

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

Généralités

Nom de la famille de substances	Herbicides organophosphorés
Nom des substances individuelles	Glyphosate et acide aminométhylphosphonique (AMPA)
Code SANDRE des substances individuelles	Glyphosate (1506) AMPA (1907)
Matrice analysée [code SANDRE du (des) support(s)]	Eau : eaux douces de surface et résiduaires [3]
Principe de la méthode	<p>Le glyphosate et l'AMPA (phase dissoute après filtration) sont dérivés avec le 9-fluorenylmethylchloroformate (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. C₁₈).</p> <p>L'échantillon dérivé est purifié par extraction liquide/liquide puis concentré grâce à une extraction sur phase solide (SPE).</p> <p>L'analyse est réalisée avec une technique de chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse en tandem via une source 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).</p>
Acronyme	SPE-HPLC-ESI-MS/MS
Domaine d'application	<p>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 Mg²⁺ et Ca²⁺), 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.</p> <p>Concernant les eaux résiduaires, l'ajout de fer (procédés de traitement des phosphates) peut également former des complexes avec le glyphosate et l'AMPA. Cependant, il n'a pas été observé d'influence significative jusqu'à 700 µg L⁻¹ de fer total dissous.</p> <p>La méthode a été validée pour une teneur en carbone organique dissous (COD) allant jusqu'à 5 mg.L⁻¹ et un taux de matières en suspension allant jusqu'à 100 mg.L⁻¹.</p>

Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode

Utilisation de flacons et de contenants en polypropylène (PP) ou polyéthylène (PE) avant dérivation. 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 :

- 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 alcalin.
- Placer dans un bac à ultrason (eau déminéralisée avec détergent alcalin) 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.

Analyse et rinçage de la colonne analytique :

Un relargage par la colonne peut parfois se produire, il est recommandé dans ce cas d'injecter un blanc solvant entre chaque échantillon. Par ailleurs, une attention particulière doit être apportée au rinçage et stockage de la colonne analytique. Il est en effet recommandé de rincer avec plusieurs volumes morts (environ 100 μL) - soit par exemple 10 mL à 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ - avec un mélange eau ultrapure : ACN (65 : 35) afin d'éliminer l'acétate de triéthylammonium et les traces d'analytes. Reconditionner la colonne avec les éluants et selon les proportions initiales du gradient lors d'une utilisation ultérieure.

Interférents (préciser la matrice)

Interférents identifiés : oui

Matrices testées : Testée : Oui

Eau d'Evian® Ca^{2+} (78 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Mg^{2+} (24 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Eau de rivière Ca^{2+} (128 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Mg^{2+} (N.D.), carbone organique dissous (4,3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Eau de rejet Fer total dissous (0,7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Ca^{2+} (42 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Mg^{2+} (6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). DCO (132 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), MES (65 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

La méthode utilisée consiste à réaliser, sur des échantillons réels (eau d'Evian®, une eau de rivière et une eau de rejet de station d'épuration), 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 liberté).

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.

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :

Eau : phase dissoute [3]

Note : il n'a pas été observé de différences significatives en termes de rendements pour des eaux douces de surface filtrées ou brutes (2 niveaux de dopage à 0,1 et 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, MES $\leq 100 \text{ mg.L}^{-1}$).

Conditionnement et conservation des échantillons

- Protocole :

Réaliser l'échantillonnage au moyen de flacons (10 mL minimum) en polyéthylène (PE) ou polypropylène (PP). Des flacons jetables sont utilisables à condition de vérifier que les valeurs de blanc obtenues sont inférieures aux limites instrumentales.

Filtration des échantillons *in situ* ou immédiatement après réception.

- Nature du contenant de stockage :

Conserver les échantillons dans des flacons en polyéthylène ou polypropylène. En effet, le glyphosate et l'AMPA ont tendance à s'adsorber 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 détergent alcalin. Rincer avec de l'eau déminéralisée, puis ultra pure et enfin de l'éthanol (95 %).

- Résultats de l'étude de stabilité :

Conservation maximale d'une semaine des échantillons filtrés à 4°C.

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 (\varnothing 25 mm) avec membrane en cellulose régénérée hydrophile (0,45 μm) à usage unique.

