La validation a été réalisée sur des sédiments issus d'une campagne exploratoire nationale en 2012<sup>3</sup>, sélectionnés de façon à couvrir une plage de paramètres divers tout en respectant les prérequis énoncés dans le XP X31-131. Ces propriétés sont détaillées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractérisation des sédiments utilisés pour la validation

Nom de l'échantillon	Station (Code SANDRE)	Granulométrie < 63µm	COT (%)
12AB514	Tréboul à Castelnaudary (06177910)	60,6%	2,45
12AB614	Luyes à Aix en Provence (06194000)	37,1%	4,09
12AA666	LOIRE à BAS-EN-BASSET (4004100)	45,3%	5,23
12AB100	Saône à Lyon (06059500)	24,6%	2,01
12AB156	Rhône à Arles (06131550)	28,8%	1,22
12AB192	BARAIZE à SAINT-DENIS-D'ANJOU (4607001)	33,1%	3,57

<sup>3</sup> <https://www.ineris.fr/sites/ineris.fr/files/contribution/Documents/onema-2012-drc-13-136939-12927a-rapport-%C3%A9tude-prospective-esc-vf-avec-signatures-1435305513.pdf>

En complément 3 sables ont été ajoutés pour compléter la série de sédiments :

- Sable 4 = sable de Fontainebleau (Référence = 27460.364, VWR)
- Sable 6 = sable Sigma (Référence = 274739)
- Sable 9 = Mix Sable 4 / Sable 6 (1/1 ; w/w)

▪ **Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)**

Les blancs d'appareillage et de méthode doivent être mis en œuvre lors de chaque série de d'extraction et d'analyse. Les valeurs typiques de blanc sont inférieures aux LQ. En cas de contamination des blancs instrumentaux, les extraits sont réinjectés. En cas de contamination du blanc méthode (>LQ), la série analytique est invalidée.

▪ **Rendement**

L'étude de rendement est réalisée dans des conditions de fidélité intermédiaire sur neuf échantillons de sédiment ou sable dopés en double à 4 niveaux de concentration après maturation pendant 16h selon les préconisations énoncées dans le XP X31-131.

Tableau 3 : Rendement moyen n=18

Matrice	0,02 ng/g	0,04 ng/g	24 ng/g	96 ng/g
12AB156	130 ± 5%	112 ± 3%	101 ± 1%	100 ± 1%
12AB614		125 ± 4%	98 ± 1%	100 ± 2%
12AB100	100 ± 1%	84 ± 2%	99 ± 1%	100 ± 1%
SABLE4	87 ± 1%	87 ± 2%	93 ± 1%	96 ± 1%
12AB514	136 ± 4%	122 ± 2%	101 ± 1%	101 ± 1%
SABLE6	86 ± 6%	95 ± 1%	95 ± 1%	97 ± 1%
12AB192	97 ± 7%	104 ± 6%	99 ± 3%	100 ± 1%
12AA666	135 ± 5%	114 ± 10%	98 ± 1%	100 ± 1%
SABLE9	85 ± 3%	87 ± 4%	93 ± 1%	91 ± 1%
<b>Moyenne n=18</b>	<b>107 ± 20%</b>	<b>103 ± 14%</b>	<b>97 ± 3%</b>	<b>98 ± 3%</b>

Les rendements sont calculés par série en déduisant la valeur moyenne des matrices non dopées (déduction des surfaces avant calcul de concentration). Ce choix a été effectué car, pour certaines matrices, les teneurs en fipronil initialement présentes (analyse en duplicat) dans les sédiments étaient proches de la LQ (premier niveau de dopage).

▪ **Limite de quantification (LQ)**

Détermination réalisée par ajout d'une quantité connue de Fipronil dans chacune des neuf matrices à différents jours de dopage et d'analyse dont le niveau de dopage le plus bas correspond à la valeur de LQ visée.

LQ validée = 0,02 ng/g

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

Exactitude : écart maximal acceptable de 60% à la LQ et de 30% sur les autres niveaux



Tableau 4 : Incertitudes élargies U (k=2) par niveau de concentration

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4
Valeur des niveaux (ng/g)	0,02	0,04	24	96
Incertitude estimée U% à k=2	66%	47%	12%	11%

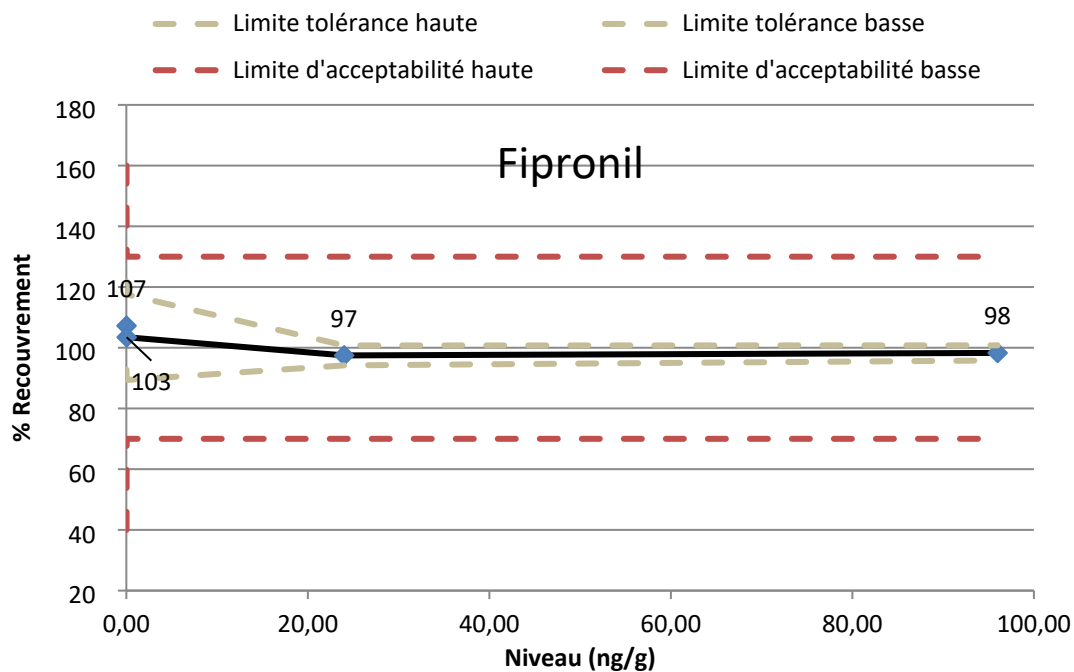


Figure 4 : représentation graphique de l'exactitude

## Contacts

### ■ Auteurs

Jérôme Beaumont, Nina Huynh, Ahmad El-Masri (INERIS)

### ■ Contact

[Jerome.beaumont@ineris.fr](mailto:Jerome.beaumont@ineris.fr), [Nina.huynh@ineris.fr](mailto:Nina.huynh@ineris.fr), [Ahmad.el-masri@ineris.fr](mailto:Ahmad.el-masri@ineris.fr)