Laboratoire d'Hydrologie et de Géochimie de Strasbourg
UMR 7517 – CNRS , Université de Strasbourg / EOST, ENGEES
1 rue Blessig 67084 Strasbourg Cedex -- tél. 03 68 85 05 59 --
https://www.lhyges.unistra.fr

Analyse isotopique par chromatographie phase-gaz et spectrométrie de masse couplée.

On analyse au laboratoire des polluants environnementaux (essentiellement des pesticides, mais également le cuivre) sur matrices liquide et solide sachant que les fractions relatives d'isotopes stables tracent le parcours du polluant et de multiples mécanismes biologiques et géochimiques œuvrant lors du transport. La thématique générale est donc de suivre et comprendre la dynamique des flux exogènes dans les écosystèmes terrestres.

Echantillonnage

Les échantillons liquides proviennent d'expériences de terrain (pluie, eau de ruissellement, drain, etc…) ou d'expériences en laboratoire (eau d'entrée, eaux intermédiaire et eau de sortie). Les échantillons de terrain sont prélevés par échantillonneur automatique réfrigéré asservi au débit des eaux recueillies (par exemple, 100 ml tous les 3 litres pour une parcelle de vignoble d'environ 1300m^2 et 100 ml tous les 6 m^3 pour le bassin versant entier de 42 hectares).
Les échantillons de laboratoire sont prélevés à fréquence stationnaire (toutes les 2 heures, tous les jours, 1 fois par semaine, etc..).
Pour les échantillonnages sur des matrices solides (sols, généralement), l'extraction des composés d'intérêt peut parfois être assez complexe et nécessiter des protocoles variés. Un exemple d'extraction d'herbicides est reporté en annexe à la fin du chapitre.

Préparation des échantillons

Après prélèvement où les échantillons sont réfrigérés, ils sont amenés au laboratoire où ils sont filtrés dans des unités en téflon si l'élément d'intérêt est le cuivre ou des unités en verre pour les pesticides. Les filtres utilisés sont en acétate de cellulose et de porosité 0,45µm.
Les filtres sont systématiquement gardés en vue de l'analyse de leur contenu.
Si le cuivre doit être analysé, les échantillons sont acidifiés à l'acide nitrique jusqu'à obtenir un pH final de l'ordre de 1 à 2.

Concentration

La concentration des échantillons environnementaux est indispensable. En effet, les pesticides y sont présents à l'état de traces (de l'ordre de quelques µg/L). Pour cela, nous utilisons une unité SPE "Solid Phase Extraction" (Fig. 1) dont le principe de fonctionnement est assez simple et procède selon les étapes suivantes.

Fig. 1. *Appareil : Auto Trace 280 SPE. Cartouches : SolEx C18 (Dionex®, CA, USA)*

- ✓ Une phase de conditionnement d'un système de cartouches (composées de chaines carbonées C18 pour les pesticides ou de résine de polymères hydrophiles et/ou lipophiles pour les composés plus polaires) qui consiste à faire passer un ou des solvants sur les cartouches pour "ouvrir" les chaines carbonées à l'intérieur de la cartouche.
- ✓ Une phase de chargement de l'échantillon : ce dernier est pompé et percole au travers de la cartouche. Tous les composés d'intérêt restent bloqués dans la cartouche et l'eau est évacuée.
- ✓ Une phase de séchage des cartouches : un flux d'azote passe au travers de la cartouche pour éliminer l'eau résiduelle.
- ✓ Une phase d'élution faisant passer un ou plusieurs solvants à l'intérieur de la cartouche avec éventuellement une phase de trempage (le solvant stagne environ une minute dans la cartouche) de manière à désorber tous les composés d'intérêt pour les récupérer dans des flacons.

Ainsi, tous les composés recherchés et présents dans un échantillon aqueux se retrouvent concentrés dans 1 ou 2 ml de solvant.

<u>Mesures des compositions isotopiques</u>

Une fois l'échantillon concentré, on procède à son analyse isotopique via GC-C-IRMS (Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry). Cette technique permet d'obtenir les rapports isotopiques en éléments C, H, O, N, S directement sur la masse de composés représentés dans l'échantillon.

