



Développement et validation d'une méthode permettant le dosage du glyphosate et de l'AMPA dans les eaux surface par HPLC-ESI-MS/MS

N.T. Tran Thi, Nicolas Mazzella, François Delmas

► To cite this version:

N.T. Tran Thi, Nicolas Mazzella, François Delmas. Développement et validation d'une méthode permettant le dosage du glyphosate et de l'AMPA dans les eaux surface par HPLC-ESI-MS/MS. XXXIXème congrès du Groupe Français des Pesticides, May 2009, Toulouse, France. p. - p. hal-00473242

HAL Id: hal-00473242

<https://hal.science/hal-00473242>

Submitted on 14 Apr 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Développement et validation d'une méthode permettant le dosage du glyphosate et de l'AMPA dans les eaux surface par HPLC-ESI-MS/MS

TRAN-THI Nhu-Trang*, Nicolas MAZZELLA, Brigitte DELEST, François DELMAS

Cemagref de Bordeaux, UR REBX
50 avenue de Verdun – 33612 CESTAS

Résumé

Le glyphosate et son principal produit de dégradation – acide aminométhylphosphonique (AMPA) – sont dérivés avec le 9-fluorenylméthyl chloroformate (FMOC-Cl). L'échantillon dérivé est purifié par extraction liquide/liquide puis concentré grâce à une extraction sur phase solide. La combinaison d'extractions liquide-liquide et sur phase solide permet de purifier les extraits et d'éliminer les éventuels effets matrice. L'analyse est réalisée avec une technique de chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem via une source électrospray (HPLC-ESI-MS/MS). La séparation est obtenue avec une colonne de polarité de phase inversée particulière (phase stationnaire C₁₈ hybride). La limite de quantification de 0,05 µg.L⁻¹ a été obtenue pour le glyphosate et l'AMPA.

Mots-clés : glyphosate, AMPA, purification des extraits, HPLC-ESI-MS/MS

1. Introduction

Le glyphosate [*N*-(phosphonométhyl) glycine] est un des herbicides les plus vendus dans le monde depuis son arrivée sur le marché en 1974 sous la formulation commerciale « Roundup » (Monsanto, Etats-Unis). Lorsqu'il atteint le sol, le glyphosate se fixe sur le complexe argilo-humique. En cas de fortes précipitations après application, il peut ruisseler vers des eaux superficielles. Dans le sol comme dans l'eau, le glyphosate est dégradé par les micro-organismes en acide aminométhylphosphonique (AMPA) et minéralisé ensuite en CO₂, phosphate inorganique, eaux et certains dérivés minéraux (Forlani *et al.*, 1999). L'AMPA est considéré comme le principal produit de dégradation du glyphosate, mais il peut aussi provenir des rejets de stations d'épuration urbaines. La difficulté de la mise au point de méthodes de dosage à l'état de traces (concentrations < 0,1 µg/L) est principalement liée à leur haute polarité (log K_{OW} < - 3) (Chamberlain *et al.*, 1996), leur grande solubilité (12 g.L⁻¹ dans eau douce), à leur caractère chélatant ainsi qu'à l'absence de chromophores. Une dérivation pré-colonne avec le 9-fluorenylméthylchloroformate (FMOC-Cl) est utilisée pour former des dérivés moins polaires caractérisés également par un poids moléculaire plus élevé, ce qui augmente d'une part la rétention sur une colonne du type C₁₈ et facilite d'autre part la détection par HPLC-ESI-MS/MS (Ibanez *et al.*, 2005). Par ailleurs, afin d'avoir les meilleures performances chromatographiques, le pH de la phase mobile doit être basique (pH de 9 à 9,5), ce qui implique l'utilisation d'une colonne adaptée à de telles conditions (phase stationnaire hybride). Une étape de purification a été également développée en combinant une extraction liquide-liquide (ELL) avec l'acétate d'éthyle et une extraction sur phase solide (SPE) avec un adsorbant du type Oasis HLB. Cette étape a permis simultanément l'élimination des effets matrice qui sont généralement problématiques avec une détection ESI-MS/MS (Ghanem *et al.*, 2007) et d'atteindre des limites de quantification proches du ng.L⁻¹ pour les deux composés d'intérêt.

*Email : nhutrang.tranthi@cemagref.fr

2. Méthodologie

L'échantillon d'eau est initialement filtré avec le filtre 0,45µm et ensuite traité avec de l'EDTA afin de dissocier les complexes formés entre le glyphosate et les ions bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.). Le glyphosate et l'AMPA ^{13}C , ^{15}N ont été utilisés comme traceurs de la méthode (ajout avant dérivation). Après la dérivation avec le FMOCl, l'échantillon est purifié et pré-concentré suivant le protocole présenté dans la figure 1.

