

Analyse du glyphosate et de l'AMPA par HPLC-ESI-MS/MS dans les sédiments (eaux douces de surface)

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)]	Sédiments (6) dans les eaux douces de surface
Principe de la méthode	<p>Le glyphosate et l'AMPA sont extraits à partir de sédiments au moyen d'une solution alcaline. Le surnageant est purifié sur cartouche SPE, puis le glyphosate et l'AMPA 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 ensuite purifié par extraction liquide/liquide, suivi d'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	ELS-SPE-HPLC-ESI-MS/MS
Domaine d'application	La méthode a été validée pour une teneur en matière organique dans le sédiment de 8,8 mg.g ⁻¹ maximum, pour une gamme de 0,7 à 66,7 µg.kg ⁻¹ (glyphosate et AMPA).
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Détermination de la teneur en matière organique et analyse granulométrique du sédiment.

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 (conforme au grade 1 de l'ISO 3696).

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 ultrasons (eau déminéralisée avec détergent alcalin) pendant 20 minutes.
- Rincer avec de l'eau déminéralisée, puis eau ultra pure et enfin de l'éthanol (95 %).
- Rincer avec quelques mL d'acétonitrile avant utilisation.

Analyse et rinçage de la colonne analytique :

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 de colonne (environ 100 μL dans le cas de la colonne analytique employée) - 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 : pas d'interférences mises en évidence.

La méthode utilisée consiste à réaliser, sur des extraits de sédiments, des ajouts dosés d'analytes dérivatisés 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).

Dans le cas de cette étude, des ajouts dosés pos-dérivation selon 3 niveaux de concentration (0,2 ; 1 ; 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ont été réalisés, après les étapes d'extraction et de dérivation.

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 :	Sédiments - Particule < 2 mm de sédiments [32] Séchage des sédiments congelés au moyen d'un lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus (CHRIST).
Conditionnement et conservation des échantillons - Protocole : - Nature du contenant de stockage : - Lavage du contenant : - Résultats de l'étude de stabilité :	Réaliser l'échantillonnage (10 g minimum) en prélevant les sédiments de surface (couche superficielle < 2 cm). Flacons en polyéthylène ou polypropylène à col large. 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 %). Conservation extraits lyophilisés jusqu'à 6 mois à -18°C.
Tamisage :	Tamisage à 2 mm.

Analyse

Volume ou masse de la prise d'essai	Sédiments tamisé [32] et lyophilisé : 10 g minimum
Extraction du sédiment - Réactifs : - Conditions	- Méthanol (grade HPLC). Système de production d'eau ultrapure (18 M Ω). Hydroxyde de potassium pour analyse (KOH). - Placer 3 g de sédiment tamisé et lyophilisé dans un tube à fond conique en PP ou PE de 50 mL (usage unique). - Ajouter 10 mL de KOH à 0,5 M - Agiter pendant 30 minutes - Centrifuger à 3500 tours.min ⁻¹ pendant 10 min. - Prélever 2,5 mL du surnageant et transférer dans un dans un tube à fond conique en PP ou PE de 50 mL (usage unique). - Ajouter 2,5 mL d'eau ultra pure (dilution de moitié de l'extrait), puis homogénéiser. - Ajuster le pH à 9 avec une solution de HCl à 6 M (env. 160 μ L).
Purification avant dérivation - 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, 60 μ m, 3 mL, Waters) - Conditionnement : 2 mL de méthanol (MeOH) puis 2 mL d'eau ultra pure. - Percolation : 5 mL avec un débit d'environ 1 mL.min ⁻¹ . Recueillir les 5 mL d'extrait dans un tube à fond conique en PP ou PE de 50 mL (usage unique).

Dérivation

Réactifs :

- Conditions

- Acétonitrile, méthanol et acétate d'éthyle (grade HPLC). Système de production d'eau ultrapure (18 M Ω).
- Acétate d'ammonium, triéthylamine, 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 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N) et d'AMPA (^{13}C , ^{15}N) (pureté > 98 %).

