

E-III-7V1 – DOSAGE DU CHLOROTHALONIL SA, DU MÉTOLACHLORE, MÉTAZACHLORE ET DE LEUR MÉTABOLITE PAR ULC/MS/MS

1. Objet

Dosage du chlorothalonil SA (VIS01), du métolachlore, du métazachlore et de leur métabolite par LC/MS/MS dans les eaux brutes.

2. Domaine d'application

La présente méthode décrit la détermination du chlorothalonil SA (VIS01), du métolachlore, du métazachlore et de leur métabolite (métolachlore ESA et métazachlore ESA) par chromatographie liquide ultra-performante (ULC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) après extraction solide-liquide (SPE).

La présente méthode est applicable à tous les types d'échantillons d'eaux brutes (eaux potables, eaux souterraines, eaux de surface).

La méthode est applicable pour des teneurs supérieures à 25 ng/l.

3. Principe

Les analytes sont extraits de l'échantillon à analyser par extraction solide-liquide (SPE) à pH acide, élués avec un solvant, séparés, identifiés et quantifiés par ULC/MS/MS par la méthode de l'étalonnage interne ou externe suivant les constituants.

4. Préparation de l'échantillon

Sans objet dans cette méthode.

5. Appareillages et matériels utilisés

Verrerie courante de laboratoire ;

- Balance analytique, permettant de peser avec une précision de 0.1 mg
- Pipettes Pasteur de 25 et 15 cm de long
- Fiole de 1.5 ml avec septum pré-fendu
- Berlins de 50 et 100 ml
- Erlenmeyers de 500 ml
- Pipettes de type Eppendorf de différents volumes, 10 à 100 µl et 100 à 1000 µl
- Tubes à essai de 10 ml adaptés à l'automate SPE.
- Rampe de concentration de solvant à l'N₂.
- Un bain thermostatique sec
- pH-mètre
- Un automate pour cartouches SPE
- Système ULC couplé à un détecteur triple quadripôle

6. Réactifs utilisés

Utiliser exclusivement des réactifs de qualité analytique reconnue.

- Eau ultra-pure, eau de qualité 2 conformément à l'ISO 3696
- Eau de source type Valvert
- Méthanol qualité ULC/MS comme éluant UPLC
- Méthanol pour HPLC pour la préparation des solutions étalons et pour l'extraction SPE
- Acétone pour analyses de résidus pesticides
- Acide formique de qualité ULC/MS
- Acide phosphorique concentré pour analyse ($d=1.69\text{kg/l}$)
- Etalons de référence : Matériaux de haute pureté ou certifiés (par exemple, standard Erhenstorfer)
- Azote de pureté 4.8 ou plus
- Colonnes SPE de type HLB (par exemple : OASIS HLB-WATERS 200 mg – 6 ml)
- Argon de pureté BIP

7. Echantillonnage

Les échantillons sont prélevés dans des bouteilles d'un litre en verre brun et remplies à ras bord. Ils sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière et subissent une phase d'extraction dès que possible après le prélèvement (de préférence dans les 24 heures et au maximum dans les 5 jours).

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des solutions étalons :

8.1.1. Solutions mères : 500 mg/l

Peser exactement environ 0,0125g de chaque constituant et les dissoudre chacun dans un volume de 25 ml d'acétone (sauf pour le métazachlore ESA à dissoudre dans le méthanol).

Conserver les différentes solutions à 4°C à l'abri de la lumière, pendant une durée maximale de 12 mois.

8.1.2. Solution fille : 1 mg/l

Introduire 50 µl de chaque solution mère (8.1.1) dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter au volume avec le mélange eau/méthanol (80/20).

Conserver la solution à environ 4°C, à l'abri de la lumière, pendant une durée maximale de 6 mois.

8.1.3. Solutions de référence pour l'étalonnage

Des solutions étalons de 10, 20, 40, 80, 160 et 320 ng/ml sont réalisées en prélevant respectivement 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 160 µl et 320 µl de la solution fille à 1 mg/l (8.1.2) et en les introduisant dans des jaugés de 1 ml. Ajouter également, avant la mise à volume, 100 µl de la solution fille du mélange du standard interne (8.1.5).

La solution étalon de 2 ng/ml est réalisée en prélevant 10 µl de la solution mère à 1 mg/l (8.1.2) et en l'introduisant dans un jaugé de 5 ml avec ajout de 500 µl de la solution fille du mélange du standard interne (8.1.5).

