

Analyse HPLC-ESI-MS/MS du glyphosate et de l'AMPA dans les eaux de surface (phase dissoute)

Références de la méthode

La méthode qui suit est dérivée de la publication suivante	Development of purification procedures and HPLC-MS/MS method for the determination of glyphosate and AMPA in surface waters (en preparation).
Norme française et/ou européenne dont est tirée la méthode	
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1
Code SANDRE de la méthode (suivant niveau de validation)	

Généralités

Nom de la famille de substances	Herbicides organophosphorés
Nom des substances individuelles	Glyphosate et acide aminométhylphosphonique (AMPA)
Code(s) SANDRE des substances individuelles	Glyphosate (1506) AMPA (1907)
Matrice analysée	Eau : Eau douce de surface
Nom de la méthode	SPE-HPLC-ESI-MS/MS
Principe de la méthode	Le glyphosate et l'AMPA (phase dissoute après filtration) sont dérivés avec le 9-fluorenylméthylchloroformate (FMOC-Cl) afin de réduire leur polarité et d'augmenter la rétention des composés lors d'une séparation sur une colonne chromatographique à polarité de phases inversée (i.e. C ₁₈). L'échantillon dérivé est purifié par extraction liquide/liquide puis concentré grâce à une extraction sur phase solide (SPE). L'analyse est réalisée avec une technique de chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse en tandem via une source

Domaine d'application	electrospray (HPLC-ESI-MS/MS). Le pH de la phase mobile doit être basique (pH=9-9,5) afin d'avoir de meilleures performances chromatographiques, ce qui implique l'utilisation d'une colonne particulière (phase stationnaire hybride).
Autres paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Contrôler les concentrations des ions calcium et magnésium : la méthode a été validée pour des eaux contenant moins de 3,2 mM de cations bivalents (somme Mg^{2+} et Ca^{2+}), soit une eau moyennement dure. Pour une eau dure, voire très dure, il sera peut-être nécessaire d'augmenter la concentration en EDTA-Na lors de l'étape de dérivation.
Précautions générales à suivre lors de l'analyse	Utilisation de flacons et de contenants en polypropylène (PP) avant dérivation, traitement rapide des échantillons après réception (< 24 h). S'assurer que l'eau ultra pure utilisée ne contient pas de traces de glyphosate ou d'AMPA (notamment si elle provient d'un système de purification alimenté par de l'eau potable). Si c'est le cas, il est préférable de réaliser une distillation ou d'utiliser de l'eau grade HPLC. Nettoyage de la verrerie : <ul style="list-style-type: none">- Remplir la verrerie (tubes et fioles en verre) avec une solution d'acide nitrique à 10 % ; laisser en contact pendant une nuit.- Rincer avec de l'eau déminéralisée, puis nettoyer à l'aide d'un détergent.- Placer dans un bac à ultrason (eau déminéralisée avec détergent) pendant 20 minutes.- Rincer avec de l'eau déminéralisée, puis ultra pure et enfin de l'éthanol (95 %).- Rincer avec quelques mL d'acétonitrile avant utilisation.

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :	Eau : Phase dissoute
Conditionnement et conservation des échantillons	
- Protocole :	Réaliser l'échantillonnage au moyen de flacons (10 mL minimum) en polyéthylène (PE) ou polypropylène (PP).
- Nature du contenant de stockage :	Conserver les échantillons dans des flacons en polyéthylène ou polypropylène. En effet, le glyphosate et l'AMPA s'adsorbent fortement sur le verre lorsqu'ils ne sont pas dérivés.
- Lavage du contenant :	Rincer les flacons avec de l'eau déminéralisée, puis nettoyer à l'aide d'un

- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :	détergent. Rincer avec de l'eau déminéralisée, puis ultra pure et enfin de l'éthanol (95 %). Conservation à 4°C pendant 48 h maximum.
Filtration : - Type de filtre et méthode de nettoyage :	- Rincer le filtre avec 5 mL d'eau ultra pure. - Filtrer l'échantillon (environ 50 mL) en jetant les 5 premiers mL. - Récupérer le filtrat dans un tube à fond conique en PP. - Conserver à 4°C avant dérivation.
- Type de support de filtration :	- Seringue (20 ou 50 mL) en PP ou PE, stérile, à usage unique. - Filtre pour seringue (ø 25 mm) avec membrane en cellulose régénérée hydrophile (0,45 µm) à usage unique.
Pré-traitement des échantillons liquide ou solide	Sans objet.

