

**Arrêté du gouvernement wallon allouant une subvention au Groupement
d'Intérêt Scientifique wallon de Référence pour la qualité des EAUX
(GISREAUX)**

**RECHERCHE DE PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET D'AUTRES
SUBSTANCES D'INTÉRÊT RÉCENT DANS LES EAUX EN VUE DE LA
PROTECTION DE LA SANTE PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT**

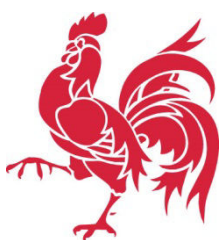
PROGRAMME DE RECHERCHE « BIODIEN »

ANNEXE 3

**VALIDATION DES MÉTHODES D'ANALYSE
MODIFIÉES DANS LE CADRE DU PROJET**

Rapport N° : 2018-01690

Cette annexe contient 2 rapports



Wallonie

Analyse des phtalates

1. Analyse par GC/MS/MS (Quattro micro GC de WATERS)

Les phtalates analysés sont au nombre de 9. Chaque phtalate possède son étalon interne.

Tableau reprenant les paramètres de masse:

Composés	Abréviations	RT (min)	Transition MRM (quantification)	Transition MRM (confirmation)
diméthyl phtalate-d4	DMP-d4	15.01	167.065 → 81.064	
diméthyl phtalate	DMP	15.05	163.04 → 77.039	194.058 → 77.039
diéthyl phtalate-d4	DEP-d4	17.75	153.049 → 69.064	
diéthyl phtalate	DEP	17.80	149.024 → 65.039	177.055 → 65.039
dipropyl phtalate-d4	DPP-d4	21.12	153.049 → 69.064	
dipropyl phtalate	DPP	21.15	149.024 → 65.039	209.081 → 149.024
dibutyl phtalate-d4	DBP-d4	23.58	153.049 → 69.064	
dibutyl phtalate	DBP	23.61	149.024 → 65.039	223.097 → 149.024
dipentyl phtalate-d4	DPentylP-d4	25.91	153.049 → 69.064	
benzyl butyl phtalate-d4	BBP-d4	29.08	153.049 → 69.064	
benzyl butyl phtalate	BBP	29.12	149.024 → 65.039	206.094 → 149.024
di-2-éthylhexyl phtalate-d4	DEHP-d4	32.28	153.049 → 69.064	
di-2-éthylhexyl phtalate	DEHP	32.33	149.024 → 65.039	167.05 → 65.039
dicyclohexyl phtalate-d4	DCHP-d4	32.68	153.049 → 69.064	
dicyclohexyl phtalate	DCHP	32.74	149.024 → 65.039	167.05 → 65.039
di-n-octyl phtalate-d4	DOP-d4	35.52	153.049 → 69.064	
di-n-octyl phtalate	DOP	35.55	149.024 → 65.039	279.16 → 149.024
didécyl phtalate-d4	DDcP-d4	40.53	153.049 → 69.064	
didécyl phtalate	DDcP	40.56	149.024 → 65.039	307.191 → 149.024

Les conditions GC/MS choisies sont les suivantes :

- Colonne Chrompack CP Sil 8 CB-MS « Low Bleed » 60 m x 0.25mm i.d.x 0.25µm Df
- Température de l'injecteur : 300°C en mode splitless
- Rampe de t° du four: 70(3.00) 35.6/155(0.00) 4/208(11.00) 19/270(10.00) 27.5/325
- Ion mode : EI+
- Electron energy : 65eV
- Trap : 200µA
- Température de la source : 270°C
- Température de la ligne de transfert : 280°C
- Multiplier : 650V
- Volume injecté : 2 µl

2. Partie préparative (extraction)

La méthode d'extraction utilisée est la méthode d'extraction solide-liquide (SPE). Les cartouches SPE de type Bond Elut C18 Varian ont été utilisées.

Les paramètres d'extraction suivants ont été testés :

- 1) Conditionnement de la colonne avec 5 ml d'acétate d'éthyle.
- 2) Séchage à l'azote de la colonne pendant 0.5 minute.
- 3) Conditionnement de la colonne avec 2x5 ml de méthanol.
- 4) Enrichissement de la colonne avec 500 ml d'échantillon à analyser.
- 5) Séchage à l'azote de la colonne pendant 20 minutes.
- 6) Elution des analytes avec 3 ml d'acétate d'éthyle.
- 7) Récolte des 3 ml dans un tube à usage unique.

La quantification a été réalisée par la méthode d'étalonnage interne pour compenser les pertes éventuelles en cours de procédure.

Les rendements d'extraction ont été testés sur des eaux dopées à environ 1000 ng/l et les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous :

Composés	Rendement %	Rendement %	Rendement %	Moy rend	Ecart-type	RSD %
DMP	113.8	117.4	116.4	116	1.8	1.6
DEP	88.8	92.3	90.9	91	1.8	1.9
DPP	92.6	91.1	92.4	92	0.8	0.9
DBP	53.7	76.5	68.0	66	11.5	17.5
BBP	92.6	89.1	91.5	91	1.8	2.0
DEHP	74.4	59.7	54.8	63	10.2	16.2
DCHP	84.4	85.4	82.9	84	1.3	1.5
DOP	79.4	79.5	78.7	79	0.4	0.5
DDcP	82.0	82.5	82.1	82	0.3	0.3

Les rendements obtenus sont satisfaisants puisqu'ils se situent entre 80 et 120 % pour la plupart des constituants sauf pour le DBP et le DEHP qui ont des valeurs de blanc plus élevées.

