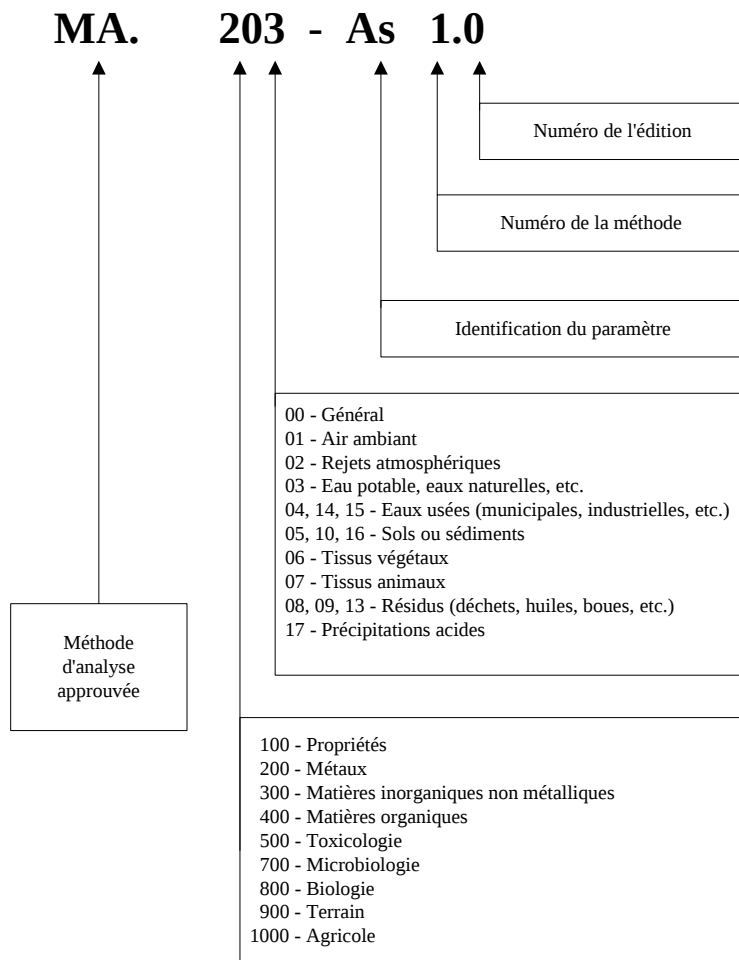


MA. 403 – GlyAmp 1.0
Édition : 2003-02-11
Révision : 2008-04-24 (3)

Méthode d'analyse

Détermination du glyphosate et de l'AMPA dans les eaux :
dosage par chromatographie en phase liquide; dérivation
postcolonne et détection en fluorescence

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est identifiée par l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. L'indice peut également être augmenté si une révision entraîne des modifications en profondeur. La date de révision d'une méthode est suivie d'un chiffre indiquant la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Détermination du glyphosate et de l'AMPA dans les eaux : dosage par chromatographie en phase liquide; dérivation post-colonne et détection en fluorescence.
MA. 403 - GlyAmp 1.0, Rév. 3, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2008, 14 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	5
2. PRINCIPE ET THÉORIE	5
3. FIABILITÉ	5
3.1. Interférence	6
3.2. Limite de détection	6
3.3. Limite de quantification	6
3.4. Sensibilité	6
3.5. Fidélité	6
3.6. Justesse	6
3.7. Récupération	7
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	7
5. APPAREILLAGE	7
6. RÉACTIFS ET ÉTALONS	8
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	11
7.1. Préparation de l'échantillon	11
7.2. Dosage	11
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	13
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	13
10. BIBLIOGRAPHIE	13

INTRODUCTION

Le glyphosate [N – (phosphonométhyl)glycine] est un herbicide systémique largement utilisé pour enrayer les mauvaises herbes annuelles et vivaces. L'AMPA (acide aminométhyl phosphonique) constitue le métabolite majeur du glyphosate. La popularité grandissante de l'utilisation de glyphosate est attribuable à sa rapidité d'infiltration et de déplacement à l'intérieur de la plante, sa grande solubilité dans l'eau, sa faible persistance dans le sol et une faible toxicité pour les mammifères.

Comme c'est le cas de plusieurs autres produits chimiques, ce produit peut irriter la peau et les yeux. Il peut être absorbé par voies orale et cutanée.