La solution étalon de 5 ng/ml est réalisée en prélevant 10 µl de la solution mère à 1 mg/l (8.1.2) et en l'introduisant dans un jaugé de 2 ml avec ajout de 200 µl de la solution fille du mélange du standard interne (8.1.5).

La mise à volume se fait avec le mélange eau/méthanol (80/20).

8.1.4. Solution mère de standard interne

Métolachlore-d6: solution commerciale à 100 mg/l dans l'acétone.

8.1.5. Solution fille de standard interne : 1 mg/l

Introduire 1 ml de la solution mère (8.1.4) dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au volume avec le mélange eau/méthanol (80/20).

8.2 Préparation de l'échantillon

8.2.1 Extraction

Si nécessaire, éliminer les matières en suspension par filtration sur un filtre en fibre de verre ou laisser décanter.

Doper 500 ml d'échantillon avec 200 µl de la solution fille d'étalon interne à 1 mg/l (8.1.5) puis mettre à pH 3 avec H₃PO₄ concentré. Peser le flacon d'échantillonnage avant et après enrichissement de la colonne pour vérifier le volume prélevé par l'automate (250 ml).

Sélectionner des conditions d'extraction permettant d'obtenir une concentration et une purification efficace (pour exemple, voir Annexe A).

Remarque : les mêmes conditions sont utilisées pour tous les échantillons d'un lot ainsi que pour le blanc et les échantillons visant à obtenir un rendement. Le même lot de cartouches SPE est utilisé.

8.2.2 Concentration

Evaporation du solvant d'élution (méthanol) à l'aide d'un bain sec thermostatisé à 45 °C et reprise du résidu sec avec 1 ml du mélange eau milliQ /méthanol (80/20).

8.3 Essai à blanc :

Effectuer parallèlement à la détermination un essai à blanc dans les mêmes conditions où l'échantillon est remplacé par 500 ml d'eau de boisson exempte des constituants à doser et dopée avec 200 µl de la solution d'étalon interne à 1 mg/l (8.1.5). Le blanc ne peut pas contenir d'interférents supérieurs à 10 % de la plus petite valeur mesurée, sinon rechercher les sources de contamination et les éliminer.



8.4 Essai rendement :

Pour chaque lot d'analyses, effectuer 1 essai "eau dopée" à 60 ng/l dans les mêmes conditions où l'échantillon est remplacé par un volume de 500 ml d'eau de boisson dopée avec 30 µl de la solution fille à 1 mg/l (8.1.2) des analytes et avec 200 µl de la solution fille d'étalon interne à 1 mg/l (8.1.5). Cet essai est réalisé pour confirmer que la procédure s'est déroulée correctement. Les valeurs de rendement sont reportées en cartes de contrôle. Les rendements doivent se situer entre 60 et 130 %.

8.5 Analyse par ULC/MS/MS

8.5.1 Conditions chromatographiques

Utiliser l'ULC conformément aux instructions opératoires du fabricant.

Sélectionner une colonne et des conditions chromatographiques permettant d'obtenir une séparation efficace (pour exemple, voir Annexe B).

8.5.2 Conditions MS

Le spectromètre de masse est réglé conformément aux instructions du fabricant. L'analyse est réalisée en mode MRM (multiple reaction mode) par ionisation electrospray (ESI) en mode positif ou négatif (cf. chromatogramme TIC en Annexe C).

Un tableau reprenant pour chaque constituant, le temps de rétention, le mode d'ionisation, l'ion précurseur et ses 2 ions filles, l'étalon interne utilisé ainsi que le "cone voltage" et l'énergie de collision sur appareil type TQD (Waters), est donnée à titre indicatif en Annexe D.

La confirmation de l'identité du pic est assurée par la comparaison de son temps de rétention avec celui de l'étalon mais aussi surtout par l'utilisation de la détection par spectrométrie de masse (triple quadripôle) qui permet le criblage de l'ion précurseur du constituant et la recherche de ses 2 ions filles caractéristiques dans une fenêtre d'élution précise.

L'intensité ionique' relative' des 2 ions filles d'un constituant dans un échantillon doit être comprise dans une tolérance de 30% relatif.

8.5.3 Etalonnage

L'étalonnage se fait par la méthode de l'étalonnage interne et externe en spectrométrie de masse selon les constituants.

Une gamme d'étalonnage à 8 points est utilisée.

L'étalonnage est réalisé avant chaque série d'échantillons.