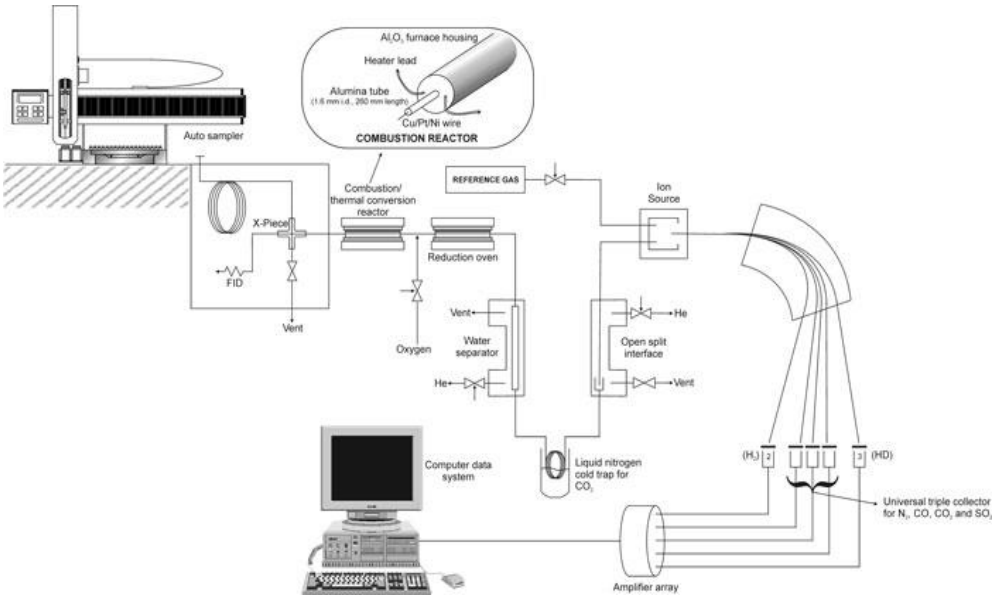

Fig. 2. *Spectromètre de masse à mesures isotopiques et schéma général de fonctionnement*

Cette analyse demande 3 grandes étapes : une séparation chromatographique des molécules, une phase d'oxydation/réduction et enfin une ionisation/détection propre au spectromètre de masse.

- *La séparation chromatographique*

Les molécules sont vaporisées à leur entrée dans un injecteur. Sous forme gazeuse, elles parcourent la longueur de la colonne chromatographique poussées par un flux d'hélium. Suivant, leur masse, leur encombrement stérique, leur affinité avec la phase stationnaire (revêtement intérieur de la colonne plus ou moins polaire) et leur polarité, elles sont plus ou moins retenues et donc se séparent progressivement au sein de la colonne pour en sortir individualisés.

Fig. 3*. Chromatographie gazeuse et intérieur du four de chromatographie*

Afin de mieux séparer les composés et plus rapidement, un gradient de température ascendant (éventuellement par paliers) est également appliqué pendant le parcours des molécules à l'intérieur de la colonne.

- *Phase d'oxydation/réduction*

Une fois les composés séparés, ils passent dans un four d'oxydation, appelé four de combustion (pour analyse isotopique du C, de l'O et de l'N) ou dans un four de réduction, appelé four de pyrolyse (pour analyse isotopique de l'H).

Le four d'oxydation (Fig. 4) permet la transformation de la matière organique en CO_2, H_2O et NO_x. Les composés sont introduits dans ce four à 940°C et la composition du four (CuO, NiO et Pt) est telle que le relargage d'oxygène oxyde complètement les molécules organiques. Les oxydes d'azote sont ensuite réduits en N_2 et l'eau est piégée grâce à une membrane de Nafion. Le CO_2 formé et isolé conserve fidèlement l'abondance isotopique relative en ^{12}C et ^{13}C des molécules organiques originelles.

Si la mesure d'intérêt est celle de l'azote, c'est le CO_2 qui est piégé à la sortie du four par cryogénie (Fig. 5). La mesure des isotopes de l'oxygène est plus compliquée : les rapports isotopiques sont mesurés pour tous les différents ions contenant de l'oxygène (H_2O, CO_2 et NO_x) ; ce qui nécessite des manipulations en plus et la multiplication des sources d'erreur.

Le four de réduction (Fig. 4) est utilisé à 1420°C. Il permet la réduction des composés d'intérêt en dihydrogène ou deutérium-hydrogène. En effet, le CO_2 est également piégé par cryogénie et les oxydes d'azote sont réduits en N_2. Il ne reste donc que de l'eau.