3. Résultats obtenus

Les résultats obtenus dans le cadre des masses d'eau 3450 et 3960 en ng/l

	blanc A	blanc B	blanc C	1007_2_A	1007_2_B	1007_2_C	1007_2_dop_A	1007_2_dop_B	1007_2_dop_C	Moy blc	Moy eau	Moy eau dop	eau-blc	eau dop-eau	dop th	% rec
DMP	73.7	62.1	61.6	66.8	65.6	64.1	3232.5	3236.1	3217.3	61.9	65.5	3228.6	3.6	3163.1	2920	108.3
DEP	80.4	68.2	74.1	146.5	131.1	100.2	2318.2	2323.1	2308.3	71.2	125.9	2316.5	54.8	2190.6	2720	80.5
DPP	82.3	71.8	70.2	70.3	69.7	69.7	1829.3	1834.7	1828.6	71.0	69.9	1830.9	-1.1	1761.0	2180	80.8
DBP	515.3	460.8	432.9	438.8	297.9	232.4	2363.5	2340.7	2356.7	446.9	323.0	2353.6	-123.8	2030.6	2860	71.0
BBP	105.7	62.0	57.7	140.0	133.5	146.8	1691.5	1709.9	1698.5	59.9	140.1	1700.0	80.3	1559.9	1980	78.8
DEHP	147.3	91.8	96.7	171.6	145.4	121.5	1747.8	1724.0	1681.7	94.3	146.2	1717.8	51.9	1571.7	2180	72.1
DCHP	135.9	83.3	79.5	75.9	74.0	73.3	1786.1	1776.4	1782.3	81.4	74.4	1781.6	-7.0	1707.2	2140	79.8
DOP	204.0	152.9	148.4	149.8	147.6	144.5	2279.9	2249.6	2182.6	150.7	147.3	2237.4	-3.4	2090.1	3020	69.2
DDcP	117.3	73.1	68.5	73.7	71.9	71.0	1760.4	1758.3	1722.3	70.8	72.2	1747.0	1.4	1674.8	2120	79.0

	blanc_A	blanc_B	blanc_C	1007_5_A	1007_5_B	1007_5_C	1007_5_dop_A	1007_5_dop_B	1007_5_dop_C	Moy blc	Moy eau	Moy eau dop	eau-blc	eau dop-eau	dop th	% rec
DMP	73.7	62.1	61.6	67.4	64.6	63.0	3149.2	3189.3	3096.1	61.9	65.0	3144.9	3.2	3079.9	2920	105.5
DEP	80.4	68.2	74.1	134.5	214.0	114.3	2417.4	2352.4	2458.6	71.2	154.3	2409.5	83.1	2255.2	2720	82.9
DPP	82.3	71.8	70.2	72.7	69.9	69.4	1791.1	1820.8	1773.6	71.0	70.7	1795.2	-0.3	1724.5	2180	79.1
DBP	515.3	460.8	432.9	227.2	177.4	160.5	2355.7	2346.0	2274.9	446.9	188.4	2325.5	-258.5	2137.2	2860	74.7
BBP	105.7	62.0	57.7	65.5	58.6	58.9	1580.8	1579.6	1543.5	59.9	61.0	1568.0	1.2	1507.0	1980	76.1
DEHP	147.3	91.8	96.7	213.1	209.8	200.8	1845.0	1908.9	1852.6	94.3	207.9	1868.8	113.7	1660.9	2180	76.2
DCHP	135.9	83.3	79.5	83.1	76.2	74.4	1709.6	1740.0	1632.5	81.4	77.9	1694.0	-3.5	1616.1	2140	75.5
DOP	204.0	152.9	148.4	156.1	148.0	146.0	2298.2	2348.8	2305.5	150.7	150.0	2317.5	-0.6	2167.5	3020	71.8
DDcP	117.3	73.1	68.5	73.5	70.3	69.3	1784.3	1788.1	2020.9	70.8	71.0	1864.4	0.2	1793.4	2120	84.6

80.3


Les résultats obtenus dans le cadre de la masse d'eau : STEP Marche-en-Famenne en ng/l.
Sur cette eau, un test de conservation de l'échantillon a été effectué à J+7.

JO	blanc_A	blanc_B	blanc_C	1131_1_A	1131_1_B	1131_1_C	1131_1_dop_A	1131_1_dop_B	1131_1_dop_C	Moy blc	Moy eau	Moy eau dop	eau-blc	eau dop-eau	dop th	% rec
DMP							1678.0	1701.2	1707.9	0.0	0.0	1695.7	0.0	1695.7	1460	116.1
DEP				35.0	10.4	6.8	1271.4	1275.6	1275.2	0.0	17.4	1274.1	17.4	1256.7	1360	92.4
DPP							989.6	1003.5	1007.6	0.0	0.0	1000.2	0.0	1000.2	1090	91.8
DBP	313.8	337.6	370.8	151.0	46.1	37.0	1320.5	1334.6	1331.9	340.7	78.0	1329.0	-262.7	1251.0	1430	87.5
BBP							847.9	853.9	868.0	0.0	0.0	856.6	0.0	856.6	990	86.5
DEHP	16.4	39.4	27.2	284.9	126.3	128.8	1038.4	1045.2	1235.4	27.7	180.0	1106.3	152.3	926.3	1090	85.0
DCHP							947.0	955.9	964.9	0.0	0.0	955.9	0.0	955.9	1070	89.3
DOP	2.4	2.1	1.9	3.2	3.2	2.2	1263.3	1257.4	1312.6	2.1	2.9	1277.8	0.7	1274.9	1510	84.4
DDcP				0.6			915.6	903.9	935.2	0.0	0.6	918.2	0.6	917.6	1060	86.6

