
**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**

iTeh STANDARD PREVIEW

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

[SIST ISO 16308:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-211c894c2b74/sist-iso-16308-2018)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-
211c894c2b74/sist-iso-16308-2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-211c894c2b74/sist-iso-16308-2018)



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

SIST ISO 16308:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-211c894c2b74/sist-iso-16308-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2014

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
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Principe	1
4 Interférences	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage	4
7 Échantillonnage	5
8 Mode opératoire	5
8.1 Prétraitement (matières en suspension).....	5
8.2 Séparation et dérivation du chélate.....	5
8.3 Préconcentration.....	6
8.4 Dosage chromatographique.....	7
8.5 Identification et confirmation des analytes.....	8
8.6 Contrôle des témoins à blanc.....	8
9 Étalonnage	8
9.1 Gammes de concentration.....	8
9.2 Étalonnage en matrice.....	9
9.3 Étalonnage avec étalon interne.....	10
10 Expression des résultats	11
11 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Données de performance	12
Annexe B (informative) Exemples de conditions chromatographiques	15
Annexe C (informative) Exemples de chromatogrammes	16
Annexe D (informative) Analyse du glufosinate	17
Annexe E (informative) Prétraitement d'échantillons d'eau dure	21
Bibliographie	23

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

(standards.iteh.ai)

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: Avant-propos — Informations supplémentaires.
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b2191573-b989-45ca-825c-211c894c2b74/sist-iso-16308-2018>

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 2, *Méthodes physiques, chimiques et biochimiques*.

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 plus fréquemment détectées dans les masses d'eau de la plupart des pays développés. À noter toutefois que l'AMPA peut également provenir des rejets liés au traitement des eaux usées (par exemple, en raison de la dégradation des formulations détergentes pour 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 et la détection. La difficulté d'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.

Le glufosinate, un autre membre de la famille des aminophosphonates, est moins concerné par les réglementations et peut être dosé simultanément, à condition de prouver l'absence d'interférence avec l'échantillon soumis à l'analyse.

Il existe actuellement une Norme internationale dédiée au 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 pour le glyphosate et l'AMPA). La présente Norme internationale repose sur cette technique d'analyse et s'adresse aux laboratoires impliqués dans le contrôle réglementaire du milieu aquatique. La majorité de ces laboratoires est désormais équipée de ce type d'appareillage.

[SIST ISO 16308:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-211c894c2b74/sist-iso-16308-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-211c894c2b74/sist-iso-16308-2018>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

SIST ISO 16308:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-211c894c2b74/sist-iso-16308-2018>

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

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale 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 qualifié de manière adéquate.

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.

(standards.iteh.ai)

2 Références normatives

SIST ISO 16308:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-21c89c2b7458/iso-16308-2018>

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 s'applique (y compris les éventuels amendements).

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) (5.17) pour réduire leur polarité et augmenter la rétention des composés lors de leur séparation sur une colonne de chromatographie en phase inverse (par exemple, C18) ainsi que pour l'amélioration de la détection par spectrométrie de masse. Si le spectromètre de masse a une capacité de détection suffisante, il est possible d'omettre l'extraction en phase solide et d'analyser des analytes par injection directe (voir 8.2.1).

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 en matrice.

Tableau 1 — Substances concernées

Nom	Formule	Masse moléculaire g/mol	N° CAS
Glyphosate <i>N</i> -(phosphonométhyl)glycine	C ₃ H ₈ NO ₅ P	169,1	1071-83-6
AMPA Acide aminométhylphosphonique	CH ₆ NO ₃ P	111,0	1066-51-9
a CAS-RN Chemical Abstracts Service Registry Number			

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 (matrice) 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 teneur plus élevée en calcium et en magnésium, il peut être nécessaire d'augmenter la concentration en EDTA disodique (5.16) lors de l'étape de dérivation (voir l'Annexe D).

Il peut s'avérer nécessaire d'inclure l'étape d'acidification décrite dans l'Annexe D 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

SIST ISO 16308:2018
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-211c894a2b74/sist-iso-16308-2018>

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, N₂, pureté ≥99,996 % en fraction volumique.

5.4 Détergent de laboratoire, alcalin.

5.5 Thiosulfate de sodium, Na₂S₂O₃.

5.6 Acétonitrile, C₂H₃N, qualité CLHP.

5.7 Méthanol, CH₄O, qualité CLHP.

5.8 Éthanol, C₂H₆O, 95 % en fraction massique, qualité CLHP.

5.9 Acétate d'éthyle, C₄H₈O₂, qualité CLHP.

5.10 Acétate d'ammonium, C₂H₇O₂N.

5.11 Triéthylamine, C₆H₁₅N.

5.12 Hydroxyde d'ammonium, NH_4OH , 28 % en fraction massique.

5.13 Acide formique, CH_2O_2 .

5.14 Acide chlorhydrique, HCl , 300 g/l.

5.15 Acide acétique glacial, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$.

5.16 Acide éthylènediaminetétracétique (EDTA), sel disodique dihydraté, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pureté minimale de 99 % en fraction massique.