8.5.4 Contrôle

Toutes les 10 injections, un contrôle est effectué avec une solution à 80 ng/ml préparée indépendamment des points de la courbe d'étalonnage. Les résultats de ce contrôle sont repris sur des cartes de contrôle.

9. Calcul

Les concentrations des différents constituants dans l'extrait sont calculées par le logiciel en ng/l sur la base de la courbe d'étalonnage à 8 points réalisée pour chaque série d'échantillons à analyser.

Le calcul des quantités est effectué sur base de la réponse du 1er ion fille de l'ion précurseur.

Pour les composés possédant un étalon interne, le calcul de la concentration dans les échantillons est réalisé d'après la formule ci-après :

$$C_{\text{échl.}} = \frac{q_{\text{ex}}}{V_{\text{échl.}}}$$

Le rendement de l'étalon interne doit être supérieur à 40 %

Pour les composés calculés en étalonnage externe, le calcul de la concentration dans les échantillons est réalisé d'après la formule ci-après :

$$C_{\text{échl.}} = \frac{C_{\text{ex}} \cdot V_{\text{ex}}}{V_{\text{échl.}}}$$

$q_{\text{échl.}}$: quantité présente dans l'échantillon exprimée en ng

$C_{\text{échl.}}$: concentration présente dans l'échantillon exprimée en ng/l

C_{ex} : concentration mesurée dans l'extrait exprimée en ng/ml

V_{ex} : volume de l'extrait exprimé en ml

$V_{\text{échl.}}$: volume de l'échantillon exprimé en litre

10. Avertissement

Les solvants utilisés pour cet essai, et en particulier, l'acétonitrile, l'acétone, le méthanol sont toxiques. Les acides (acide formique et acide phosphorique concentré) sont corrosifs. Des précautions doivent être prises lors de leur manipulation.

11. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- Une référence à la présente méthode de la Région wallonne ;
- L'identification complète de l'échantillon ;
- Les détails opératoires non prévus dans la procédure, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

12. Références

NBN EN ISO 3696 (1995) – Eau pour laboratoire à usage analytique – Spécification et méthodes d’essai

NBN EN ISO 5667-3 (2013) – Qualité de l’eau- Echantillonnage- Partie 3 : Lignes directrices pour la conservation et la manipulation des échantillons d’eau*

NBN EN ISO 11369 (1997) - Qualité de l'eau -- Dosage de certains agents de traitement des plantes -- Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection UV après extraction solide-liquide

NBN EN ISO 15913 (2003) - Qualité de l'eau - Dosage de certains herbicides phénoxyalcanoïques, y compris bentazones et hydroxybenzonnitriles, par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse après extraction en phase solide et dérivatisation

SANTE/11813/2017 21-22 november 2017 rev.0

*A la date de rédaction de cette fiche, la norme est en cours de révision.

Annexe A

Exemple de conditions d'extraction SPE ;

Extraction sur colonne OASIS-HLB (200 mg-6ml)

- 1) Conditionnement de la colonne avec 5 ml de méthanol.
- 2) Conditionnement de la colonne avec 5 ml d'eau milliQ.
- 3) Enrichissement de la colonne avec 250 ml d'échantillon à analyser à un débit de 8 ml /min.
- 4) Lavage de la colonne avec 5 ml d'eau milliQ.
- 5) Séchage de la colonne avec 2 ml d'azote 4.8.
- 6) Elution des analytes avec 2 x 4 ml de méthanol.