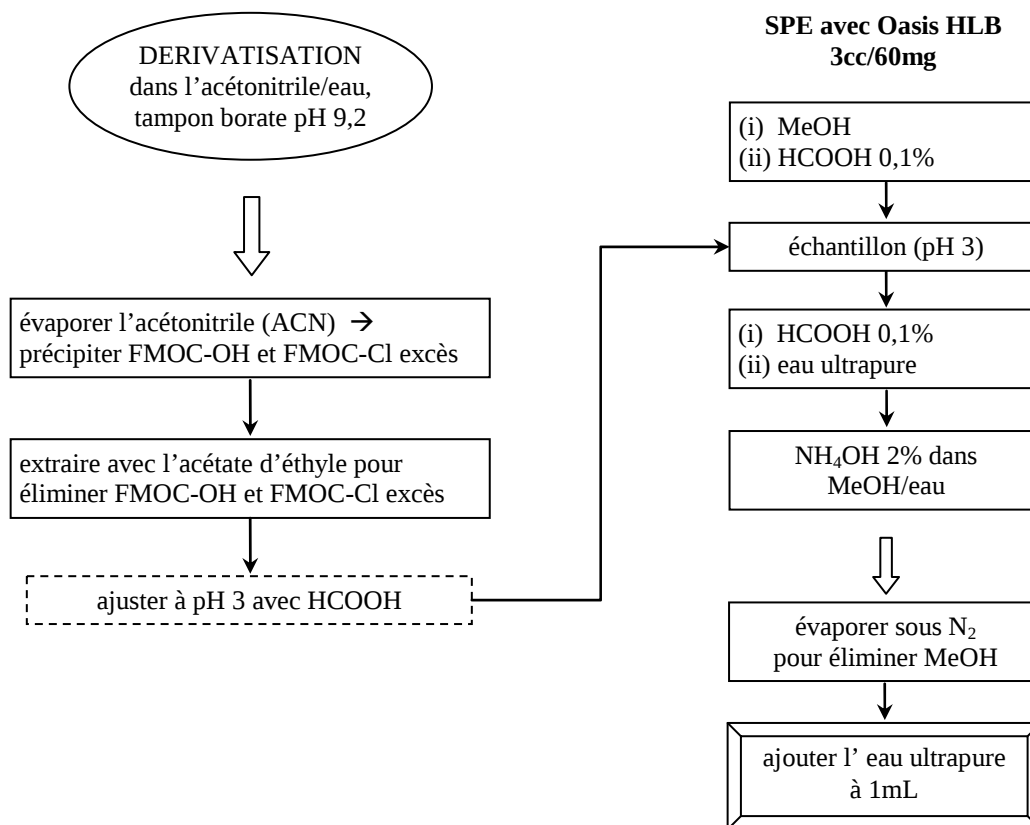


Figure 1. Protocole de préparation de l'échantillon avant analyse par HPLC-ESI-MS/MS

3. Résultats et discussion

Dans notre étude, une nouvelle méthode HPLC a été développée par l'utilisation d'une colonne C_{18} avec un greffage hybride organique/inorganique (XBridge – Waters) et d'un tampon de triéthylamine à pH 9,5. Nous avons obtenu une très bonne séparation entre le glyphosate-FMOCl, l'AMPA-FMOCl et des pics plus symétriques par rapport à l'utilisation de la colonne C_{18} à base de silice (comme Atlantis – Waters) et du tampon d'acétate d'ammonium qui ont appliqués dans plusieurs publications (figure 2).