J+7	blanc_A	blanc_B	blanc_C	1131_1_A	1131_1_B	1131_1_C	1131_1_dop_A	1131_1_dop_B	1131_1_dop_C	Moy blc	Moy eau	Moy eau dop	eau-blc	eau dop-eau	dop th	% rec
DMP							1691.5	1736.6	1705.8	0.0	0.0	1711.3	0.0	1711.3	1460	117.2
DEP				35.0	10.4	6.8	1269.3	1283.1	1281.1	0.0	17.4	1277.8	17.4	1260.4	1360	92.7
DPP							1036.7	1048.5	1029.9	0.0	0.0	1038.4	0.0	1038.4	1090	95.3
DBP	332.9	284.6	280.7	151.0	46.1	37.0	1266.5	1238.2	1212.3	299.4	78.0	1239.0	-221.4	1161.0	1430	81.2
BBP							676.0	701.5	683.7	0.0	0.0	687.1	0.0	687.1	990	69.4
DEHP	33.2	17.7	33.7	284.9	126.3	128.8	919.7	900.6	1086.7	28.2	180.0	969.0	151.8	789.0	1090	72.4
DCHP	2.3	0.8	0.0				996.9	996.7	1007.2	1.0	0.0	1000.3	-1.0	1000.3	1070	93.5
DOP	3.3	2.0	3.2	3.2	3.2	2.2	1022.6	1047.1	1054.0	2.8	2.9	1041.2	0.0	1038.4	1510	68.8
DDcP				0.6			901.3	865.4	857.5	0.0	0.6	874.7	0.6	874.1	1060	82.5

85.9

Les résultats obtenus sont très satisfaisants compte tenu des rendements obtenus et le test de conservation est concluant au vu des résultats du quatrième tableau.

 <p>La société wallonne des eaux</p>	<p>Rapport de validation</p> <p>Validation des Azotés et phosphorés par HPLC-MSMS en ESI+</p>	<p>Page 1/14</p> <p>Date : 13/3/2015</p> <p>Rédaction : P. Carbonnelle</p>
--	---	--

Plan de validation de trois pesticides repris dans le projet BIODIEN sur Agilent 6460 par ESI⁺ HPLC MS/MS : l'Acétochlor, la Carbendazim et le Pirimicarb.

Méthode d'essai : MEO-LAB-14

1. HISTORIQUE

Rapport de validation des thermolabiles selon MEO-LAB02 :

5/11/2001

Première édition du rapport de validation.

5/11/2001

Correction de diverses erreurs.

20/6/2002

Compléments au premier rapport de validation, vérification des taux de recouvrement et séparation chromatographique.

2/04/2004

Compléments au premier rapport de validation, ajout de nouveaux paramètres et réévaluation des limites de détection.

9/9/2009

Compléments au premier rapport de validation, validation de l'Agilent 6460.

07/12/2011

Compléments au premier rapport de validation, Remplacement de l'extraction de calibration 500 ng/l par une extraction 150 ng/l en thermolabiles

Rapport de validation selon MEO-LAB14 :

08/1/2014

Plan de transfert des pesticides analysables en Pesticides thermolabiles sur l'Agilent 6460 par ESI⁺-HPLC MS/MS.


09/3/2015

Plan de validation de trois pesticides repris dans le projet BIODIEN sur Agilent 6460 par ESI⁺ HPLC MS/MS : l'Acétochlor, la Carbendazim et le Pirimicarb.

Participants :

- Saudoyez D.

- P. Carbonnelle

	Rapport de validation Validation des Azotés et phosphorés par HPLC-MSMS en ESI+	Page 2/14 Date : 13/3/2015 Rédaction : P. Carboneille
--	--	--

Date de début plan de validation : le 5/2/14

Délai : Projet Biodien ?

2. RAISON

Il serait intéressant d'intégrer dans notre routine divers pesticides d'intérêt sans pour autant attendre une actualisation de la liste obligatoire par la RW.

Principalement ces nouvelles substances intéressantes ont été identifiées sur base de listes établies par la France, Belgaqua (listes Phytophar, SPF et les distributeurs d'eau), la région flamande via la VMW et nous-mêmes. Certaines molécules sont communes dans ces différentes listes ce qui représente au total 64 substances différentes jugées pertinentes dans la domaine de l'eau de distribution.


La SWDE couvre déjà en grande partie ces listes avec pas moins de 38 molécules analysées en routine. Il reste donc 26 molécules qui à ce jour ne sont pas analysées par la SWDE. Afin d'éviter des tests systématiques, une analyse sur base de la structure a été réalisée pour évaluer leur éventuelle candidature à une incorporation dans nos méthodes de routine. Il en ressort que 18 pesticides sont potentiellement analysables par ESI⁺ HPLC MS/MS et donc facilement intégrables à notre méthode de routine et extraction liquide/liquide.

Début 2013, la SWDE a été impliquée dans le projet BIODIEN s'intéressant aux perturbateurs endocriniens pour l'analyse de 32 pesticides repris dans son contrôle de routine et de 3 molécules que nous avons jugées d'intérêt pour la SWDE sur base de l'étude précédente: l'Acétochlor, la Carbendazim et le Pirimicarb. Par ailleurs nous comptons les intégrer dans notre analyse de routine pour fin 2014.

L'objectif est de valider rapidement ces trois paramètres dans le cadre de nos analyses de routine, le projet BIODIEN et de constituer un pré-dossier de validation pour une accréditation éventuelle par Belac.

N°	Nom	N°CAS	Famille	Formule brutes	MW lowest Isotope	Référence labo
1	Acétochlor	34256-82-1	Chloroacétanilide	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269,12	9-158
2	Carbendazim	10605-21-7	Benzimidazole et Carbamate	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,10	9-148
3	Pirimicarb	23103-98-2	Carbamate	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238,14	9-179

3. OPTIMALISATION MS/MS DES 3 MOLÉCULES

	Rapport de validation Validation des Azotés et phosphorés par HPLC-MSMS en ESI+	Page 3/14 Date : 13/3/2015 Rédaction : P. Carboneille
--	--	--

Les optimisations sont réalisées par le logiciel Optimizer et portent sur les paramètres suivants :

- sélection de l'ion précurseur $M+H^+$ et $M+NH_4^+$ ou un éventuel fragment abondant,
- optimisation du Fragmentor voltage pour l'ion précurseur,
- sélection des ions fragment,
- optimisation de l'énergie de collision pour chaque fragment.

Paramètres

Les paramètres ci-dessous sont définis sur base des applications notes Agilent et de notre expérience.