Analyse

Volume ou masse de la prise d'essai

Eau : eau douce de surface (5 mL)

Dérivation

- Réactifs :

- Acétonitrile, méthanol et acétate d'éthyle (grade HPLC). Système de production d'eau ultrapure (18 M Ω).

- Acétate d'ammonium, triéthylamine, ammoniacque (28 %), acide formique, acide acétique glacial, EDTA (sel de sodium), borate (sel

- Conditions

de sodium) et 9-fluorenylmethylchloroformate pour analyses.

- Etalons analytiques de glyphosate-FMOC, AMPA-FMOC, glyphosate (1,2 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N) et d'AMPA (^{13}C , ^{15}N) (pureté > 98 %).

Etape de dérivation :

- 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}N) et d'AMPA (^{13}C , ^{15}N) à 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (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 mg.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

- 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.

- SPE

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 mL.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 NH₄OH à 2 % (70 : 30, v/v) avec un débit d'environ 1 mL.min⁻¹.

Récupérer l'éluat dans un tube en verre (volume du tube allant jusqu'à 20 mL) et concentrer sous azote (évaporation du MeOH). Le volume résiduel après l'évaporation du méthanol est d'environ 0,2-0,3 mL.

Compléter à 1 mL avec de l'eau ultra pure avant analyse par HPLC-ESI-MS/MS.

Purification

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

Conservation de l'extrait

Conserver l'extrait dérivé 48 h maximum à 4°C (les dérivés FMOC étant hydrolysables).

Volume ou masse finale avant analyse :

1 mL (eau ultrapure)

Méthode analytique utilisée :

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).

Débit : 400 µL.min⁻¹

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).

Equipements ¹:

Chaîne HPLC : ULTIMATE 3000® dual gradient micro (Dionex).

Spectromètre de masse : API 2000® triple quadrupole mass spectrometer (AB SCIEX).

Type d'étalonnage

Gamme extraite

Modèle utilisé

Linéaire

Etalons / Traceurs utilisés

Utilisation du glyphosate (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N) et AMPA (¹³C, ¹⁵N) comme traceurs (ajout après la filtration de l'échantillon brut et avant dérivation).

Domaine de concentration

Avant chaque série, préparer un étalonnage avec au moins 5 points selon ISO 8466-1 sur le domaine de travail : 0,05 à 1,5 µg.L⁻¹ (glyphosate et glyphosate (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N)), de 0,05 à 1,5 µg.L⁻¹ (AMPA) et de 0,1 à 1,5 µg.L⁻¹ AMPA (¹³C, ¹⁵N).

Note : étant donné les eaux résiduaires peuvent contenir des quantités importantes d'AMPA (i.e. quelques µg.L⁻¹) issue de la dégradation de détergents, il peut être souhaitable de réaliser une dilution des échantillons avant l'étape de dérivation ou d'étendre la gamme d'étalonnage en vérifiant le domaine de linéarité au préalable.

¹ 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

Méthode de calcul des résultats

Correction par le rendement : non

Réaliser une gamme extraite en appliquant l'ensemble du mode opératoire (dérivation et extraction) à des eaux minérales dopées avec des étalons de glyphosate, glyphosate* (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N), AMPA et AMPA* (¹³C, ¹⁵N) selon le domaine de concentration défini.

Traiter comme des échantillons et établir la fonction d'étalonnage pour chaque composé.

La série de valeurs de mesure ainsi obtenue doit être utilisée pour établir la fonction de régression linéaire comme indiqué ci-après (Equation 1) :

$$y_{ie} = m_i \cdot \rho_{ie} + b_i \quad (1)$$

où :

y_{ie} est la réponse mesurée (variable dépendante) de la substance i pendant l'étalonnage en fonction de ρ_{ie} , en unité arbitraire, par exemple valeur de surface ;

ρ_{ie} est la concentration en masse (variable indépendante) de la substance i (étalon externe), dans la solution étalon de travail, exprimée en microgrammes par litre, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;

m_i est la pente de la courbe d'étalonnage de la substance i , en unité arbitraire, par exemple valeur de surface x litres par microgramme, $\text{L}\cdot\mu\text{g}^{-1}$;

b_i est l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage, en unité arbitraire, par exemple valeur de surface.