Le Règlement sur la qualité de l'eau potable stipule que la concentration de glyphosate ne doit pas excéder 280 µg/l dans l'eau potable.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détermination du glyphosate et de l'AMPA dans l'eau potable et les eaux de surface. Le domaine d'application se situe entre 0,8 µg/l et 2 000 µg/l pour le glyphosate et entre 4,0 µg/l et 2 000 µg/l pour l'AMPA.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

L'échantillon d'eau est filtré sur une membrane de 0,45 µm de porosité et un volume de 50 µl est injecté dans un chromatographe à phase liquide muni d'une colonne chromatographique de type cationique. Après la séparation chromatographique du glyphosate et de l'AMPA, le glyphosate seul est hydrolysé avec une solution d'hypochlorite de sodium. L'amine primaire ainsi formée par l'hydrolyse du glyphosate et l'AMPA réagissent avec l'OPA-thiofluor pour former des composés fluorescents qui sont détectés à l'aide d'un fluorimètre.

NOTE – Une trop grande concentration de la solution d'hypochlorite de sodium entraînera une perte de sensibilité pour l'AMPA.

Les concentrations de glyphosate et d'AMPA contenues dans l'échantillon sont calculées à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire obtenue à partir de solutions étalons.

3. FIABILITÉ

Les termes suivants sont définis dans le document DR-12-VMC, intitulé *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie*.

3.1. INTERFÉRENCE

Les interférences peuvent être causées par des contaminants contenus dans les solvants, les réactifs, la verrerie ou les appareils de préparation. Tous les solvants, les réactifs et les appareils doivent être vérifiés régulièrement par l'analyse de solutions témoins.

Des concentrations égales à 5 g/l en sels inorganiques et 10 mg/l en acide tannique n'ont eu aucun effet sur le temps de rétention et la résolution des pics du glyphosate et de l'AMPA.

Toute substance naturellement fluorescente aux longueurs d'onde utilisées et toute substance pouvant réagir avec l'OPA-thiofluor pour former un composé fluorescent dont les temps de rétention correspondent à celui du glyphosate et de l'AMPA peuvent causer une interférence.

3.2. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection obtenue à l'aide de statistiques est de 0,4 µg/l pour le glyphosate et de 1,9 µg/l pour l'AMPA. La limite de détection rapportée pour le glyphosate est de 0,8 µg/l et de 4,0 µg/l pour l'AMPA.

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification est de 1,2 µg/l pour le glyphosate et de 6,2 µg/l pour l'AMPA.

3.4. SENSIBILITÉ

La sensibilité moyenne lors de l'injection de 3 solutions étalons de 200, 100 et 25 µg/l a été de 0,829 unité de surface (µg/l)⁻¹ pour le glyphosate et de 0,205 unité de surface (µg/l)⁻¹ pour l'AMPA.

3.5. FIDÉLITÉ

3.5.1. Répliquabilité

La répliquabilité d'une série de mesures (n = 10) a été de ± 0,087 µg/l pour le glyphosate à une concentration de 2,5 µg/l et de ± 0,44 µg/l pour l'AMPA à une concentration de 10 µg/l.

3.5.2. Répétabilité

La répétabilité d'une série de mesures (n = 10) a été de ± 0,14 µg/l pour le glyphosate à une concentration de 10 µg/l et de ± 0,86 µg/l pour l'AMPA à une concentration de 20 µg/l.

3.6. JUSTESSE

Lors d'essais, (n = 10, valeur attendue de 20,4 µg/l pour le glyphosate et 41 µg/l pour l'AMPA), la justesse d'une série de mesures a été de 99 % pour le glyphosate et de 98 % pour l'AMPA.

3.7. RÉCUPÉRATION

Lors d'essais ($n = 3$), le taux de récupération du glyphosate par cette procédure de dosage sur un échantillon a été de 101,0 % pour une concentration de 10 µg/l et de 98,7 % pour l'AMPA à une concentration de 20 µg/l.

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

Prélever un échantillon représentatif dans un contenant de plastique. Ajouter 100 mg/l de thiosulfate de sodium, soit 250 µl de la solution 10 g/l (pour neutraliser le chlore).

Conserver l'échantillon à environ 4 °C. Le délai de conservation entre le prélèvement et l'analyse ne doit pas excéder 14 jours. Sinon, congeler l'échantillon à environ - 15 °C. Des tests sur l'eau potable ont démontré que l'on peut conserver les échantillons congelés jusqu'à 6 mois avec un recouvrement de 97 %.

