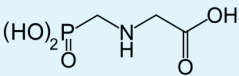


# Le glyphosate dans tous ses états

S. Goscinny et V. Hanot  
Institut Scientifique de Santé Publique  
Unité Pesticides

## Une molécule à succès

Depuis sa première introduction sur le marché en 1974, le glyphosate est aujourd'hui le composé phytosanitaire le plus utilisé dans le monde (un million de tonnes vendu en 2010). Sa popularité croissante est étroitement liée à son efficacité agronomique, son coût faible et, surtout, son profil toxicologique favorable (voir CV). Le principal produit de dégradation du glyphosate est l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) qui possède les mêmes propriétés chimique et toxicologique que le parent. Dans les aliments, l'AMPA n'a été détecté que dans 2% des cas, ce qui explique que la limite maximale en résidus ne concerne que le glyphosate. A difficulté analytique égale, les méthodes pour la détermination du glyphosate sont aussi mises au point pour l'AMPA. Ceci permet d'avoir non seulement plus de données pour l'évaluation des risques mais également, en cas de changement futur de la définition du résidu, d'être prêt sans devoir passer par une phase de développement et de validation complémentaire.

<b>Glyphosate</b>	
<b>Curriculum Vitae</b>	
<b>Propriétés</b>	<b>Chimiques</b> $C_3H_8NO_3P = N$ -(phosphonométhyl)glycine Masse molaire = 169,07 pKa : 0,78-2,29-5,96-10,98 acide organique faible solubilité dans l'eau : 12 g/L à 25°C
<b>Mécanisme</b>	<b>D'action</b> Inhibe l'enzyme 5-enolpyruvoyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) impliquée dans la voie métabolique de l'acide shikimique. Cette voie est absente chez les animaux, ce qui peut expliquer des DL <sub>50</sub> élevées par voie orale : <ul style="list-style-type: none"><li>• Chèvre femelle 3 530 mg/kg</li><li>• Rat femelle 2 686 mg/kg</li></ul>
<b>Utilisation</b>	<b>Agronomique</b> Herbicide systémique à large spectre, ce qui lui confère une grande souplesse d'utilisation : sur tous les types de culture, et pour l'entretien des espaces urbains (espaces verts, jardins, routes, voies ferrées). Utilisation massive avec les cultures génétiquement modifiées
<b>Toxicologie</b>	<b>Dégradation</b> Modérément persistant dans le sol, ½ vie de 20 à 100 jours, il subit une dégradation microbienne qui le métabolise au final en dioxyde de carbone et en composés inorganiques simples. Toutefois, son utilisation massive remet en question le côté « relativement peu toxique » pour l'environnement. <b>Exposition</b> Peu soluble dans les graisses donc réduit les risques de bio-accumulation. Il est absorbé de façon incomplète (15 à 40 %) par voie orale.

## Une « Diva » en chimie analytique

Comparé aux autres herbicides, le glyphosate est le plus difficile à analyser. L'origine de ces difficultés vient de ses propriétés physico-chimiques qui compliquent chaque étape de l'analyse:

### *La préparation de l'échantillon*

Le glyphosate est très polaire, soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques, ce qui limite les possibilités pour son extraction. L'utilisation de l'eau est de ce fait inévitable pour cette étape. Toutefois, dans l'extrait, on retrouve aussi tous les autres composés hydrosolubles de la matrice (sucres, acides aminés, sels...) qui vont interférer avec la détermination du glyphosate. Une étape de purification sur colonne est délicate à cause du caractère amphotère du glyphosate. Une purification de type extraction liquide-liquide est moins difficile en terme de rendement et est, de ce fait, l'option la plus répandue dans la littérature. Toutefois, cette dernière requiert plus de manipulation et allonge le temps d'analyse.

### *Séparation et détection*

Non seulement ces composés sont très polaires et ioniques mais, de surcroît, ils ne possèdent pas de groupes chromophores permettant leur détection par fluorescence ou par absorption dans l'ultra-violet. A cette étape de l'analyse, il faut faire un choix difficile: dériver ou pas?

La technique de dérivation permet l'analyse de composés qui ne peuvent être directement analysés en chromatographie gazeuse (GC) et liquide (LC). Par réaction chimique, on greffe un agent (chromophore) sur une ou plusieurs portions de la molécule cible. Le composé dérivatisé présente des changements dans ses propriétés en faveur de son analyse. Dans le cas du glyphosate, la dérivation lui apporte un chromophore, réduit sa polarité et, en fonction du réactif de dérivation choisi, permet même son analyse en GC. Cette technique n'est pas très appréciée par les analystes car elle exige une optimisation de plusieurs paramètres (température, temps de réaction, concentration et pureté des réactifs, temps de manipulation du laborantin). Si l'on désire s'affranchir de cette lourde étape, il reste des options intéressantes en chromatographie liquide, telles que la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC), la chromatographie d'échange d'ions (IC) ou d'appariement d'ions adaptées aux molécules très polaires et ioniques. Cependant, la robustesse de ces techniques de séparation dépend largement d'une purification poussée ou exige un facteur de dilution de l'extrait élevé et donc un système de détection très sensible. La dérivation ou l'analyse directe présente chacune des avantages et des inconvénients. Le choix d'une technique devra se faire de manière rationnelle si l'on veut aboutir à une méthode rentable. Dans les deux cas, une détection par spectrométrie de masse est possible et recommandée pour éviter les problèmes d'interférences et de sensibilité obtenus avec d'autres détecteurs (UV, électrochimique...)



