



# PROJET DE NORME INTERNATIONALE ISO/DIS 16308

ISO/TC 147/SC 2

Secrétariat: DIN

Début de vote  
2013-02-11

Vote clos le  
2013-05-11

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

## 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

*Water quality — Determination of glyphosate and AMPA — Method using high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometric detection*

ICS 13.060.50

**ITeH STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)  
Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9339019-a2a3-4962-9933-e428696be650/iso-16308-2014>

**Pour accélérer la distribution, le présent document est distribué tel qu'il est parvenu du secrétariat du comité. Le travail de rédaction et de composition de texte sera effectué au Secrétariat central de l'ISO au stade de publication.**

**To expedite distribution, this document is circulated as received from the committee secretariat. ISO Central Secretariat work of editing and text composition will be undertaken at publication stage.**

CE DOCUMENT EST UN PROJET DIFFUSÉ POUR OBSERVATIONS ET APPROBATION. IL EST DONC SUSCEPTIBLE DE MODIFICATION ET NE PEUT ÊTRE CITÉ COMME NORME INTERNATIONALE AVANT SA PUBLICATION EN TANT QUE TELLE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)  
Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9339019-a2a3-4962-9933-e428696be650/iso-16308-2014>



## DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 20##

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Interférences</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>4</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>5</b>
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>5</b>
<b>9</b> <b>Étalonnage</b> .....	<b>8</b>
<b>10</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>11</b>
<b>11</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>11</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Exemples de conditions chromatographiques</b> .....	<b>12</b>
<b>Annexe B</b> (informative) <b>Exemples de chromatogrammes</b> .....	<b>13</b>
<b>Annexe C</b> (informative) <b>Analyse du glufosinate</b> .....	<b>14</b>
<b>Annexe D</b> (informative) <b>Prétraitement d'échantillons d'eau dure</b> .....	<b>18</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>20</b>

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 16308 a été élaborée par le comité technique ISO/TC.147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 2, *Méthodes physiques, chimiques et biochimiques*.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)  
Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c11-2019-a2a3-4962-9933-e428696be650/iso-16308-2019>

## Introduction

Le glyphosate [N-(phosphonométhyl)glycine] est un herbicide à large spectre non sélectif. L'efficacité de ce composé en fait l'herbicide le plus vendu et le plus utilisé au monde depuis son arrivée sur le marché en 1974. Associé à son principal produit de dégradation, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA), le glyphosate est l'une des substances les mieux détectées dans les étendues d'eau de la plupart des pays développés. À noter toutefois que l'AMPA peut également provenir des émanations liées au traitement des eaux usées (par exemple, en raison de l'utilisation de formulations détergentes pour les textiles).

Le glyphosate et l'AMPA appartiennent à la famille des aminophosphonates et possèdent des propriétés physico-chimiques nécessitant la mise en œuvre de méthodes d'analyse complexes pour l'analyse des traces. La difficulté de leur analyse est principalement liée à la haute solubilité du glyphosate et de l'AMPA ainsi qu'à leur fonction chélatante. Pour résoudre ces problèmes, leur dérivaison pré-colonne est effectuée avec du 9-fluorénylméthylchloroformiate (FMOC-Cl) pour former des dérivés moins polaires, ce qui permet une meilleure séparation par chromatographie en phase liquide.

Bien que moins concerné par les réglementations, le glufosinate, qui appartient à la famille des aminophosphonates, peut être dosé simultanément, à condition de prouver l'absence d'interférence avec l'échantillon soumis à l'analyse.

Il s'agit de la norme actuelle en matière de dosage par chromatographie en phase liquide et par détection fluorimétrique ; néanmoins, le dosage par CLHP-ESI-SM/SM peut être bien plus spécifique (identification univoque) et plus sensible (limites de quantification d'environ 30 ng/l). La présente Norme internationale repose sur cette technique d'analyse et répond au besoin croissant des laboratoires impliqués dans le contrôle réglementaire du milieu aquatique qui est désormais couramment équipé de ce type d'appareillage.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9339019-a2a3-4962-9933-e428696be650/iso-16308-2014>

# Qualité de l'eau — Détermination de la teneur en glyphosate et en AMPA — Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection par spectrométrie de masse en tandem

**AVERTISSEMENT** — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente norme n'a pas pour but de traiter de tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente norme 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.

**IMPORTANT** — Il est indispensable que les essais menés selon la présente Norme internationale soient effectués par un personnel adéquatement qualifié.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination de la fraction dissoute de glyphosate et de son principal métabolite, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) dans l'eau potable, l'eau souterraine et l'eau de surface à des concentrations de 0,03 µg/l à 1,5 µg/l. Elle ne s'applique pas à l'eau de mer ou à l'eau salée. Cette méthode peut s'appliquer à d'autres types d'eaux à condition qu'elle soit validée pour chaque cas.