Concentration : 1 mg/l dans le MeOH

Source Agilent Jet Stream,

- Sheath gas 400°C @ 10 l/min
- Drying gas 325°C @ 5 l/min
- Nebulizer pressure 35 psi
- VCap : 3000 V
- Nozzle voltage 500 V
- EMV voltage à 0 V

Phase mobile 400 µl/min ; 50/50 v/v

- A : 100% H₂O 10 mM NH₄COOH 0,1% HCOOH
- B : 100% MeOH 10mM NH₄COOH 0,1% HCOOH

10 µl injectés

Pression de gaz :


- Gaz de collision : 20 psi
- Gaz azote Nebulizer et Jet Stream : 90 psi

Résultats

Les résultats des optimisations sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Nom	Listes	Formules	MW lowest Isotope	Précur seur	Type	Ion quant	Ion Conf
Acétochlor	France	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269,12	224,1	[M+H- CH ₃ CH ₂ OH] ⁺	148,1	133,1
Carbendazim	France et Belgaqua- distributeurs	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,10	192,1	[M+H] ⁺	160,0	132,0
Pirimicarb	Belgaqua- Phytophar et SPF	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238,14	239,1	[M+H] ⁺	182,1	72,0

Les trois composés sont azotés et répondent bien en termes de sensibilité sur base de l'intensité observée en MSScan de l'ion moléculaire correspondant.

	Rapport de validation Validation des Azotés et phosphorés par HPLC-MSMS en ESI+	Page 4/14 Date : 13/3/2015 Rédaction : P. Carboneille
--	--	--

Les transitions les plus intenses ont été retenues pour la quantification sauf pour le Pirimicarb qui peut donner une légère interférence sur la transition MRM 238,1->72,0. Dès lors, pour éviter des problèmes de faux positif, l'ion 182,1 moins sensible a été préféré pour la quantification.

Les transitions retenues sont basées sur l'ion précurseur $[M+H]^+$ excepté pour l'Acétochlor qui présente une fragmentation importante au niveau de la source avec perte d'éthanol, soit l'ion $[M+H-CH_3CH_2OH]^+$. Pour l'Acétochlor, le choix d'une transition sur un isotope relativement important est également possible vu la présence d'un Cl (35 ou 37).

4. SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Les trois molécules ont été introduites dans notre méthode de routine basée sur le gradient donnée ci-après :

Colonne Zorbax SB-C18 2.1*50 mm 1.8 μ m de Agilent.

Phase mobile 400 μ l/min

- A : 100% H₂O 10 mM NH₄COOH 0,1% HCOOH
- B : 100% MeOH 10mM NH₄COOH 0,1%HCOOH
- Température colonne : 45°C

Temps	% B
0 min	20%
0.5 min	20%
15 min	100%
18 min	100%

Afin d'éviter une contre-pression trop élevée, nous avons travaillé à plus haute température ce qui permet de diminuer la viscosité. A 45°C, la pression maximale n'est pas supérieure à 300 bar pour un débit de 0.4 ml/min.

Actuellement, notre méthode de routine utilise le Monuron_d6, l'Aldicarb_d3 et l'Atrazine_d5 comme standards internes. Sur base des structures chimiques il semble approprié de corriger le Pirimicarb et la Carbendazim par l'Aldicarb_d3 et l'Acétochlor par le Monuron_d6.

Le gradient permet une bonne séparation des 56 molécules déjà présentes dans la méthode et les trois nouvelles substances, voir figure 1.

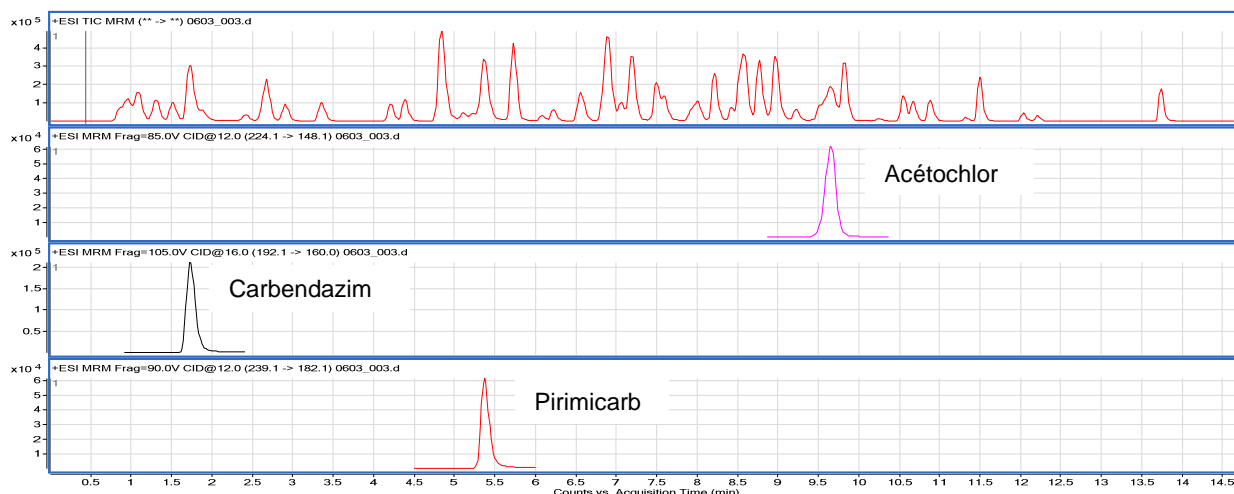


Figure 1 : Chromatogramme d'une solution à 50 ng/ml.

5. RENDEMENT D'EXTRACTION

Protocole d'extraction :

- Les échantillons sont extraits par une triple extraction liquide/liquide en présence de 30 g/l de NaCl avec respectivement 2*50 ml et finalement 30 ml de dichlorométhane par litre d'échantillon.
- Les phases organiques sont récoltées et le dichlorométhane est éliminé par évaporation sous flux d'azote en présence de méthanol et d'eau pour finalement atteindre un volume de 1 ml et un rapport 30/70 v/v H₂O/MeOH.

Les rendements d'extraction ont été estimés sur base de 6 étalons extraits dans la gamme 20-250 ng/l et comparés à un étalon reconstitué non extrait.