5.17 9-fluorénylméthylchloroformiate (FMOC-Cl), $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}_2$, pureté minimale de 97 % en fraction massique.

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 ± 3 °C.

Pour l'injection directe (8.2.1), utiliser une solution FMOC-Cl de 0,5 mg/ml dans de l'acétonitrile.

5.18 Substances de référence, selon le [Tableau 1](#).

5.18.1 Glyphosate, *N*-(phosphonométhyl)glycine, $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$, pureté >98 % en fraction massique.

5.18.2 AMPA, acide aminométhylphosphonique, $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$, pureté >98 % en fraction massique.

5.18.3 Étalon d'extraction de glyphosate marqué au 1,2- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N , pureté >98 % en fraction massique.

5.18.4 Étalon d'extraction d'AMPA marqué au ^{13}C , ^{15}N , pureté >98 % en fraction massique.

5.19 Solutions d'étalonnage

Solutions mères individuelles de glyphosate (5.18.1) et d'AMPA (5.18.2), 100 mg/l, préparées dans de l'eau ultra-pure (5.2). Ces solutions peuvent être conservées pendant 1 mois à 4 ± 3 °C.

Solutions mères individuelles de glyphosate marqué au 1,2- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N (5.18.3) et d'AMPA marqué au ^{13}C , ^{15}N (5.18.4), 100 mg/l, préparées dans de l'eau ultra-pure (5.2). Ces solutions peuvent être conservées pendant 1 mois à 4 ± 3 °C.

Solution de travail multisubstances constituée d'étalons d'extraction: glyphosate marqué au 1,2- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N et AMPA marqué au ^{13}C , ^{15}N , 20 µg/l, préparées dans de l'eau ultra-pure (5.2). Cette solution peut être conservée pendant 1 mois à 4 ± 3 °C.

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

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, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

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 ± 3 °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 en matrice.

6 Appareillage

Le matériel ou l'une quelconque de ses parties, susceptible 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 courante de laboratoire, ou matériel courant de laboratoire, et en particulier ce qui suit.

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, 25 mm de diamètre, avec membrane hydrophile, 0,45 μm , par exemple de cellulose régénérée,.

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 μl et 500 μl .

6.7 pH-mètre. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b219f373-b989-45ca-825c-211c894c2b74/sist-iso-16308-2018>

6.8 Cartouches SPE, par exemple Oasis HLB^{®1)} 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 polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou de septums en caoutchouc de silicone.

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

6.12 Colonne en phase inverse, par exemple colonne XBridge C₁₈^{®1)} [Waters, 50 mm × 2,1 mm, diamètre intérieur (D.I.) 2,5 μm] avec précolonne (Waters, 10 mm × 2,1 mm, D.I. 2,5 μm).

Il est hautement recommandé d'utiliser une colonne dont la phase stationnaire est résistante aux bases (pH 9 à pH 9,5).

NOTE Une colonne Gemini NX^{®1)} (Phenomenex) ayant des dimensions similaires convient également. D'autres colonnes peuvent être utilisées, à condition d'ajuster les conditions de séparation.

6.13 Chromatographe en phase liquide à haute performance (CLHP), constituée des éléments 6.13.1 à 6.13.5.

6.13.1 Injecteur, manuel ou automatique.

1) Oasis HLB[®], XBridge C₁₈[®] et Gemini[®]-NX 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.

6.13.2 Pompe à gradient.**6.13.3 Four thermorégulé**, pour la colonne CLHP.**6.13.4 Spectromètre de masse**, équipé d'un analyseur quadripôle et d'une source électrospray.**6.13.5 Système d'acquisition et de traitement des données.****7 Échantillonnage**

Si les flacons de prélèvement ne sont pas à usage unique, rincer les flacons d'échantillons (6.2) avec de l'eau déionisée (5.1) puis nettoyer avec un détergent de laboratoire (5.4). Rincer avec de l'eau (5.1) puis avec de l'eau ultra-pure (5.2) et, pour finir, avec de l'éthanol à 95 % (5.8).

Effectuer l'échantillonnage conformément à l'ISO 5667-3 dans ces flacons (6.2) (environ 50 ml).

Pour les échantillons suspectés de contenir du chlore libre, ajouter environ 2 mg de thiosulfate de sodium (5.5) ou de tout autre agent réducteur de chlore pour 100 ml d'échantillon.

Conserver les échantillons conformément à l'ISO 5667-3, à $4\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$, et les prétraiter dans les 24 h.

8 Mode opératoire**8.1 Prétraitement (matières en suspension)**

Placer le filtre (6.4) sur la seringue (6.3). Rincer avec 5 ml d'eau ultra-pure (5.2).

Filtrer l'échantillon (environ 50 ml) et jeter les 5 premiers millilitres. Collecter le filtrat dans un tube à fond conique (6.5).