Les gammes extraites d'étalonnage du glyphosate* (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N) et de l'AMPA* (¹³C, ¹⁵N) serviront à doser les traceurs ajoutés dans les échantillons et à contrôler le rendement des étapes de dérivation et d'extraction. 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 :

- 100 ± 20 % pour le glyphosate* (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N)-FMOC et l'AMPA* (¹³C, ¹⁵N)-FMOC ;

Références de la méthode

La méthode 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 dont est tirée la méthode

ISO/FDIS 16308 -- Qualité de l'eau -- Détermination du glyphosate et de l'AMPA -- Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection par spectrométrie de masse en tandem.

Niveau de validation selon
Norman

Niveau 3

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée

NF T90-210

Domaine de validation

Linéaire
0,05 à 1,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (glyphosate et AMPA)

Blancs analytiques

< LOQ

Rendement

- par type de matrice

Eaux d'Evian®, de rivière et résiduaires (sorties).

- par niveau de concentration et
par moléculeDeux niveaux de concentration (0,1 et 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$), n=10.

Substances	Rendement %
Glyphosate	100 \pm 20
Glyphosate (1,2 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N)	
AMPA	
AMPA (^{13}C , ^{15}N)	

Limite de quantification (LQ)

Limite de détection (LD)

Limites de quantification validées selon la norme NF T90-210 (projet de révision version de septembre 2008) avec le dopage d'eau d'Evian® (30 ng.L^{-1}).

Substances	LQ (ng.L^{-1})
Glyphosate	28 \pm 1
AMPA	25 \pm 1

Incertitudes (%) sur les résultats

- par niveau de concentration

Les incertitudes composées ont été déterminées par la méthode GUM (NF T90-220:2003) approche 1) en dérivant la relation suivante :

$$C_{\text{eau}} = C_{\text{étalonnage}} \times \frac{V_{\text{extrait}}}{V_{\text{échantillon}}} \times \frac{1}{R}$$

Ce qui donne en utilisant la formule de propagation des incertitudes :

$$\frac{u_{C_{\text{eau}}}}{C_{\text{eau}}} = \sqrt{\left(\frac{u_{C_{\text{étalonnage}}}}{C_{\text{étalonnage}}}\right)^2 + \left(\frac{u_R}{R}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{extrait}}}}{V_{\text{extrait}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{échantillon}}}}{V_{\text{échantillon}}}\right)^2}$$

Seules les incertitudes liées à la courbe d'étalonnage et à l'extraction (rendements, volumes des extraits et des échantillons) sont prises en compte. Les incertitudes sur les pesées et la préparation de la gamme sont considérées comme négligeables.

Les incertitudes relatives exprimées en % pour le glyphosate en fonction des niveaux de concentration sont indiquées dans le tableau suivant :

Niveaux de Concentration Glyphosate ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0,05	0,1	0,5	1	1,5
Etalonnage	22,1	23,6	25,2	21,0	18,2
Rendements	12,4	12,4	12,4	12,4	12,4
Volume extrait	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume échantillon	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Incertitude composée $u(\text{Ceau})/\text{Ceau}$	25,9	27,2	28,5	24,9	22,6
Incertitude élargie (k=2)	51,7	54,4	57,1	49,8	45,3

Les incertitudes relatives exprimées en % pour l'AMPA en fonction des niveaux de concentrations sont indiquées dans le tableau suivant :

Niveaux de Concentration Glyphosate ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0,05	0,1	0,5	1	1,5
Etalonnage	37,2	37,8	26,6	20,1	7,6
Rendements	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
Volume extrait	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume échantillon	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Incertitude composée $u(\text{Ceau})/\text{Ceau}$	38,7	39,3	28,7	22,8	13,2
Incertitude élargie (k=2)	77,5	78,5	57,4	45,6	26,4

Contacts

Auteurs

Tran-Thi Nhu-Tran, Kéwin Gery et Nicolas Mazzella

Institut

Irstea (Cemagref) – UR EABX

Contact

nicolas.mazzella@irstea.fr