Produits	Rendement (%)	
	Moy.	SD
Carbendazim	53,8	2,6
Acétochlor	81,7	6,5
Pirimicarb	81,7	5,2

6. LINÉARITÉ SUR EXTRACTION

La linéarité de la méthode sur étalons extraits a été investiguée sur 5 points dans la gamme de concentration de 20 ng/l à 250 ng/l par calcul du biais à chaque niveau de concentration (NF T 90-210). Cette étude a été réalisée sur les étalons des 42 séries de routine injectées dans la période couvrant fin octobre 2014 à fin février 2015. Sur cette période, les gammes d'étalonnage ont été préparées et extraites à 15 reprises, soit plus ou moins une fois par semaine. Chaque gamme est injectée en moyenne à trois reprises en fonction de l'arrivage

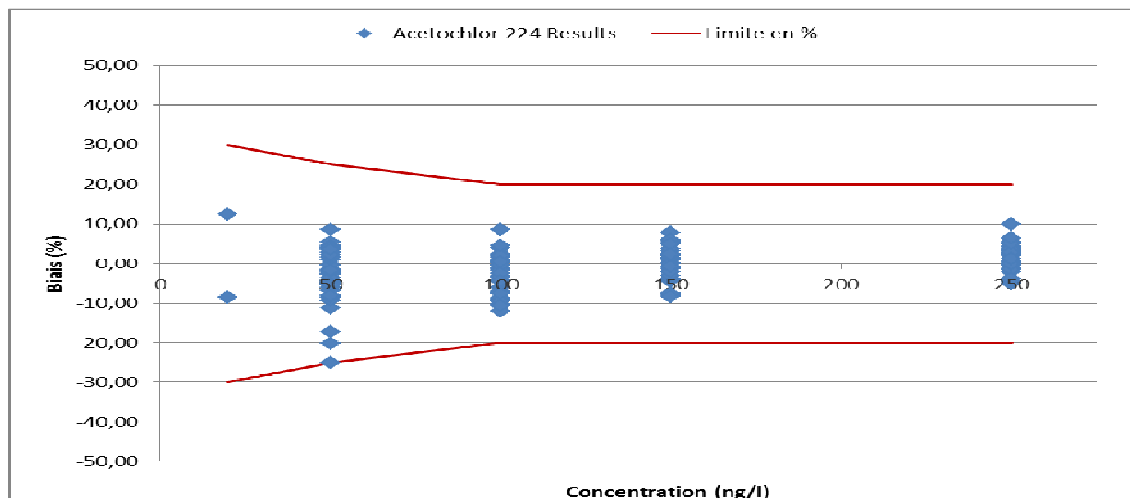
des échantillons de la semaine correspondante. Cela représente au total pas moins de 170 étalons injectés.

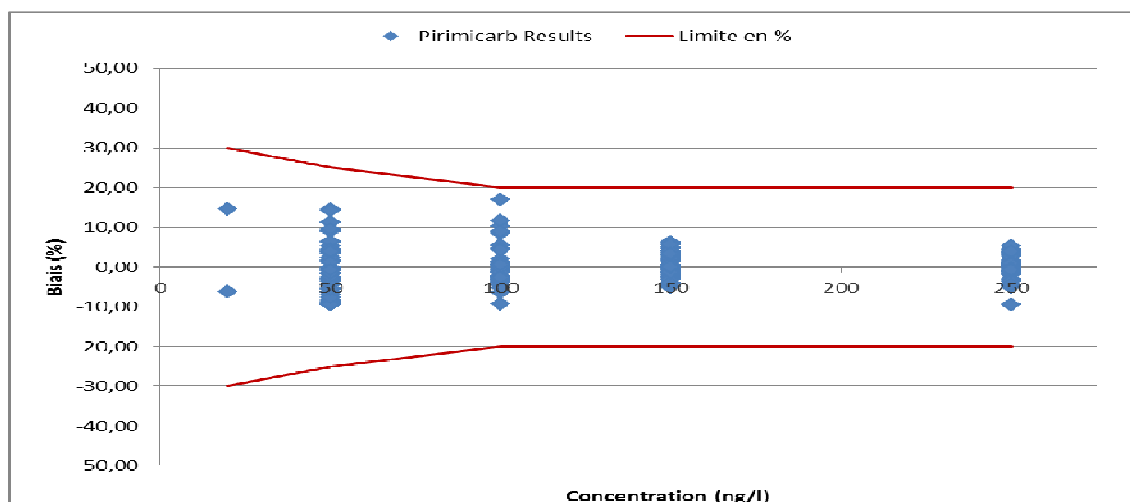
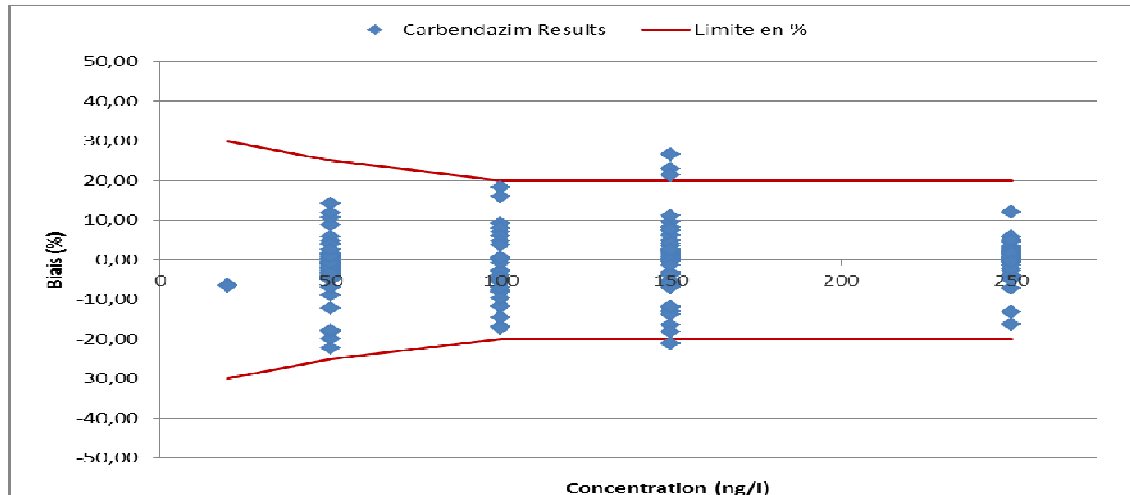
L'examen visuel des réponses des gammes de concentration ne met pas en évidence de problème d'écart à la linéarité pour les paramètres étudiés (voir représentation graphique). L'étalonnage retenu est un ajustement linéaire avec facteur de pondération $1/x$ et l'option « Blank offset » pour l'ordonnée. Cet étalonnage permet un meilleur ajustement aux basses concentrations et ce malgré l'absence de d'étalon aux très basses concentrations.