5. APPAREILLAGE

Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

5.1. Chromatographe en phase liquide de marque Agilent, modèle 1100, comprenant :

- Dégazeur de marque Agilent, modèle 1100;
- Pompe quaternaire de marque Agilent, modèle 1100;
- Échantillonneur automatique de marque Agilent, modèle 1100, capable d'injecter 100 µl;
- Précolonne chromatographique, « Glyphosate guard column », de Pickering Laboratories, 20 mm × 3,0 mm Di;
- Colonne chromatographique « Potassium cation exchange », de Pickering Laboratories, 150 mm × 4,0 mm Di, particules de 5 µm;
- Système de dérivation postcolonne PCX 5200, de Pickering Laboratories;
- Détecteur de fluorescence de marque Agilent, modèle 1100;
- Un système informatisé de contrôle du chromatographe en phase liquide et de traitement des données.

5.2. Microbalance dont la sensibilité est de 0,01 mg

5.3. Balance analytique dont la sensibilité est de 0,1 mg

5.4. Bain à ultrasons de marque Mettler, modèle ME 4.6

5.5. Bonbonne d'azote avec manomètre

6. RÉACTIFS ET ÉTALONS

Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC ou l'équivalent. Les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., à moins d'indication contraire. L'eau utilisée est de l'eau déminéralisée, traitée sur charbon activé et sur résine « organic free ».

6.1. Méthanol, CH_3OH (CAS n° 67-56-1)

6.2. Thiosulfate de sodium, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 10102-17-7)

6.3. O-phthalaldéhyde, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CHO})_2$ (CAS n° 643-79-8)

6.4. Thiofluor, $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNS}$ (CAS n° 13242-44-9)

6.5. Glyphosate, $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ (CAS n° 1071-83-6)

6.6. Acide aminométhyl phosphonique (AMPA), $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$ (CAS n° 1066-51-9)

6.7. Acide phosphorique, H_3PO_4 (CAS n° 7664-38-2)

6.8. Phosphate de potassium monobasique, KH_2PO_4 (CAS n° 7778-77-0)

6.9. Chlorure de sodium, NaCl (CAS n° 7647-14-5)

6.10. Acide borique, H_3BO_3 (CAS n° 10043-35-3)

6.11. Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS n° 1310-73-2)

6.12. Hydroxyde de potassium, KOH (CAS n° 1310-58-3)

6.13. Eau de javel commerciale, contenant environ 5,25 % d'hypochlorite de sodium

6.14. Solution de thiosulfate de sodium de 100 g/l

Dissoudre 10 g de thiosulfate de sodium dans environ 80 ml d'eau et compléter à 100 ml avec de l'eau.

Les solutions 6.15 à 6.18 sont disponibles chez Pickering Laboratories. La compagnie ne recommande pas de préparer ces solutions.

6.15. Phase mobile

Solution commerciale « Potassium Eluant K 200 ». Selon le fabricant, la solution contient 99,5 % d'eau, 0,1 % de phosphate de potassium monobasique et 0,4 % d'acide phosphorique.

6.16. Solution d'hydroxyde de potassium

Solution commerciale « Potassium Regenerant RG 019 ». Selon le fabricant, cette solution contient 99,07 % d'eau et 0,3 % d'hydroxyde de potassium.

6.17. Solution tampon phosphate

Solution commerciale « Hypochlorite Diluent GA 116 ». Selon le fabricant, cette solution contient 98,8 % d'eau, 1 % de chlorure de sodium, 0,1 % de phosphate de potassium monobasique et 0,1 % d'hydroxyde de sodium.

6.18. Solution tampon avec acide borique

Solution commerciale « o-Phthalaldehyde Diluent GA 104 ». Selon le fabricant, cette solution contient 94,6 % d'eau, 2,4 % d'hydroxyde de potassium et 3 % d'acide borique.

6.19. Solution de travail d'hypochlorite de sodium

Transférer 950 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.17) (Hypochlorite Diluent GA 116) dans une bouteille de réactif du module de dérivation postcolonne. Ajouter 100 µl d'une solution d'hypochlorite de sodium à environ 5 % (eau de javel commerciale) (cf. 6.13).

NOTE – La concentration d'hypochlorite de sodium diminue avec le temps mais cette solution est bonne pendant plusieurs jours (réf. Pickering Laboratories). Elle doit être maintenue sous atmosphère d'azote.