## Les coulisses d'une méthode

L'analyse du glyphosate dans les céréales est obligatoire depuis le début de l'année 2011 pour tous les laboratoires impliqués dans le plan de contrôle européen. Cette obligation se traduit par la nécessité de développer une méthode d'analyse robuste et validée qui devra facilement s'intégrer dans les analyses de routine du laboratoire. C'est dans ce cadre qu'une méthode d'analyse du glyphosate et de son métabolite l'AMPA a été mise au point à l'ISP en collaboration avec le laboratoire AGES (L'Agence Autrichienne pour la Santé et la Sécurité Alimentaire). Les méthodes d'analyse directes (non dérivatisées) sont peut être très attirantes puisqu'elles ne demandent pas de gérer l'étape de dérivatisation, cependant, elles imposent des changements chromatographiques (phases mobiles, colonnes, temps de mise en fonctionnement) qui ne sont pas nécessairement compatibles avec les analyses de routine. Nous avons favorisé un protocole qui permet de garder les conditions instrumentales des analyses multi-résidus (colonne C18 classique, et phases mobiles eau-méthanol tamponnées avec de l'acétate d'ammonium à un  $\text{pH} \pm 6$ ). C'est donc l'option comprenant une étape de dérivatisation qui a été choisie. Le réactif choisi est le 9-fluorenylméthyl-chloroformate (FMOC) qui permet, grâce à son groupement hydrophobe, de réduire la polarité de la molécule cible et donc d'augmenter sa rétention sur une colonne à phase inverse de type C18 (voir chromatogramme) ainsi que la masse molaire, ce qui va faciliter la détection en MS/MS. Le FMOC va se placer sur la fonction amine en libérant une molécule d'HCl. La réaction doit avoir lieu en milieu basique (on utilise un tampon borate-Na  $\text{pH}=9$ ) pour neutraliser l'acide formé et favoriser le sens de la réaction vers la formation de glyphosate-FMOC. Malheureusement, le FMOC n'est pas spécifique au glyphosate mais réagit avec toutes les fonctions amines et fortement avec l'eau. La concentration en réactif était déterminante afin d'obtenir une méthode robuste, c'est pourquoi la concentration choisie (1 mg/ml) est largement en excès et garantit:

- que le surrogat et les composés cibles ne sont pas en compétition et réagissent avec le FMOC de manière équivalente;
- la réaction avec l'eau et les amines de l'extrait n'est pas délétère pour les composés cibles.

L'excédent de réactif est éliminé par lavage avec du dichlorométhane et le résultat de la réaction est directement filtré avant d'être injecté.