Les biais de ces 69 étalons ont été calculés et les limites ont été définies en fonction de la concentration, soit :

- à 20 ng/l $\pm 30\%$
- à 50 ng/l $\pm 25\%$
- de 100 à 250 ng/l $\pm 20\%$

Seule la Carbendazim dépasse légèrement ces limites à quatre reprises. Il faut noter que la Carbendazim est assez sensible à la présence de dichlorométhane lors de l'étape d'évaporation et son rendement d'extraction est également moins bon. Les graphiques sont donnés ci-après :






7. LIMITE DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION

Les méthodes d'évaluation des LOD et LOQ ont été précisées dans les différentes directives européennes et arrêtés wallons d'application. Il est recommandé d'estimer la limite de détection comme un multiple de l'écart-type à l'intérieur du lot d'un échantillon naturel contenant une concentration peu élevée du paramètre.

En pratique nous estimons les limites de détection et de quantification à partir de nos contrôles qualité à 3 ng/l en condition de fidélité intermédiaire néanmoins à ce jour nous ne disposons pas de valeurs pour ces trois paramètres. Une estimation basée sur le rapport signal sur bruit a donc été entreprise, i.e un S/N de 3 pour la LOD et 10 pour la LOQ.

Estimation de la LOD et LOQ sur étalons 20 ng/l extraits

	Rapport de validation	Page 8/14
	Validation des Azotés et phosphorés par HPLC-MSMS en ESI+	Date : 13/3/2015
		Rédaction : P. Carboneille

Produits	S/N	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
Carbendazim	194	0.3	1.0
Acetochlor	127	0.4	1.6
Pirimicarb	187	0.3	1,0

Pour des raisons pratiques de rapportage nous fixons ces limites à 1 ng/l pour la LOD et 3 ng/l pour la LOQ.

8. ESSAIS INTERLABORATOIRES AQUACHECK

Au total, trois campagnes ont été réalisées : la distribution 480 de février 2015, la distribution 476 de novembre 2014 et la distribution 472 de septembre 2014. Seul le Pirimicarb est présent dans ces distributions de LGCPromochem


Les résultats obtenus pour le Pirimicarb sont très bons avec des Z-Score inférieurs à 1, voir ci-dessous :

<i>Résultats interlaboratoire Pirimicarb</i>				
Distribution	SWDE ng/l	Median ng/l	Assigned ng/l	Z-Score
480	78,3	77,1	74,0	+0.58
476	47,7	44,4	47,0	+0.14
472	108,8	107,0	107,0	+0.16

9. FIDÉLITÉ, JUSTESSE DE LA MÉTHODE ET INCERTIDUTES DE MESURE

Les définitions et critères de performance ont été précisés dans les différentes directives européennes et arrêtés wallons d'application.

- Dans la directive de 98 et l'arrêté d'application de 2004, les critères de performance sont donnés en termes d'exactitude, à la valeur paramétrique, avec 25% pour la justesse et 25% pour la fidélité (k=2). Cette directive est en cours de changement et les derniers textes communiqués ne parlent plus d'exactitude mais directement d'incertitude à la valeur paramétrique, soit 100 ng/l. Pour les pesticides, cette incertitude serait fixée à 30% et, pour un nombre limité de pesticides, il est toléré 80% d'incertitude.
- La directive 2009/90/EC définit les critères minimaux pour l'incertitude de mesure comme inférieure ou égale à 50% pour un élargissement de 2 (k=2). Cette incertitude doit être établie à la norme de qualité environnementale. Cette définition a été transposée par la RW dans son arrêté du 29 septembre 2011. Pour les eaux souterraines, la norme en pesticide est de 100 ng/l (annexe XIV). Pour les eaux de surface (annexe Xbis), la norme de qualité est fonction du pesticide. La Carbendazim, l'Acétochlor et le Pirimicarb ne sont pas repris dans cette annexe néanmoins excepté pour les pesticides chlorés, les normes de qualité environnementale en pesticides sont supérieures à 100 ng/l (Chlorfenvinphos).

	Rapport de validation Validation des Azotés et phosphorés par HPLC-MSMS en ESI+	Page 9/14 Date : 13/3/2015 Rédaction : P. Carbonnelle
--	--	--

En conclusion, la justesse et la fidélité intermédiaire de la méthode peuvent être estimées sur les contrôles qualité à 100 ng/l de nos analyses de routine. Sur la période considérée, soit octobre 2014 à mars 2015, nous disposons de 55 séries d'échantillons. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après :

Produits	N	Moy (ng/l)	S (ng/l)	Biais (ng/l)	Incertitude (ng/l) [biais]+2S
Carbendazim	55	93,1	14,1	-6,9	35,1
Acetochlor	55	100,1	8,2	0,1	16,5
Pirimicarb	55	99,8	11,1	-0,2	22,4

Les biais (justesse) sont bons et inférieurs en valeur absolue à 5 ng/l excepté pour la Carbendazim. Les écarts-types (fidélité intermédiaire) sont inférieurs à 15 ng/l.

Les incertitudes de mesure, $|\text{biais}| + 2S$, sont inférieures aux 30 ng/l fixés par les Directives européennes ou les arrêtés de transposition wallons excepté pour la Carbendazim. Il est à signaler que ce produit est moins bien extrait et élué assez rapidement en chromatographie.

