

E-III-8V1 – DÉTERMINATION DU CHLORIDAZON ET DE SES METABOLITES

1. Objet

Dosage du chloridazon et de ses métabolites dans les eaux brutes.

2. Domaine d'application

La présente méthode décrit la détermination du chloridazon et de ses métabolites par chromatographie liquide ultra-performante (ULC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) en injection directe. La présente méthode est applicable à tous les types d'échantillons d'eaux brutes (eaux potables, eaux souterraines, eaux de surface).

Les composés analysés sont : le desphényl-chloridazon, le méthyl-desphényl-chloridazon et le chloridazon.

Dans les eaux potables et souterraines, la méthode est applicable pour des teneurs supérieures à 10 ng/l pour le chloridazon et le méthyl-desphényl-chloridazon et supérieures à 25 ng/l pour le desphényl-chloridazon.

Dans les eaux de surface, la méthode est applicable pour des teneurs supérieures à 25 ng/l pour l'ensemble des composés.

3. Principe

Après ajout des standards internes, l'échantillon est analysé par ULC/MS.

La méthode d'injection directe permet une analyse de l'échantillon sans extraction ni concentration préalable. Un volume plus important (100 µl) est injecté en chromatographie ULC afin de permettre une bonne sensibilité.

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.
- Pipettes de type Eppendorf de différents volumes, 10 à 100 µl et 100 à 1000 µl
- Filtre PVDF 0.45 µm
- Seringue de 2.5 ml en PP

- 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
- Acétonitrile qualité ULC/MS
- Acétone pour analyses de résidus pesticides
- Acide formique de qualité ULC/MS
- Ammoniaque de qualité LC/MS
- Etalons de référence : Matériaux de haute pureté ou certifiés (par exemple, standard Erhenstorfer)

7. Echantillonnage

Les échantillons sont prélevés dans des bouteilles de 100 millilitres en verre brun et remplies à ras bord. Ils sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière et sont analysés endéans les 14 jours.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des solutions étalons :

8.1.1. Solutions mères : 500mg/l

Peser exactement environ 0.0125 g de desphényl-chloridazon et le dissoudre dans un volume de 25 ml de méthanol pour obtenir une solution d'environ 500 mg/l. Peser exactement environ 0.0125 g chloridazon et le dissoudre dans un volume de 25 ml d'acétone pour obtenir une solution d'environ 500 mg/l. Le méthyl-desphényl-chloridazon est obtenu sous forme de solution à 100 mg/l dans de l'acétone (99.5% pureté).

Conserver les 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 desphényl-chloridazon (à 500mg/l), 50 µl de chloridazon (à 500mg/l) et 250 µl de méthyl-desphényl-chloridazon (à 100mg/l) dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter avec un mélange eau/acétonitrile (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. Solution fille : 20 µg/l

Introduire 100 µl de la solution fille à 1 mg/l dans une fiole jaugée de 5 ml et compléter au volume avec un mélange eau/acétonitrile (80/20).

8.1.4. Solution de référence pour l'étalonnage

Des solutions étalons de 250, 500, 1000, 2000 et 4000 ng/l sont réalisées en prélevant respectivement 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl et 400 µl de la solution fille à 20 µg/l (8.1.3) et en les introduisant dans des jaugés de 2 ml. Ajouter également, avant la mise à volume, 20 µl de la solution fille du mélange de standards internes.

La solution étalon de 10 ng/l est réalisée en prélevant 10 µl de solution fille à 20 µg/l (8.1.3) et en l'introduisant dans un jaugé de 20 ml avec ajout de 200 µl de la solution fille du mélange de standards internes (8.1.7).

La solution étalon de 25 ng/l est réalisée en prélevant 25 µl de solution fille à 20 µg/l (8.1.3) et en l'introduisant dans un jaugé de 20 ml avec ajout de 200 µl de la solution fille du mélange de standards internes (8.1.7).

8.1.5. Solution mère de chaque standard interne : 100 mg/l

Le chloridazon-d₅ et le ¹⁵N₂-desphenyl-chloridazon sont des solutions commerciales.

8.1.6. Solutions filles individuelles de standards internes : 1mg/l

Introduire 1 ml de solution mère de chloridazon-d₅ dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au volume avec un mélange eau/acétonitrile (80/20).

Introduire 1 ml de solution mère de ¹⁵N₂-desphenyl-chloridazon dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au volume avec un mélange eau/acétonitrile (80/20).