6.20. Solution de travail OPA-Thiofluor

Transférer environ 945 ml de la solution tampon avec acide borique (cf. 6.18) (OPA Diluent GA 104) dans la bouteille de réactif du module de dérivation postcolonne. Conserver 5 ml de la solution dans un becher. Maintenir la bouteille sous atmosphère d'azote. Dans un second becher, dissoudre 100 mg d'OPA dans 10 ml de méthanol et transférer dans la bouteille de réactif. Dans un troisième becher, peser 2 g de thiofluor (cf. 6.4). Lorsque la bouteille est complètement sous atmosphère d'azote (soit après environ 10 minutes), ajouter le 5 ml de la solution tampon aux 2 g de thiofluor. Agiter le becher et transférer dans la bouteille de réactif maintenue sous atmosphère d'azote.

Note – Cette solution est sensible à l'oxydation de l'air et se dégrade avec le temps. Le fait de maintenir la bouteille sous atmosphère d'azote contribue à minimiser ce phénomène. Selon le fabricant, cette solution peut se conserver jusqu'à 2 semaines.

6.21. Solution étalon de glyphosate de 100 mg/l*

Dissoudre 0,0100 g de glyphosate (cf. 6.5) dans environ 80 ml d'eau, passer au bain à ultrasons pendant 2 minutes et compléter à 100 ml avec de l'eau.

Conserver à environ 4 °C dans un contenant opaque.

6.22. Solution étalon d'AMPA de 100 mg/l*

Dissoudre 0,0100 g d'AMPA (cf. 6.6) dans environ 80 ml d'eau, passer au bain à ultrasons pendant 2 minutes et compléter à 100 ml avec de l'eau.

Conserver à environ 4 °C dans un contenant opaque.

6.23. Solution étalon de glyphosate de 10 mg/l

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire à l'aide d'une pipette 10 ml de la solution étalon de glyphosate de 100 mg/l (cf. 6.21) dans environ 80 ml d'eau et compléter au trait de jauge avec de l'eau.

Conserver à 4 °C dans un contenant opaque.

6.24. Solution étalon d'AMPA de 10 mg/l

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire à l'aide d'une pipette 10 ml de la solution étalon d'AMPA (cf. 6.22) de 100 mg/l dans environ 80 ml d'eau et compléter au trait de jauge avec de l'eau.

Conserver à 4 °C dans un contenant opaque.

6.25. Solution étalon combinée de glyphosate et d'AMPA de 25, 100 et 200 µg/l

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, introduire à l'aide de pipettes 0,25, 1 et 2 ml des solutions étalons de glyphosate (cf. 6.23) et d'AMPA de 10 mg/l (cf. 6.24) dans environ 80 ml d'eau et compléter au trait de jauge avec de l'eau.

6.26. Solution étalon combinée de glyphosate et d'AMPA de 1 000 µg/l, pour ajout

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 10 ml de la solution de glyphosate de 10 mg/l (cf. 6.23) et de 10 ml de la solution d'AMPA de 10 mg/l (cf. 6.24) et compléter à 100 ml avec de l'eau.

* Le poids indiqué est celui utilisé pour une substance dont le pourcentage de pureté est égal à 100. Tout écart de pourcentage peut être compensé par une correction du poids indiqué.

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

Pour toute série d'échantillons, les recommandations des *Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en chimie*, DR-12-SCA-01, sont suivies afin de s'assurer d'une fréquence d'insertion adéquate en ce qui concerne les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité (blanc, matériaux de référence, duplicata, etc.). Tous ces éléments d'assurance et de contrôle de la qualité suivent les mêmes étapes du protocole analytique que les échantillons.

7.1. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Le verre a tendance à adsorber le glyphosate et l'AMPA. Il faut donc utiliser uniquement du plastique lors du prélèvement, de la préparation et de la conservation des échantillons.

- Pour le blanc, utiliser de l'eau Nanopure.
- Ajout dans l'échantillon de 10 µg/l

Ajouter 0,1 ml de la solution étalon de glyphosate et d'AMPA de 1 000 µg/l (cf. 6.26) dans 10 ml d'échantillon préalablement filtré sur un filtre de 0,45 µm dans un tube en plastique.
- Ajout dans l'échantillon de 20 µg/l

Ajouter 0,2 ml de la solution étalon de glyphosate et d'AMPA de 1 000 µg/l (cf. 6.26) dans 10 ml d'échantillon préalablement filtré sur un filtre de 0,45 µm dans un tube en plastique.
- Filtrer les échantillons sur un filtre de 0,45 µm, ainsi que les échantillons du contrôle de qualité, le blanc, les ajouts et les solutions étalons.
- Utiliser un vial en polypropylène.