10. UTILISATION EN ROUTINE DE LA MÉTHODE

Les trois nouveaux paramètres ont été introduits dans notre méthode de routine depuis octobre 2014. A ce jour pas moins de 1500 échantillons ont été analysés et seule la Carbendazim a été détectée à des concentrations supérieures à la LOD (1 ng/l). Sur base de l'évolution de la contamination et la constance de la pollution des sites, la fiabilité de l'analyse semble très bonne.


Les sites contaminés sont repris dans le tableau ci-après :

Marche les Dames				
<i>Date</i>	<i>P2</i>	<i>P1</i>	<i>P3</i>	
23/10/14	9,3	6,2	4,1	
20/11/14	5,5	6,8	3,9	
11/12/14	7,8	5,6	3,2	
5/02/15	5,6	5,2	3,2	
Beez				
<i>Date</i>	<i>Prechloration</i>	<i>SP Total</i>	<i>P7</i>	<i>P8</i>
23/10/14	2,4	3,7	1,4	1,5
20/11/14	3,3	3,4	3,6	1,5
11/12/14	3,3	3,6	3,8	1,5
5/02/15	2,8	3	3,6	2
Dinant- Prieuré				
<i>Date</i>	<i>P2</i>	<i>P1</i>		
25/11/14	6	4,9		
jambes Velaines				
<i>Date</i>	<i>P9</i>			
30/10/14	3,5			
25/11/14	5,3			
8/01/15	4,1			
Eaux de surface				
<i>Date</i>	<i>Namur Sambre</i>	<i>Beez meuse</i>		
21/11/14	< 1	<1		
11/12/14	1,6	1,7		
5/02/15	< 1	<1		

Nous avons également analysé un échantillon de sortie de STEP (Godinne) pour évaluer nos méthodes sur ce type de matrice :

- GC-MS pour les PAH et pesticides chlorés.
- HPLC MS/MS mode négatif pour les pesticides acides (phénoxyacides).
- HPLC MS/MS mode positif pour les pesticides azotés et phosphorés.

Le traitement de l'échantillon n'a pas posé de problème et les 9 standards internes utilisés sont peu affectés en surface par la matrice. Les chromatogrammes n'ont pas montré une augmentation de la ligne de base par rapport à des échantillons d'eaux de surface ou d'eaux souterraines. Divers pesticides ont été détectés, les résultats sont donnés dans le rapport en annexe I.

	Rapport de validation Validation des Azotés et phosphorés par HPLC-MSMS en ESI+	Page 11/14 Date : 13/3/2015 Rédaction : P. Carbonnelle
--	--	---

11. EFFET DU CHLORE

Raison :

Suite aux analyses de routine et notre expérience nous avons observé que le chlore pouvait dégrader certains pesticides comme l'Aldicarb, la Bromacil...

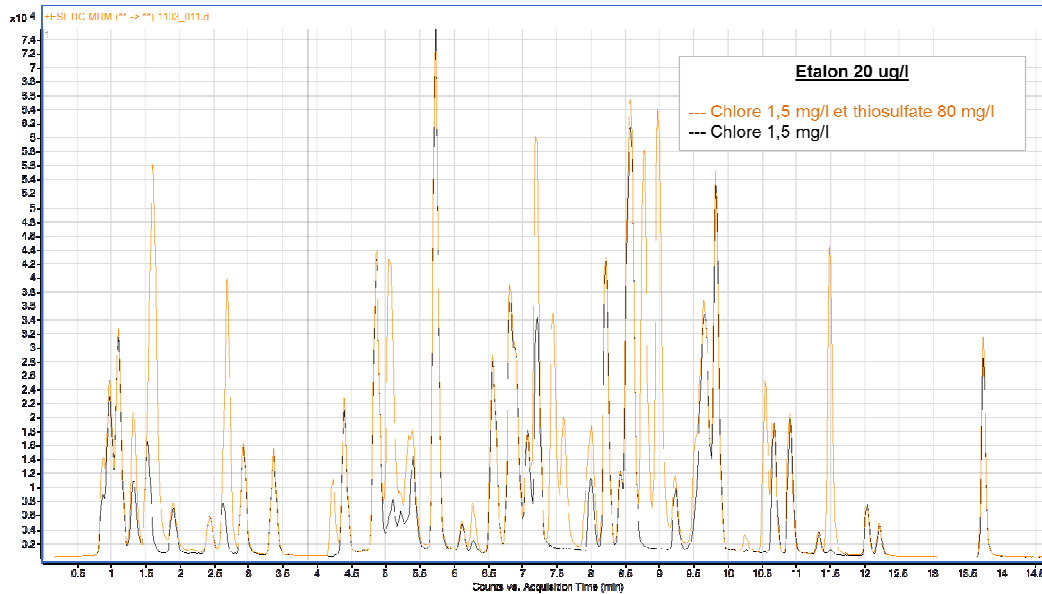
Comme action corrective, l'ajout de thiosulfate est imposé aux échantillons qu'ils soient chlorés ou non. En cas de développement de nouveaux pesticides un test d'effet du chlore est généralement réalisé suivant le protocole suivant :

Etapas	Etalon	Thiosulfate (80 mg/l)	Chlore (1,5 mg/l)	Thiosulfate (80 mg/l) + Chlore (1,5 mg/l)
10 ml H ₂ O	ok	ok	ok	ok
+10 µl Cl ₂ 1,5g/l	-	-	ok	ok
+10 µl Thiosulfate 80g/l	-	ok	-	ok
10 minutes à 20°C	ok	ok	ok	ok
+100 µl Sol Pesticide à 2ng/µl	ok	ok	ok	ok
1 heure à 20°C	ok	ok	ok	ok
+10 ml MeOH	ok	ok	ok	ok

Résultats :

Les résultats montrent que la présence de chlore à 1,5 mg/l dégrade significativement certains pesticides et que l'ajout de thiosulfate permet de stopper cette dégradation.