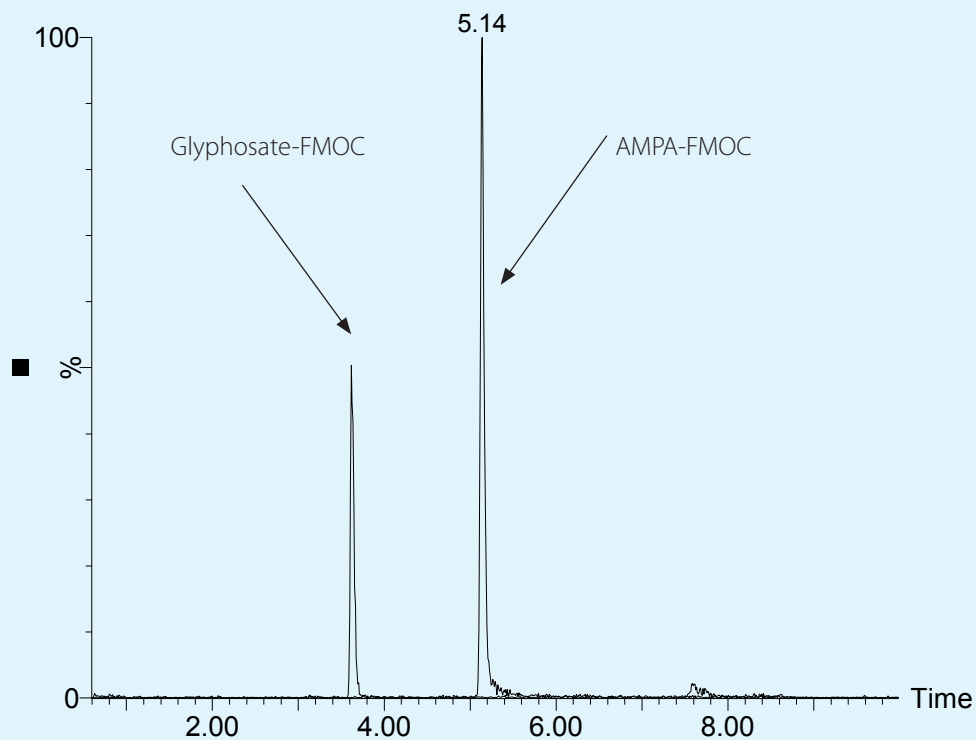


Figure 1: Chromatogramme UPLC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS pour le glyphosate-FMOC et AMPA-FMOC d'une solution de calibration à 100 µg/kg

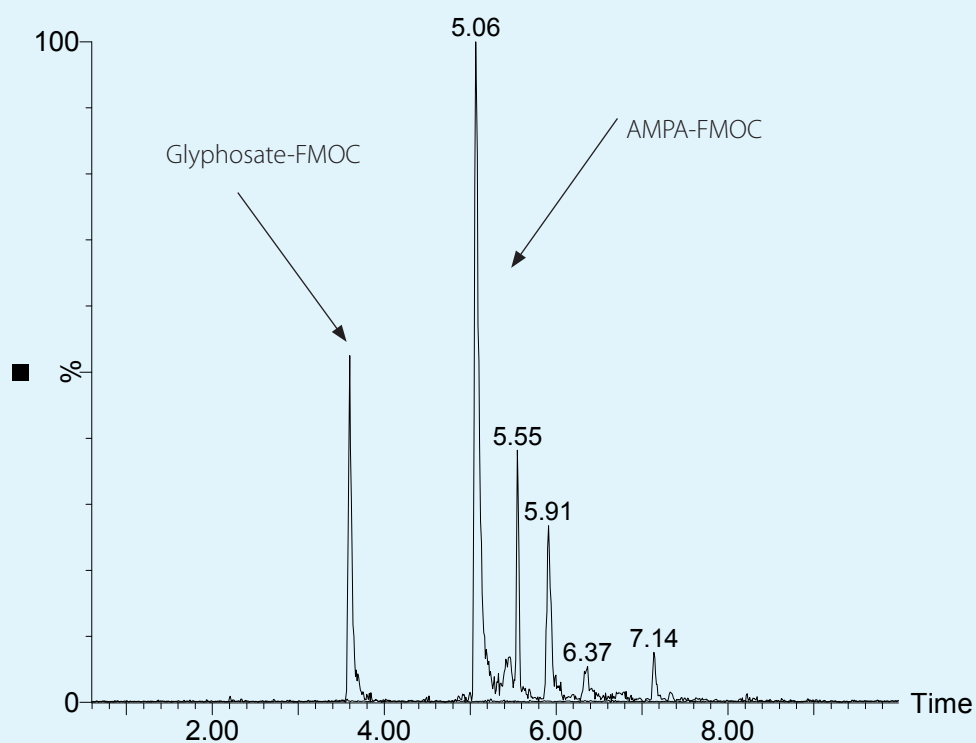


Figure 2: Chromatogramme UPLC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS pour le glyphosate-FMOC et AMPA-FMOC d'un échantillon d'avoine spiké à 10 x LOQ (200 µg/kg)



## Une méthode « sur mesure »

La méthode a été validée en respectant les lignes directrices du document SANCO/10684/2009. Il en résulte que :

- aucun effet de matrice n'est présent, la courbe d'étalonnage est donc préparée en dérivatisant les composés hors matrice et couvre une gamme de concentrations allant de 20 µg/kg à 500 µg/kg;
- les conditions de dérivatisation sont bien adaptées puisqu'on obtient des rendements à la limite de quantification (20 µg/kg) de 101.1 % (RSD de 6.9 %) et 112.9 % (RSD de 11.9 %) pour le glyphosate et l'AMPA respectivement.

La détermination du glyphosate à l'état de trace est incontestablement compliquée. Toutefois, si le choix analytique est judicieux, on arrive à de très bons résultats. Dans notre cas, le choix de quantifier par dilution isotopique a permis d'obtenir de bons rendements apparents sans se soucier des pertes éventuelles lors de l'étape rapide (1 min) d'extraction-purification simultanée. La dérivatisation est un succès puisqu'elle permet d'insérer facilement l'analyse du glyphosate à la suite des analyses de routine sans changement au niveau instrumental, ce qui procure un gain de temps appréciable.

Severine.Goscinny@wiv-isp.be

Vincent.Hanot@wiv-isp.be