Analyse

Volume ou masse de la prise d'essai (mL ou mg selon la phase analysée)	Eau : Eau douce de surface (5 mL)
Réactifs et solvants	- Acétonitrile, méthanol et acétate d'éthyle (grade HPLC). Système de production d'eau ultrapure (18 MΩ). - Acétate d'ammonium, triéthylamine, ammoniacque (28 %), acide formique, acide acétique glacial, EDTA (sel de sodium), borate (sel de sodium) et 9-fluorenylmethylchloroformate pour analyses. - Etalons analytiques de glyphosate-FMOC, AMPA-FMOC, glyphosate (1,2 ¹³ C, ¹⁵ N) et d'AMPA (¹³ C, ¹⁵ N) (pureté > 98 %).

Dérivation

- Conditions (réactifs, solvants, pH, température et durée)

- Mettre 5 mL d'échantillon à l'aide d'une micropipette ou d'une pipette (PP ou PE) dans un tube à fond conique en PP ou PE de 50 mL (usage unique).
- Ajouter 50 µl d'une solution aqueuse de glyphosate ($1,2^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$) et d'AMPA ($^{13}\text{C},^{15}\text{N}$) à $20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (PP) en tant que traceurs avant la dérivation.
- Ajouter 325 µL de tampon Borate-Na (50 mM dans l'eau ultra pure) et agiter.
- Ajouter 200 µL EDTA- Na_2 (0.1 M dans l'eau ultra pure), agiter et laisser reposer 5 minutes. L'ajout d'EDTA permet de libérer les complexes de glyphosate et d'AMPA avec les cations bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.).
- Ajouter 4,5 mL d'acétonitrile. Bien agiter afin d'homogénéiser la solution (aucun déphasage ne doit être observé lors de cette étape).
- Ajouter 0,6 mL de FMOC-Cl (solution à $50\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ préparé dans l'acétonitrile) et agiter de nouveau.
- Laisser réagir 30 minutes dans l'obscurité et à température ambiante (20-25 °C).

Après dérivation, l'excès de FMOC-Cl et les sous produits de réaction (FMOC-OH) sont éliminés lors de l'extraction liquide/liquide.

Extraction

- Liquide / Liquide (préciser la nature et le volume du solvant)

- Concentrer l'échantillon sous azote (élimination de l'acétonitrile par évaporation) jusqu'à l'obtention d'un volume d'environ 5 mL. Un dépôt de FMOC-Cl (excès) et de FMOC-OH (sous-produit réactionnel) doivent se former sur les parois du tube contenant la solution aqueuse.
- Transférer la solution dans un tube en verre de 15 mL. Rincer le tube en plastique avec 500 µL d'eau ultra-pure.
- Extraire avec 3 fois 1,5 mL d'acétate d'éthyle, centrifuger pendant 20 secondes après chaque extraction pour bien séparer les deux phases si nécessaire.
- Eliminer le surnageant (acétate d'éthyle) avec une pipette pasteur (en changer à chaque extraction).
- Concentrer ensuite la phase aqueuse sous azote pendant 15 minutes pour éliminer le reste d'acétate d'éthyle (agiter les tubes toutes les 5 minutes). Le volume final est d'environ 4,5 – 5 mL.
- L'échantillon est acidifié (pH=3) afin de réaliser ensuite une préconcentration (étape SPE). Pour cela, ajouter 100 µL d'acide formique (solution à 5% dans l'eau ultra pure) dans la phase aqueuse, compléter à 5 mL avec de l'eau ultra pure si nécessaire, puis homogénéiser.

- Micro-onde (préciser la nature et le volume du solvant ainsi que les paramètres d'utilisation de l'appareil)

Sans objet.

- SPE (préciser le type de cartouche, la nature et les volumes des solvants de lavage et d'élution)

Utiliser des cartouches SPE du type Oasis HLB[®] (60 mg, 3 mL, Waters)

- Conditionnement : 2 x 500 µL de méthanol (MeOH) puis 2 x 500 µL d'une solution aqueuse d'acide formique (HCOOH) à 0,1 %.
- Percolation : 5 mL d'échantillon acidifié (pH=3) avec un débit d'environ $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Rinçage du tube : 1 mL d'une solution aqueuse de HCOOH à 0,1% (ajouté dans le tube pour le rincer) puis 2 x 500 µL eau ultra pure.
- Sécher ensuite brièvement l'adsorbant sous vide pendant 1 minute.
- Elution : 3 x 700 µL d'un mélange MeOH : solution aqueuse de NH_4OH à 2 % (70 : 30, v/v).