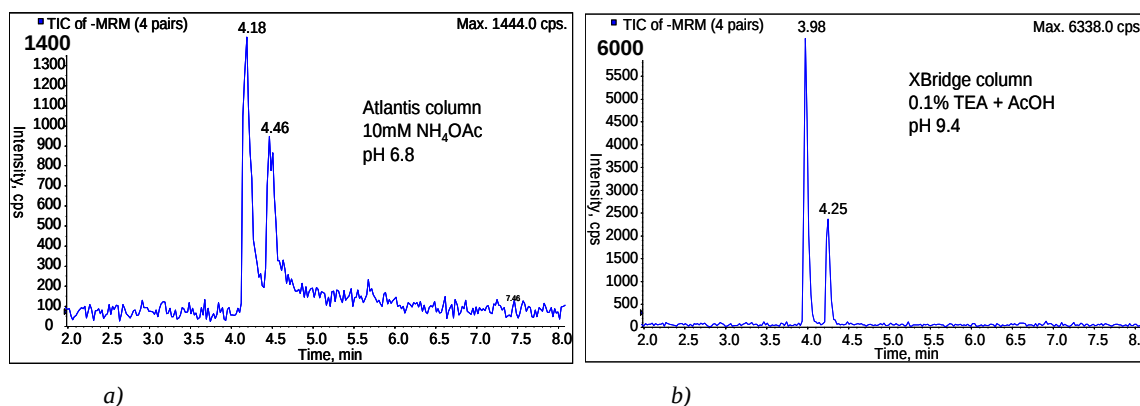


Figure 2. Comparaison des chromatogrammes HPLC-ESI-MS/MS d'un mélange d'étalons de glyphosate-FMOC (1^{er} pic) et d'AMPA-FMOC (2^e pic) à 5 µg.L⁻¹

- a) colonne C₁₈ Atlantis, tampon NH₄OAc 10mM à pH 6,8
 b) colonne C₁₈ XBridge, tampon TEA 0,1% ajusté à pH 9,4 avec de l'acide acétique

Dans la procédure d'analyse, le traitement initial avec l'EDTA dans milieu basique (tampon borate pH 9,2) a permis de libérer le glyphosate dans son complexe avec métaux. Comme les résultats présentés dans le tableau 1, on constate une influence important de l'EDTA sur le glyphosate mais non sur l'AMPA. Un écart de 36% de rendement a trouvé pour le glyphosate.

Table 1. Rendements obtenus par le traitement d'échantillon avec et sans EDTA pour l'eau Evian dopée à 0,1 µg.L⁻¹

Composé	Rendement sans EDTA (%)	Rendement avec EDTA (%)
Glyphosate	62,7	97,6
AMPA	91,3	90,0

La méthode a été validée selon la norme PR XP T 90-210. Au cours de cette validation, une attention particulière a été portée au niveau de la spécificité, ce qui implique la réduction des effets de matrice pouvant interférer et fausser la validité des dosages par HPLC-ESI-MS/MS. L'étude des effets matrice a été réalisée au moyen d'ajout dosés post-extraction d'étalons de glyphosate-FMOC et d'AMPA-FMOC avec cinq niveaux de concentrations (de 1,00 à 20,00 µg.L⁻¹) et deux répétitions par niveau dans de l'eau minérale d'Evian ainsi qu'une eau de rivière (Ruiné, département de la Charente). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.

Table 2. Ajouts dosés post-extraction de glyphosate-FMOC et d'AMPA-FMOC afin de vérifier la spécificité de la méthode

Concentration ajoutée ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentration retrouvée avec l'eau naturelle ^a ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Grandeur retrouvée avec l'eau Evian ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
	Glyphosate-FMOC	AMPA-FMOC	Glyphosate-FMOC	AMPA-FMOC
1,00	0,92	0,78	0,90	0,94
2,00	1,95	1,74	1,86	1,98
5,00	4,71	4,04	5,07	5,14
10,00	9,34	8,52	9,99	10,07
20,00	19,05	17,00	20,00	21,05

^a Eau de rivière (Ruiné).

En conclusion, avec l'ensemble du protocole de dérivation et de purification, nous avons obtenu les très bons rendements de 94,9 % (écart-type = 1,4 % ; n = 5) pour le glyphosate et de 81,8 % (écart-type = 1,8 % ; n = 5) pour l'AMPA. La méthode d'analyse développée est fiable et robuste avec une sensibilité élevée (LQ 0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et une grande stabilité. Cette méthode est en train d'être appliquée pour analyser les échantillons de la rivière Ruiné (Charente) et de la rivière Morcille (Rhône).

Références

- Chamberlain K., Evans A. A., Bromilow R. H., *Pestic. Sci.* 47 (1996) 265.
 Forlani G., Mangiagalli A., Nielsen E., Suardi C.M., *Soil Biology and Biochem.* 31 (1999) 991.
 Ghanem A., Bados P., Kerhoas L., Dubroca J., Einhorn J., *Anal. Chem.* 79 (2007) 3794.
 Glass R. L., *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 280.
 Ibanez M., Pozo O.J., Sancho J.V., Lopez F.J., Hernandez F., *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 145.
 Sancho J. V., Hernandez F., Lopez F. J., Hogendoorn E. A., Dijkman E., Van Zoonen P., *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 75.

Remerciements

Ces travaux ont été co-financés par l'ONEMA et s'inscrivent dans le cadre des activités du laboratoire national de référence de l'eau et des milieux aquatiques (Aquaref).