## 2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence (y compris les éventuels amendements) s'applique.

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

ISO 5667-3, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3 : Conservation et manipulation des échantillons d'eau*

ISO 8466-1, *Qualité de l'eau — Étalonnage et évaluation des méthodes d'analyse et estimation des caractères de performance — Partie 1 : Évaluation statistique de la fonction linéaire d'étalonnage*

## 3 Principe

Le glyphosate et l'AMPA (fraction dissoute après filtration) sont dérivés en utilisant du 9-fluorénylméthylchloroformiate (FMOC-Cl) (5.16.1) pour réduire leur polarité et augmenter la rétention des composés par séparation sur une colonne de chromatographie en phase inverse (par exemple, C18).

L'échantillon dérivé est purifié par extraction liquide-liquide puis concentré par extraction en phase solide (SPE).

L'analyse est effectuée en réalisant une chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse en tandem via une source électrospray (CLHP-ESI-SM/SM), en utilisant l'étalonnage avec adaptation matricielle.

**Tableau 1 — Substances concernées**

Nom	Formule	Masse moléculaire (g/mol)	N° CAS
Glyphosate N-(phosphonométhyl)glycine	$C_3H_8NO_5P$	169,1	1071-83-6
AMPA Acide aminométhylphosphonique	$CH_6NO_3P$	111,0	1066-51-9

NOTE Le glufosinate, qui appartient à la famille des aminophosphonates, peut être dosé simultanément, à condition de prouver l'absence d'interférence avec l'échantillon soumis à l'analyse.

#### 4 Interférences

Cette méthode est validée pour l'eau dure contenant jusqu'à 3,2 mmol/l de la somme du calcium et du magnésium. Pour les eaux ayant une plus haute teneur en calcium et en magnésium, il peut être nécessaire d'augmenter la concentration en EDTA sodique (5.15) lors de l'étape de dérivation (voir l'Annexe C).

NOTE Il peut être nécessaire d'inclure l'étape d'acidification décrite dans l'Annexe C même pour certains types d'eaux inférieurs à 3,2 mmol/l de la somme du calcium et du magnésium. Le laboratoire doit vérifier la nécessité de ce mode opératoire pour ses échantillons de routine.

La présence de chlore libre, par exemple dans les eaux traitées, peut provoquer des pertes de glyphosate par oxydation. Par conséquent, du thiosulfate de sodium doit être utilisé (voir l'Article 7).

#### 5 Réactifs

Sauf indication contraire, tous les réactifs et solvants doivent être de pureté suffisante, par exemple, « pour l'analyse des traces ».

##### 5.1 Eau déionisée

5.2 Eau ultra-pure, conforme au grade 1 de l'ISO 3696.

5.3 Azote,  $N_2$ , pureté  $\geq 99,996$  %.

5.4 Détergent de laboratoire, alcalin.

5.5 Thiosulfate de sodium,  $Na_2S_2O_3$ .

5.6 Acétonitrile,  $C_2H_3N$ , qualité CLHP.

5.7 Méthanol,  $CH_4O$ , qualité CLHP.

5.8 Éthanol,  $C_2H_6O$ , 95 %, qualité CLHP.

5.9 Acétate d'éthyle,  $C_4H_8O_2$ , qualité CLHP.



**5.10 Acétate d'ammonium**,  $C_2H_7O_2N$ .

**5.11 Triéthylamine**,  $C_6H_{15}N$ .

**5.12 Ammoniac**,  $NH_3$ , 28 %.

**5.13 Acide formique**,  $CH_2O_2$ .

**5.14 Acide chlorhydrique**,  $HCl$ , 30 %.

**5.15 Acide acétique glacial**,  $C_2H_4O_2$ .

**5.16 Acide éthylènediaminetétracétique (EDTA)**, sel disodique dihydraté,  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ , pureté minimale de 99 %. **5.179-fluorénylméthylchloroformiate**, Fmoc-Cl,  $C_{15}H_{11}ClO_2$ , pureté minimale de 97 %.

Le Fmoc-Cl sert à préparer le réactif de dérivation, la solution Fmoc-Cl, 50 mg/ml, dans de l'acétonitrile (5.6). Cette solution peut être conservée pendant 6 mois à  $-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

**5.18 Substances de référence**, selon le Tableau 1.

- Glyphosate, N-(phosphonométhyl)glycine,  $C_3H_8NO_5P$ , pureté >98 %.
- AMPA, acide aminométhylphosphonique,  $CH_6NO_3P$ , pureté >98 %.
- Étalon d'extraction de glyphosate marqué au  $1,2\text{ }^{13}C_2, \text{}^{15}N$ , pureté >98 %.
- Étalon d'extraction d'AMPA marqué au  $^{13}C, \text{}^{15}N$ , pureté >98 %.