Récupérer l'éluat dans une fiole de 1 mL et concentrer sous azote (évaporation du MeOH). Le volume final est d'environ 0,4 mL.
Compléter à 1 mL avec de l'eau ultra pure avant analyse par HPLC-ESI-MS/MS.

- ASE (T°C, P, solvant d'extraction, nombre de cycles, % de flush)
- Autre (préciser)

Sans objet.

Sans objet.

Purification

(type de purification, paramètres de purification, méthode d'évaporation)

Voir étapes d'extraction LLE et SPE ci-dessus.

Minéralisation

Type d'appareil utilisé
Durée et température et de minéralisation :
Réactifs utilisés :

Sans objet.

Sans objet.

Sans objet.

Volume ou masse finale avant analyse :

1 mL (eau ultra pure), conserver l'échantillon 48 h maximum à 4°C.

Méthode analytique utilisée

Indiquer les paramètres complets de la méthode (exemple pour la chromatographie : gradient, phase mobile, débit, T °C, colonne, mode de détection)
Pour la détection par masse : mode d'ionisation et ions de quantification et de confirmation

Colonne XBridge® (50 mm x 2,1 mm i.d, 2,5 µm) (Waters) avec précolonne (10 mm x 2,1 mm i.d, 2,5 µm). Une colonne Gemini NX® (Phenomenex) de dimensions équivalentes peut être également utilisée.

Phase mobile : A (acétonitrile) et B (tampon triéthylamine 0,1% ajusté à pH 9,5 avec de l'acide acétique).

Volume d'injection : 50 µL

Tableau 1. Gradient analytique

Temps (min)	% A	% B
0,0	8	92
1,5	8	92
3,5	95	5
5,0	95	5
10,0	8	92
15,0	8	92

Tableau 2. Détection ESI-MS/MS

Analytes	Transitions de quantification	Transitions de confirmation
glyphosate-FMOC	390>168	390>150
AMPA-FMOC	332>110	332>136
glyphosate (1,2 ¹³ C ₂ , ¹⁵ N)-FMOC	393>171	393>153
AMPA (¹³ C, ¹⁵ N)-FMOC	334>112	334>138

Ionisation négative et détection en mode suivi de réaction (SRM).

Equipement (modèles utilisés) :	Chaîne HPLC : ULTIMATE 3000® dual gradient micro (Dionex). Spectromètre de masse : API 2000® triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX).
Type d'étalonnage	Etalonnage externe
Modèle utilisé	Linéaire
Etalons / Traceurs utilisés	Utilisation du glyphosate (1,2 ¹³ C ₂ , ¹⁵ N) et AMPA (¹³ C, ¹⁵ N) comme traceurs (ajout après la filtration de l'échantillon brut et avant dérivation). Ajout initial de 0,2 µg.L ⁻¹ , ce qui donne en théorie après dérivation et préconcentration (SPE) 2,29 µg.L ⁻¹ de glyphosate (1,2 ¹³ C ₂ , ¹⁵ N)-FMOC et 2,97 µg.L ⁻¹ d'AMPA (¹³ C, ¹⁵ N)-FMOC en considérant une réaction totale et des rendements de 100 %.
Domaine de concentration	0,5 – 20 µg.L ⁻¹ (étalons dérivés)
Méthode de calcul des résultats	Correction par le rendement : Non Calcul des concentrations initiales avant la dérivation : <ul style="list-style-type: none">- 391,32 g.mol⁻¹ (Glyphosate-FMOC) pour 169,08 g.mol⁻¹ (Glyphosate) soit un facteur de 2,31 pour déterminer la concentration de glyphosate avant dérivation.- 333,28 g.mol⁻¹ (AMPA-FMOC) pour 111,04 g.mol⁻¹ (AMPA) soit un facteur de 3,00 pour déterminer la concentration d'AMPA avant dérivation.- 394,32 g.mol⁻¹ (Glyphosate (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N)-FMOC) pour 172,08 g.mol⁻¹ (Glyphosate (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N)) soit un facteur de 2,29 pour déterminer la concentration de glyphosate (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N) avant dérivation.- 335,28 g.mol⁻¹ (AMPA (¹³C, ¹⁵N)-FMOC) pour 113,04 g.mol⁻¹ (AMPA (¹³C, ¹⁵N)) soit un facteur de 2,97 pour déterminer la concentration d'AMPA (¹³C, ¹⁵N) avant dérivation. Les concentrations de glyphosate et d'AMPA ne sont pas corrigées par les rendements. Toutefois, les rendements des traceurs analytiques après dérivation et analyse HPLC-ESI-MS/MS doivent être de : <ul style="list-style-type: none">- 76,4 ± 4,3% (n=5) pour le glyphosate (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N)-FMOC par rapport à l'étalon de glyphosate-FMOC ^{1,2};- 30,4 ± 7,8% (n=5) pour l'AMPA (¹³C, ¹⁵N)-FMOC par rapport à l'étalon d'AMPA-FMOC ^{1,2}. ¹ Les étalons non marqués de glyphosate-FMOC et d'AMPA-FMOC sont utilisés pour la quantification du glyphosate (1,2 ¹³ C ₂ , ¹⁵ N)-FMOC et de l'AMPA (¹³ C, ¹⁵ N)-FMOC (les étalons marqués et dérivés n'étant pas disponibles). ² Ces valeurs correspondent aux rendements mais aussi à la réponse plus faible des composés marqués par rapport au composés non marqués, ce qui explique les rendements inférieurs par rapport aux composés non marqués (Tableau 3).