8.1.7. Solution fille de standards internes : 20 µg/l chloridazon-d₅ et 40 µg/l en ¹⁵N₂-desphenyl-chloridazon

Introduire dans un jaugé de 5 ml, 100 µl de la solution fille de chloridazon-d₅ (8.1.6) et 200 µl de la solution fille de ¹⁵N₂-desphenyl-chloridazon (8.1.6) et compléter au volume avec un mélange eau/acétonitrile (80/20).

8.1.8. Solution indépendante utilisée pour les contrôles : 1 mg/l

Une solution fille à 1 mg/l est réalisée à partir de solutions individuelles de concentrations 100 mg/l (les étalons ayant une origine différente de celle utilisée pour la courbe de calibration). Introduire 250 µl de chaque constituant dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter au volume avec un mélange eau/acétonitrile (80/20).

8.1.9. Solution fille indépendante pour les contrôles: 20µg/l

Introduire 100 µl de la solution mère à 1 mg/l (8.1.8) dans une fiole jaugée de 5ml et compléter au volume avec un mélange eau/acétonitrile (80/20).

8.1.10. Solution de référence pour le contrôle : 100 ng/l

Introduire 25 µl de la solution fille à 20 µg/l (8.1.9) dans une fiole jaugée de 5 ml avec ajout de 50 µl de la solution fille du mélange de standards internes (8.1.7). La mise à volume se fait avec de l'eau de source.

8.2 Préparation de l'échantillon :

Introduire l'échantillon dans un jaugé de 10 ml. Ajouter 100 µl de solution fille de standards internes (8.1.7) avant mise à volume.

Prélever une portion afin de filtrer l'échantillon avant analyse.

8.3 Essai à blanc :

Effectuer parallèlement à la détermination un essai à blanc dans les mêmes conditions où l'échantillon est remplacé par 10 ml d'eau minérale exempte des pesticides recherchés.

Le blanc ne peut pas contenir d'interférents dépassants 10 % de la plus petite valeur mesurée, sinon rechercher les sources de contamination et les éliminer.

8.4 Analyse par ULC/MS/MS

8.4.1 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 A).

8.4.2 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 (cf. chromatogramme TIC en annexe B).

Un tableau reprenant pour chaque constituant, 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 C.

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.

8.4.3 Etalonnage

L'étalonnage se fait par la méthode des standards internes en spectrométrie de masse.

Une gamme d'étalonnage à 8 points est utilisée.

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

8.4.4 Contrôle

Toutes les 10 injections, un contrôle est effectué avec la solution de référence pour le contrôle (8.1.10) fraîchement préparée pour vérifier la courbe d'étalonnage ainsi que la déviation de l'appareil. Les résultats de ce contrôle sont repris sur des cartes de contrôle.

9. Calcul

La méthode d'injection directe permet une lecture directe du résultat exprimé en ng/l.

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 concentrations est effectué sur base de la réponse du 1er ion fille de l'ion précurseur.

10. Avertissement

Les solvants utilisés pour cet essai, et en particulier l'acétonitrile, sont toxiques. 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*

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

Kowal S., (2012). Reduction of matrix effects and improvement of sensitivity during determination of two chloridazon degradation products in aqueous matrices by using UPLC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*,403,1707-1717

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

Annexe A

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 : 100 μl
- T° de colonne : 40°C
- Elution : éluant A : eau Milli-Q + 0,1 % ac. formique
 éluant B : acétonitrile + 0,1 % ac. formique