D'autre part en l'absence de chlore l'ajout d'un excès de thiosulfate à 80 mg/l d'échantillon n'a pas d'incidence, voir chromatogramme et tableau ci-dessous.




Si on regarde la littérature et notamment les normes de référence :

- dans les normes américaines (CFR 40 part 136), l'ajout de thiosulfate n'est pas imposé en présence de chlore pour un prélèvement pesticide en général. Il l'est par contre pour les PAH, les volatils aromatiques, les phénols chlorés.
- l'ISO 5667-3 de 2012 impose seulement l'ajout de thiosulfate pour les pesticides de type carbamates et les herbicides phénoxyacides. Aux rubriques pesticides organochlorés en général, organophosphorés et organoazotés il n'est fait mention d'aucun ajout de thiosulfate.

Au regard de nos résultats, l'effet du chlore n'est pas très bien connu du moins pour certains pesticides azotés et les organophosphorés en général.

Evaluation du recouvrement (%) suite à la présence de chlore à 1,5 mg/l sur une solution à 20 µg/l							
Molécules affectées (< 90%)				Molécules non affectées (>90%)			
Molécules	80 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃	1,5 mg/l Cl ₂	80 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃ + 1,5 mg/l Cl ₂	Molécules	80 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃	1,5 mg/l Cl ₂	80 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃ + 1,5 mg/l Cl ₂
Dimethoate	101,6	0,0	98,5	Dimethenamid	101,4	90,5	100,0
Aldicarb	103,5	0,0	100,7	Pendimethalin	101,8	93,1	98,3
Sulcotrione	101,6	0,0	100,2	Prometon	102,4	93,6	99,7
Bromacil	103,2	0,0	100,0	Metoxuron	103,4	94,7	100,8
Lenacil	104,6	0,0	97,8	Triadimephon	103,1	94,8	100,4
Ametryn	102,9	0,0	99,7	Atrazine deiso	104,6	95,2	98,0
Methidation	102,0	0,0	97,5	2,6_Dichlorobenzamide	105,4	95,4	102,1
Azinphos methyl	101,2	0,0	97,2	Propazine	100,4	95,5	98,6
Prometryn	103,2	0,0	101,0	Oxadiazon	102,2	96,2	97,9
Terbutryn	102,9	0,0	102,0	Simazine	102,3	96,2	98,1
Malathion	102,9	0,0	99,2	Chlortoluron	104,0	96,3	99,6
Azinphos ethyl	104,7	0,0	97,7	Isoproturon	102,4	96,4	100,0
Fenthion	98,3	0,0	97,7	Imidacloprid	99,7	96,4	98,7
Diazinon	101,0	0,0	98,2	Atrazine desethyl	103,6	96,5	98,6
Prosulfocarb	102,6	0,0	100,4	Monuron	102,1	96,9	99,6
Carbendazim	103,4	0,6	100,0	Carbetamide	102,2	97,0	98,5
Pirimicarb	103,3	9,2	101,6	Linuron	103,0	97,1	97,4
Flazasulfuron	104,4	16,0	100,6	Prochloraz	101,9	97,1	100,7
Amidosulfuron	106,5	25,5	98,9	Chlorfenvinphos	103,5	97,2	98,8
Methomyl	102,9	50,7	98,7	Diuron	102,8	97,2	99,2
Aldicarb sulfoxide	105,7	61,0	102,4	Metobromuron	103,0	97,3	98,7
Metribuzin	105,8	80,4	101,8	Chloridazon	103,1	97,5	98,9
Pyridate	102,7	86,7	99,0	Terbutylazine	101,7	97,6	99,9
Metsulfuron methyl	101,9	87,3	99,4	Alachlor 238	102,2	97,6	101,0
Metamitron	105,3	89,4	99,0	Acetochlor 224	102,4	98,0	99,9
				Atrazine	102,4	98,1	99,3
				Metolachlor	102,2	98,3	99,8
				Cyanazine	101,5	98,6	98,6
				Carbofuran	103,1	98,7	99,8
				Dichlorvos	101,8	99,0	99,4
				Oxamyl	104,6	99,1	100,7
				Aldicarb sulfone_NH4	104,5	99,3	100,8
				Diflufenican	113,0	99,3	104,2
				Ethofumesate_NH4	104,8	99,4	101,3

 <p>La société wallonne des eaux</p>	<p align="center">Rapport de validation</p> <p align="center">Validation des Azotés et phosphorés par HPLC-MSMS en ESI+</p>	<p>Page 14/14</p> <p>Date : 13/3/2015</p> <p>Rédaction : P. Carbonnelle</p>
--	---	---

12. SPÉCIFICITÉ

1. La spécificité est assurée par la transition MRM de quantification et par l'ajout d'une transition de confirmation.
2. Les analyses de routine réalisées sur la période fin octobre 2014 à fin février 2015 et couvrant environ 1500 échantillons n'ont pas montré une augmentation du bruit de fond ou de la ligne de base de manière significative.
3. Sur ces 1500 analyses, un seul échantillon (Hastière P2) a montré en Pirimicarb la présence d'un signal de l'ordre de 15 ng/l sur l'ion de confirmation du (239,1→72) alors que le produit n'était pas détecté sur la transition de quantification (239,1→182,1).
4. Les échantillons ne sont que rarement positifs et en cas de doute ou si la transition de confirmation n'est pas suffisante, un Product Ion Scan peut être réalisé afin de confirmer la présence de la substance suivant notre procédure de confirmation (ITO-LAB 11).

13. CONCLUSION

Les performances analytiques de la méthode sont adéquates.

Afin de compléter le dossier, Il y aurait lieu de poursuivre la validation sur les points suivants :

1. Estimation des LOD et LOQ comme un multiple de l'écart-type d'un échantillon contenant une concentration peu élevée du paramètre.
2. Evaluation des effets de matrice par dopage d'échantillon réels et plus particulièrement sur des échantillons de sortie de STEP.

Dr. P. Carbonnelle

12/3/2015