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée	XP T90-210 (version de septembre 2008)									
Modèle utilisé	Linéaire									
Domaine de validation	0,04 à 1,73 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (glyphosate) 0,03 à 1,33 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (AMPA) Gammes de concentration équivalentes à un étalonnage de 0,5 à 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à l'aide des dérivés FMOC et un facteur de préconcentration de 5 (rendements supposés proches de 100 %).									
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1									
Matériaux de référence certifiés utilisés	Non disponible									
Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)	< LOD									
Rendement - par type de matrice - par niveau de concentration	Eau d'Evian Tableau 3. Rendements après dérivation, SPE et analyse									
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Composé</th> <th>Niveau 1 (0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$)</th> <th>C.V (n = 5)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glyphosate</td> <td>93,7 %</td> <td>3,9 %</td> </tr> <tr> <td>AMPA</td> <td>92,1 %</td> <td>5,7 %</td> </tr> </tbody> </table>	Composé	Niveau 1 (0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	C.V (n = 5)	Glyphosate	93,7 %	3,9 %	AMPA	92,1 %	5,7 %
Composé	Niveau 1 (0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	C.V (n = 5)								
Glyphosate	93,7 %	3,9 %								
AMPA	92,1 %	5,7 %								
	Un dopage correspondant à un second niveau (1,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le glyphosate et 1,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'AMPA) est envisagé. Etude d'une eau naturelle en cours.									
- par molécule (si moyenne préciser le nombre de répétitions et l'écart-type)										
Limite de détection (LD) Limite de quantification (LQ) (indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)	4 ng.L^{-1} pour le glyphosate et 8 ng.L^{-1} pour l'AMPA 14 ng.L^{-1} pour le glyphosate et 26 ng.L^{-1} pour l'AMPA Dopage dans l'eau d'Evian selon la LQ pressentie avec une régression linéaire. Validation des limites de quantification en cours.									
Spécificité de la méthode (préciser la matrice)	Testée : Oui Eau d'Evian : Ca^{2+} (78 mg.L^{-1}), Mg^{2+} (24 mg.L^{-1}). Eau de rivière : Ca^{2+} (128 mg.L^{-1}), Mg^{2+} (N.D.), carbone organique dissous (4,27 \pm 0,92 mg.L^{-1}).									

La méthode utilisée consiste à réaliser, sur des échantillons réels (eau d'évian et une eau de rivière), des ajouts dosés à des teneurs au moins équivalentes à celles déjà présentes dans les échantillons et couvrant tout le domaine de mesure évalué lors de l'étude de linéarité. Les valeurs de chaque droite dite "de recouvrement" ont été calculées ainsi :

Valeur après ajout – valeur avant ajout = f (ajout théorique)

Nous avons vérifié que les coefficients **a** (pente) et **b** (ordonnée à l'origine) des deux droites de recouvrement étaient respectivement et significativement non différents de **1** et de **0** (t-test, $\alpha=0,01$ et 8 degrés de libertés).

Incertitudes (%) sur les résultats

- par type de matrice

- par niveau de

concentration

- par molécule

(reproductibilité avec méthode de détermination)

En cours.

Contacts

Auteurs

Institut

Adresses mail

Tran-Thi Nhu-Trang et Nicolas Mazzella

Cemagref – UR REBX

nicolas.mazzella@cemagref.fr