Annexe B

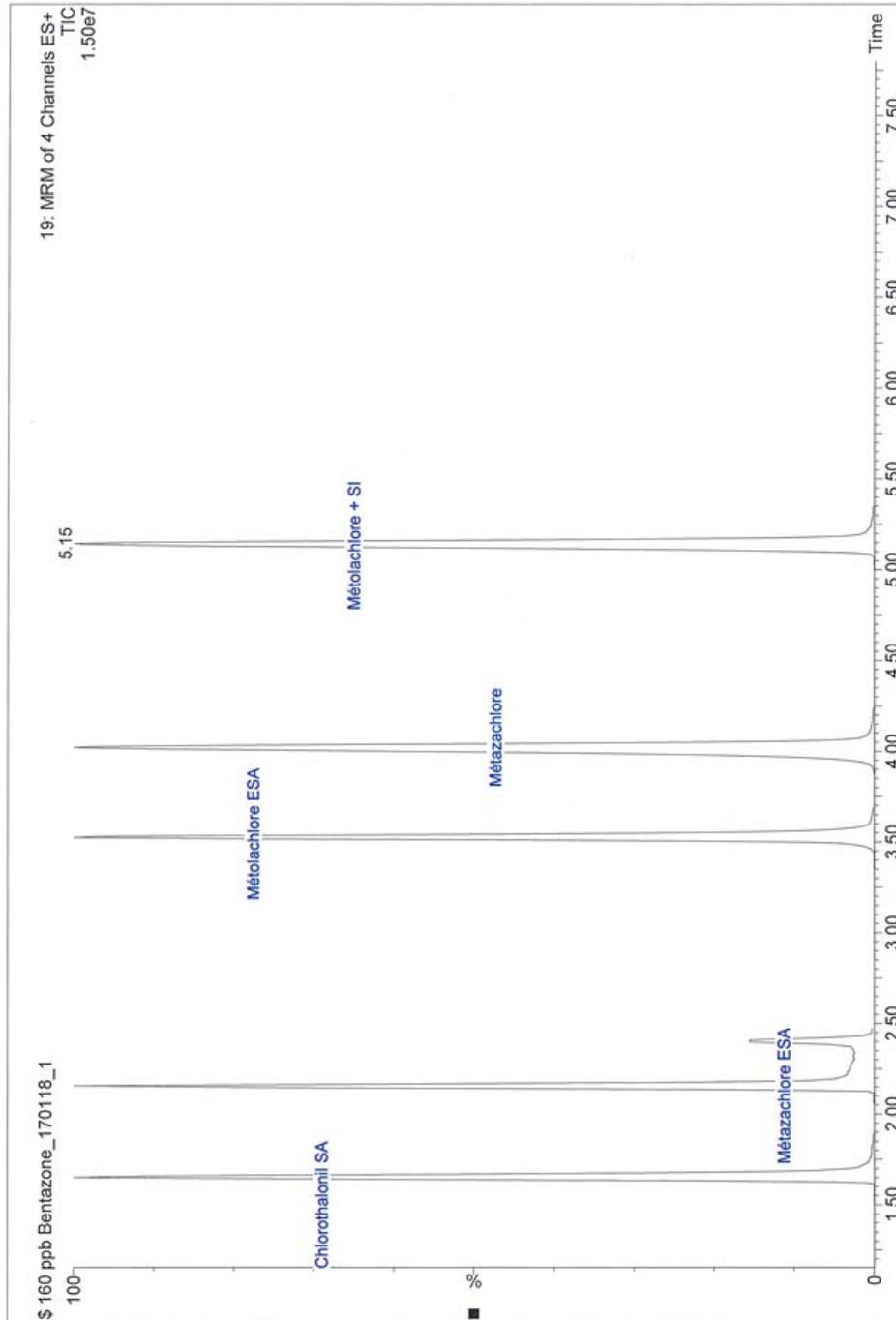
Exemple de conditions chromatographiques ULC

- Colonne Waters UPLC HSS-C18, 1,8 μm , 2,1 x 100 mm
- Débit : 0,45 ml/min
- Vol. injecté : 5 à 10 μl
- T° de colonne : 35°C
- Elution : éluant A : eau Milli-Q + 0,1 % ac. formique
 éluant B : méthanol + 0,1 % ac. formique
avec le gradient d'élution repris ci-dessous :

Temps	%A	%B
0	85	15
0,5	70	30
5,5	42	58
6	5	95
7,5	5	95
7,6	85	15
13	85	15

Annexe C

Exemple de chromatogramme TIC



Annexe D

Exemple de conditions MS/MS

Composants	ESI	Temps de rétention (min)	Ion précurseur m/z	Cone Voltage	Ion fille 1 m/z	Energie de collision	Ion fille 2 m/z	Energie de collision	Etalon interne
Chlorothalonil SA	-	1.7	326.8	45	283.9	18	220.0	24	-
Métazachlore ESA	-	2.2	322.0	44	120.9	21	148.0	26	-
Métolachlore ESA	-	3.5	328.2	54	79.9	30	120.9	23	-
Métazachlore	+	4.0	278.2	22	210.1	12	134.1	26	Métolachlore-d ₆
Métolachlore	+	5.2	284.1	26	176.1	25	252.1	16	Métolachlore-d ₆
Métolachlore-d ₆	+	5.2	290.2	26	182.2	16	258.1	16	-