Etape de dérivation

A partir du tube à fond conique en PP ou PE de 50 mL contenant les 5 mL d'extrait :

- 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 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (PP) en tant qu'étalons internes, avant la dérivation.
- Ajouter 325 μL de tampon Borate-Na (50 mM dans l'eau ultra pure) et agiter.
- Ajouter 1 mL EDTA- Na_2 (0,2 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.

Purification après dérivation

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

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

- Conditionnement : 2 x 500 µL de 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.

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 dans de l'eau d'Evian®

Modèle utilisé

Linéaire

Etalons / Traceurs utilisés

Utilisation du glyphosate (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N) et AMPA (¹³C, ¹⁵N) comme étalons internes (ajout avant l'étape de 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 10 µg.L⁻¹ (glyphosate et glyphosate (1,2 ¹³C₂, ¹⁵N)), de 0,05 à 10 µg.L⁻¹ (AMPA) et de 0,1 à 10 µg.L⁻¹ AMPA (¹³C, ¹⁵N).

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 comme indiqué dans la la norme ISO 16308:2014 en appliquant le mode opératoire, à partir de l'étape de dérivation, 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, à partir de l'étape de dérivation, et établir la fonction d'étalonnage pour chaque composé.

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

$$\frac{y_{ie}}{y_{int,ie}} = a_i \frac{\rho_{ie}}{\rho_{int,ie}} + b_i \quad (1)$$

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 , dans la solution étalon de travail, exprimée en microgrammes par litre, $\mu\text{g.L}^{-1}$;

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, $\mu\text{g. L}^{-1}$;

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

$y_{int,ie}$ est la réponse mesurée (variable dépendante) de l'étalon interne pour la substance i pendant l'étalonnage en fonction de $\rho_{int,ie}$, en unité arbitraire, par exemple valeur de surface ;

$\rho_{int,ie}$ est la concentration en masse (variable indépendante) de l'étalon interne pour la substance i , dans la solution étalon de travail, exprimée en microgrammes par litre, $\mu\text{g.L}^{-1}$;

Les concentrations de glyphosate et d'AMPA ne sont pas corrigées par les rendements. Toutefois, il convient de vérifier au préalable, lors de dopages de sédiment, que les rendements suivants :

100 ± 20 % pour le glyphosate et l'AMPA

Références de la méthode**La méthode est dérivée de la publication suivante**

Botero-Coy, A.M., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F., 2013. Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1292, 132-141.

Norme dont est tirée la méthode	ISO 16308:2014 - 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 (pour ce qui est de l'étape de dérivation et étalonnage).
Niveau de validation selon Norman	V1

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée Domaine de validation	NF T90-210 Droite de régression linéaire 0,1 à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, soit l'équivalent de 0,7 à 66,7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (glyphosate et AMPA).						
Blanc méthode (concentration ou résultat maximum acceptable)	< 0,7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$						
Rendement - par type de matrice - par niveau de concentration	Sédiment de rivière (matière organique : 8,8 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 95,1 % de sable, 4,9 % argiles et limons). Deux niveaux de dopage (2 et 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), n=10.						
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Substances</th> <th>Rendement %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glyphosate</td> <td>98±11</td> </tr> <tr> <td>AMPA</td> <td>82±22</td> </tr> </tbody> </table>	Substances	Rendement %	Glyphosate	98±11	AMPA	82±22
Substances	Rendement %						
Glyphosate	98±11						
AMPA	82±22						
- par molécule (si moyenne préciser le nombre de répétitions et l'écart-type)							
Limite de quantification (LQ) Limite de détection (LD) (indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)	Limite de quantification de 0,7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (dopage à la LQ pressentie, sédiment de lac, matière organique : 3,2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 95,7 % de sable, 4,3 % argiles et limons).						
Incertitudes (%) sur les résultats - par niveau de concentration	Non déterminées.						

Contacts

Auteurs	Kéwin Gery et Nicolas Mazzella
Institut	Irstea (Cemagref) – UR EABX
Contact	nicolas.mazzella@irstea.fr