Conserver les échantillons filtrés à $4\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ pendant une semaine maximum avant l'étape de dérivation.

8.2 Séparation et dérivation du chélate**8.2.1 Généralités**

Adapter l'étape de dérivation au type d'étape analytique qui suit la dérivation:

- avec un spectromètre de masse ayant une capacité de détection suffisante, aucune préconcentration n'est nécessaire et l'échantillon dérivé est directement injecté après la dérivation, conformément au paragraphe 8.2.2;
- sinon, une étape de préconcentration peut être utile pour atteindre la limite de quantification (LOQ) prévue et la dérivation doit être effectuée conformément au paragraphe 8.2.3.

8.2.2 Libération des chélates et dérivation pour l'injection directe

Placer, par exemple, 5 ml de l'échantillon (des quantités d'échantillons différentes requièrent l'utilisation de quantités équivalentes des réactifs suivants) dans une fiole Erlenmeyer de 25 ml équipée d'un bouchon en verre et ajouter le barreau magnétique.

Ajouter 50 µl d'une solution aqueuse multisubstances à 20 µg/l (5.19) constituée de glyphosate marqué au $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ (5.18.3) et d'AMPA marqué au $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ (5.18.4) dans de l'eau ultra-pure (5.2) comme étalon de dérivation.

Ajouter 100 µl d'EDTA disodique (5.16) [solution à 0,1 mol/l dans de l'eau ultra-pure (5.2)], agiter et laisser reposer pendant 10 min dans la fiole fermée.

Ajouter, par exemple, 2 ml du tampon borate de sodium (5.22) à 0,05 mol/l et agiter pendant 30 min à 400 g pour ajuster le pH entre 9,0 et 9,5.

Ajouter 400 µl de solution FMOC-Cl (5.17 pour l'injection directe), agiter pendant 4 h à 400 g et patienter pendant environ 12 h (toute une nuit).

Neutraliser la solution avec de l'acide chlorhydrique à 30 % (5.14).

Filtrer et utiliser pour l'analyse (8.4).

Le volume final de l'échantillon prétraité doit être pris en compte lors du calcul du résultat final.

NOTE La commutation de vanne du débit d'éluat derrière la colonne avant et après le passage des analytes vers le conteneur à déchets est un bon choix pour protéger la source d'ions du détecteur SM/SM contre la contamination.

8.2.3 Séparation et dérivation du chélate avant la préconcentration

Utiliser, par exemple, une micropipette (6.6), une pipette en PP ou en PE, placer un échantillon de 5 ml dans un tube à fond conique en PP (6.5), par exemple.

Ajouter 50 µl d'une solution aqueuse multisubstances à 20 µg/l constituée de glyphosate marqué au $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ (5.18.3) et d'AMPA marqué au $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ (5.18.4) dans de l'eau ultra-pure (5.2) comme étalon de dérivation.

Ajouter 325 µl de tampon borate de sodium (5.22) et agiter.

Ajouter 200 µl d'EDTA disodique (5.16) [solution à 0,1 mol/l dans de l'eau ultra-pure (5.2)], agiter et laisser reposer pendant 5 min. L'ajout d'EDTA permet de libérer le glyphosate et l'AMPA des complexes avec les cations divalents (par exemple, Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Ajouter 4,5 ml d'acétonitrile (5.6). Bien agiter, pendant 1 min, pour homogénéiser (les phases ne doivent pas se séparer pendant cette étape du mode opératoire).

Ajouter 0,6 ml de solution FMOC-Cl (5.17) et agiter à nouveau.

Laisser reposer pendant 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante (20 °C à 25 °C) pour la réaction.

Après la dérivation, tout excédent de FMOC-Cl et tous les sous-produits de réaction (par exemple, le FMOC-OH) sont éliminés pendant la préconcentration (8.3).

En cas d'eau dure, $c(\text{CaCO}_3) > 3$ mmol/l, il est recommandé d'effectuer un prétraitement supplémentaire des échantillons (voir l'Annexe E).

8.3 Préconcentration

8.3.1 Extraction liquide-liquide des dérivés des analytes

Concentrer l'échantillon analytique à environ 5 ml sous un courant d'azote (20 ml/min à 40 ml/min) à température ambiante pour éliminer l'acétonitrile. L'évaporation de l'acétonitrile doit être complète et il convient qu'elle ne dure pas plus de 60 min. Un précipité de FMOC-Cl (excédent de réactif) et de FMOC-OH (sous-produit) peut cristalliser la paroi du tube.

Transférer la solution du tube en plastique vers un tube à essai en verre (6.11). Rincer le tube en plastique avec environ 500 µl d'eau ultra-pure (5.2) et transférer son contenu dans le tube en verre.

Extraire 3 fois avec 1,5 ml d'acétate d'éthyle (5.9). Si nécessaire, centrifuger pendant 20 s à 6 500 g après chaque extraction pour séparer les deux phases. Éliminer le surnageant avec une pipette Pasteur (utiliser une nouvelle pipette pour chaque extraction).