**5.19 Solutions d'étalonnage**

Solutions mères individuelles de glyphosate et d'AMPA, 100 mg/l, préparées dans de l'eau ultra-pure (5.2). Ces solutions peuvent être conservées pendant 1 mois à  $4\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

Solutions mères individuelles de glyphosate marqué ( $1,2\text{ }^{13}C_2, \text{}^{15}N$ ) et d'AMPA marqué ( $^{13}C, \text{}^{15}N$ ), 100 mg/l, préparées dans de l'eau ultra-pure (5.2). Ces solutions peuvent être conservées pendant 1 mois à  $4\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

Solution de travail multistances constituée d'étalons d'extraction : glyphosate marqué ( $1,2\text{ }^{13}C_2, \text{}^{15}N$ ) et AMPA marqué ( $^{13}C, \text{}^{15}N$ ), 20 µg/l, préparée dans de l'eau ultra-pure (5.2). Cette solution peut être conservée pendant 1 mois à  $4\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

NOTE Les solutions mères et les solutions d'étalonnage peuvent être conservées plus longtemps à condition de fournir les justifications adéquates.

**5.20 Tampon acétate de triéthylammonium**, solution de triéthylamine à 0,1 % (5.11) ajustée à pH 9,5 avec de l'acide acétique glacial (5.15) (phase mobile).

**5.21 Tétraborate de sodium**, décahydraté,  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ .

**5.22 Tampon borate de sodium**, 0,05 mol/l ; pH = 9,2.

Dissoudre  $19 \pm 0,1$  g de tétraborate de sodium (5.21), décahydraté, dans 1 l d'eau (5.1). Cette solution peut être conservée pendant environ 1 mois à  $4\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

**5.23 Eau minérale**, contenant moins de 3,2 mmol/l de cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  total), pour préparer l'étalonnage avec adaptation matricielle.

## 6 Appareillage

Le matériel ou l'une de ses parties, qui risque d'entrer en contact avec l'échantillon, doit être exempt(e) de tout résidu susceptible de provoquer des interférences inacceptable dans les blancs.

Des récipients en verre et en plastique peuvent être utilisés pour l'échantillonnage et pour toutes les étapes qui précèdent la dérivation. Des flacons en verre (6.10) et des tubes à essai en verre (6.11) doivent être utilisés après l'étape de dérivation.

### 6.1 Verrerie de laboratoire

**6.2 Flacons en verre, en polyéthylène (PE) ou en polypropylène (PP)**, minimum 50 ml, pour l'échantillonnage.

**6.3 Seringue en verre, en polyéthylène (PE) ou en polypropylène (PP)**, minimum 50 ml, pour la filtration des échantillons.

**6.4 Filtre pour seringue à usage unique**,  $\varnothing$  25 mm, avec membrane hydrophile en cellulose régénérée, 0,45  $\mu$ m.

**6.5 Tubes à fond conique en verre ou en PE ou PP à usage unique**, environ 50 ml, pour la dérivation.

**6.6 Micropipettes**, réglables entre 100  $\mu$ l et 500  $\mu$ l.

**6.7 pH-mètre**

**6.8 Cartouches SPE**, par exemple Oasis HLB<sup>®1)</sup> Waters, 60 mg, 3 ml, ou équivalentes.

**6.9 Dispositif de centrifugation**, permettant d'obtenir une accélération de 6 500 g.

**6.10 Fioles en verre**, adaptées à l'échantillonneur automatique, équipées de bouchons et de septums en polytétrafluoroéthylène (PTFE).

**6.11 Tube à essai en verre**, 15 ml ou moins.

**6.12 Colonne en phase inverse**, par exemple colonne XBridge<sup>®1)</sup> C18 (Waters, 50 mm x 2,1 mm, D.I. 2,5  $\mu$ m) avec précolonne (Waters, 10 mm x 2,1 mm, D.I. 2,5  $\mu$ m).

NOTE Une colonne Gemini NX<sup>®1)</sup> (Phenomenex) ayant des dimensions similaires convient également. D'autres types de colonnes peuvent être utilisés, à condition d'ajuster les conditions de séparation. Il est hautement recommandé d'utiliser une colonne dont la phase stationnaire est résistante aux alcalis (pH = 9 à 9,5).

**6.13 Chromatographe en phase liquide à haute performance (CLHP)**, constituée des éléments suivants :

- un injecteur, manuel ou automatique ;
- une pompe à gradient ;
- un four thermorégulé, pour la colonne CLHP ;

<sup>1)</sup> OASIS HLB<sup>®</sup>, XBridge<sup>®</sup> et Gemini<sup>®</sup> sont des exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ces produits.