7.2. DOSAGE

PARAMÈTRES DU HPLC

Débit de phase mobile :	0,35 ml/min
Température de la colonne :	Ambiante
Injection :	50 µl
Détecteur :	Excitation à 330 nm Émission à 465 nm

Programmation du HPLC

Temps (min)	Phase mobile (cf. 6.15) %	Hydroxyde de potassium (cf. 6.16) %
0,00	100,0	0,0
15,00	100,0	0,0
15,10	0,0	100,0
17,00	0,0	100,0
17,10	100,0	0,0
32,00	100,0	0,0

- Stop time : 2,00 minutes.
- Dans ces conditions d'analyse, le temps de rétention du glyphosate est d'environ 10,0 minutes et celui de l'AMPA est d'environ 20,2 minutes.

PARAMÈTRES DU PCX 5200

Température de la colonne : 55 °C
Réactif 1 : Hypochlorite de sodium (cf. 6.19)
Débit pompe 1 : 0,30 ml/min
Température réacteur 1 : 36 °C
Réactif 2 : OPA-thiofluor (cf. 6.20)
Débit pompe 2 : 0,30 ml/min
Température réacteur 2 : Température ambiante

- Démarrer la pompe du HPLC et faire circuler l'eau Nanopure pendant environ 10 minutes, puis la phase mobile pendant environ 15 minutes (sans colonne ni précolonne).
- Installer la précolonne et la colonne dans le module et faire circuler la phase mobile.
- Préparer les solutions de travail des réactifs. Maintenir ces bouteilles sous atmosphère d'azote et démarrer la pompe du module de dérivation postcolonne.
- Injecter les solutions étalons combinées de glyphosate et d'AMPA de 25, 100 et 200 µg/l (cf. 6.25), les éléments du contrôle de qualité (MR, ajouts, blanc) et les échantillons.
- À la fin des analyses, faire circuler la solution d'hydroxyde de potassium (cf. 6.16) pendant environ 10 minutes. Rincer les bouteilles de réactifs avec de l'eau et ensuite avec un mélange eau:méthanol 80:20.
- Remplacer la précolonne et la colonne par des unions et les tubes du module.

- Rincer avec eau:méthanol 80:20 pendant au moins 1 heure.

NOTE – Il existe trois procédures d'arrêt du module de dérivation postcolonne (3 jours, 6 jours et 7 jours et plus). Consulter le manuel du fabricant.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les échantillons sont dosés à partir de la courbe d'étalonnage, calculée à partir des étalons.

Les résultats sont exprimés en µg/l de glyphosate et d'AMPA d'après l'équation suivante :

$$D = A \times F$$

où

D : concentration du glyphosate ou d'AMPA contenue dans l'échantillon (µg/l);

A : concentration du glyphosate ou d'AMPA contenue dans l'extrait (µg/l);

F : facteur de dilution, si nécessaire.

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Éléments de contrôle	Critères d'acceptabilité
Matériaux de référence	La valeur obtenue doit être à l'intérieur de l'intervalle de ± 2 écarts types calculé à partir de la moyenne de tous les résultats obtenus pour ces échantillons de contrôle ou être à l'intérieur de l'intervalle « valeur moyenne $\pm 30\%$ ».
Duplicata	Les résultats sont acceptés à un écart de 30 % entre les deux valeurs.
Blanc	Lorsqu'il y a un résultat positif, et jusqu'à concurrence de 10 fois la limite de détection, il sera soustrait du résultat des échantillons.
Ajout dosé	Le résultat doit être à l'intérieur de l'intervalle suivant : valeur attendue $\pm 25\%$ » pour tous les composés.
Courbe d'étalonnage	$r \geq 0,995$.
Solution étalon	Un écart moyen de 25 % est accepté entre les valeurs de la nouvelle et de l'ancienne solution étalon.

10. BIBLIOGRAPHIE

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie*, DR-12-VMC, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, édition courante.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en chimie*, DR-12-SCA-01, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, édition courante.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT DU QUÉBEC, *Règlement sur la qualité l'eau potable*, Loi sur la qualité de l'environnement, L.R.Q., c. Q-2, mai 2001.

PICKERING LABORATORIES, *Post-column analysis of glyphosphate herbicides*, User's manual, Cat. No. 0101-0003-A.

PICKERING LABORATORIES, *PCX 5200 Post-column derivatization instrument*, User's manual, Cat. No. 0101-0001-A.