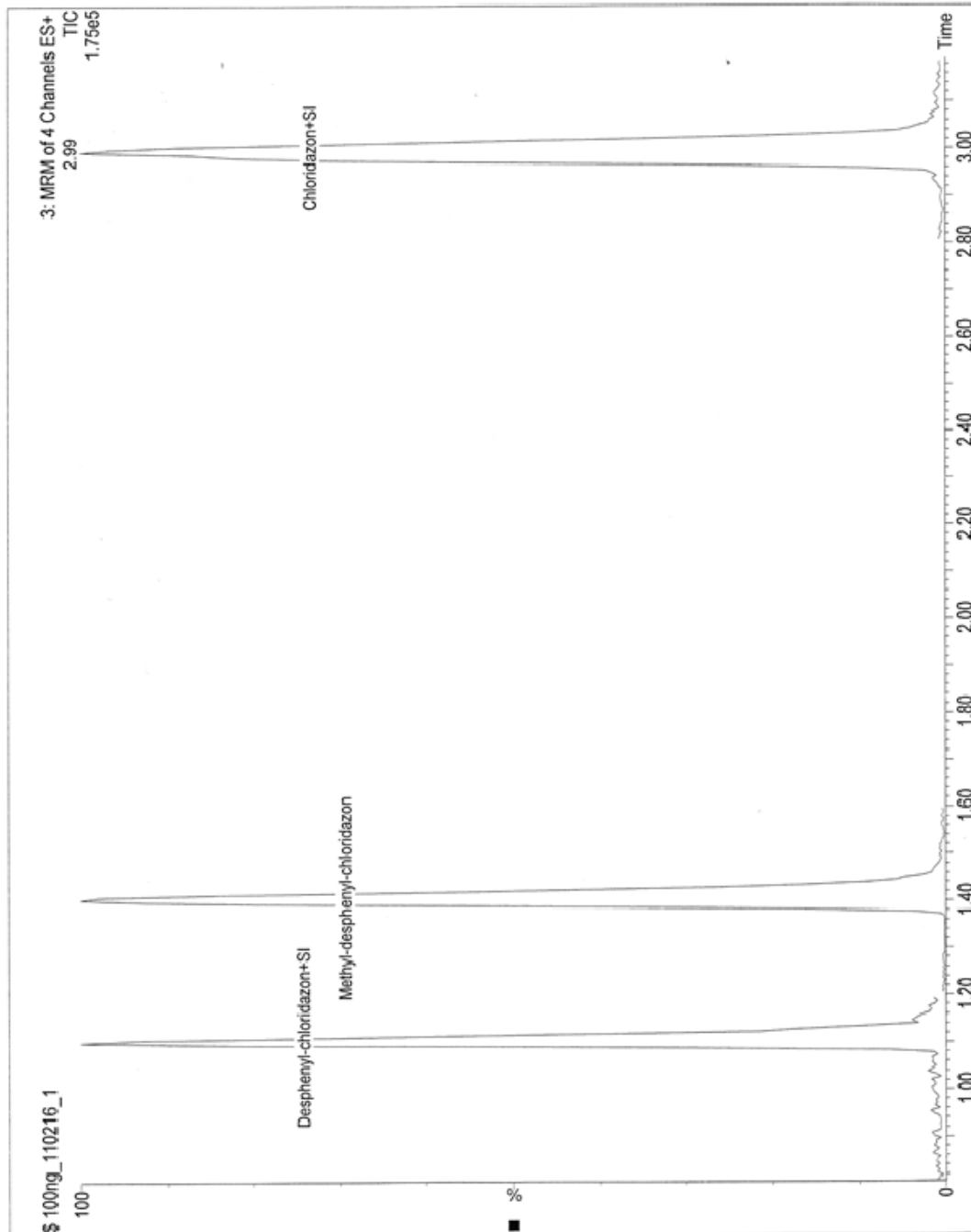
avec le gradient d'élution repris ci-dessous :

Temps	%A	%B
0	98	2
0,2	90	10
0,7	90	10
4,2	50	50
5	0	100
6	0	100
6,2	98	2
9	98	2

- Ajout post-colonne d'une solution à 0.4 mmol/l de NH_4OH (50 μl d'ammoniaque dans 30 ml d'eau MilliQ) à un débit de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ de 0 à 2 min

Annexe B

Exemple de chromatogramme TIC



Annexe C

Exemple de conditions MS/MS

Composants	Temps de rétention (min)	Ion précurseur m/z	Cone voltage (V)	Ion fille 1 m/z	Ecollision (V)	Ion fille 2 m/z	Ecollision (V)	Etalon interne
Desphenyl-chloridazon	1.1	146.0	45	117.1	18	101.1	21	¹⁵ N ₂ -desphenyl-chloridazon
¹⁵ N ₂ -desphenyl-chloridazon	1.1	148.0	45	117.0	18	102.0	20	-
Methyl-desphenyl-chloridazon	1.4	160.1	45	88.0	28	117.0	19	Chloridazon-d ₅
Chloridazon	3.0	222.1	45	92.1	25	77.0	31	Chloridazon-d ₅
Chloridazon-d ₅	3.0	227.0	44	81.1	32	96.1	25	-