***Fig. 4**. Fours d'oxydation (en haut) et de réduction (en bas)*

- *Ionisation/détection*

L'introduction, dans la source, des composés d'intérêt sous forme gazeuse, et des gaz de référence est gérée par le Conflo IV (Fig. 6). Si besoin, cet appareil permet également la dilution des gaz. Enfin, il permet la correction du "H_3 factor" ; quand on mesure les isotopes de l'hydrogène, des ions H_3^+ se forment dans la source ($H_2^+ + H_2 \rightarrow H_3^+ + H$). Pour faire cette correction, il faut lancer une séquence de linéarité puis le logiciel Isodat (avec le Conflo IV) calcule et corrige ce facteur parasite.

***Fig. 5.** Piège cryogénique à azote liquide pour le CO_2*

Les composés CO_2, H_2O et NO_x sont introduits sous forme gazeuse dans une chambre sous vide, où ils sont bombardés par un faisceau d'électrons (produits par une cathode thermo-ionique et collectés par une trappe ionique). Les ions créés par impact sont canalisés dans un champ magnétique et extraits de la chambre par un courant électrique. Plusieurs systèmes de lentilles aident à la canalisation du flux d'ions qui est accéléré par différence de potentiel jusqu'à l'analyseur à secteur magnétique. Ce dernier permet la séparation spatiale des ions de différents rapports masse sur charge grâce à l'utilisation d'un champ électromagnétique placé perpendiculairement au faisceau d'ions. Ce dispositif est courbé et équipé d'une multi-collection, c'est-à-dire plusieurs détecteurs adjacents d'un même type autorisant l'amplification et la mesure simultanée des intensités de courants d'ions des différents isotopes d'un élément.

***Fig. 6**. Vannes des différentes entrées de gaz sur le Conflo IV*

Mesures faites au laboratoire

Le laboratoire travaille par GC-C-IRMS essentiellement sur les pesticides et plus particulièrement la famille des chloroacétanilides, notamment les herbicides comme le métolachlore, l'acétochlore, l'alachlore, le pendiméthaline et l'oryzalin, ou encore un fongicide comme le métalaxyl.
Ces composés ont été ciblés car ce sont des molécules assez petites, certaines déjà interdites et qui présentent des axes de symétrie ou des carbones asymétriques (et généralement, un des deux énantiomères est inactif).
L'analyse isotopique doit permettre d'élucider quelques questions sur les mécanismes de dégradation, par exemple, la photodégradation n'entraine pas d'enrichissement isotopique en éléments lourds. La biodégradation par contre doit engendrer des enrichissements et il faut savoir sur quels atomes, quelles sont les bactéries responsables, quels sont les temps caractéristiques de fractionnement, etc. En raison de l'arrivée assez récente du GC-C-IRMS au laboratoire, l'analyse est menée sur le fractionnement isotopique du carbone. On espère rapidement pouvoir regarder les isotopes stables de l'hydrogène, l'azote, l'oxygène mais également du soufre.

Les mesures sont assez précises et doivent être conduites avec rigueur. Avant chaque analyse, il faut stabiliser l'appareil et faire les "on/off tests". On enchaine plusieurs passages au spectromètre d'un gaz de référence avec des cycles courts (la vanne reste ouverte 20 secondes, se referment 20 ou 30 secondes, se ré-ouvre, etc… Après une trentaine d'ouverture-fermeture, les mesures isotopiques doivent être stables avec un écart-type inférieur à 0,06‰ pour le carbone (et 0,1‰ pour l'oxygène). Ensuite il faut tester la linéarité, à savoir que les valeurs isotopiques (δ13C) doivent être stables dans une gamme large de concentrations (généralement mesurées en intensité de courant d'ions et prises entre 100 et 15000mV) et doivent donc rester dans l'intervalle de confiance. Pour cela, on trace les

valeurs d'intensité (en volts) en fonction des valeurs de δ13C. On trace la droite de tendance et le coefficient directeur de cette droite doit être inférieur en valeur absolue à 0,06‰. Pour que les mesures soient validées, on analyse régulièrement deux standards internationaux (IAEA-600 caféine et l'acide L-glutamique USGS40 et USGS41). Les valeurs de δ13C de ce composé sont standardisées et permettent de vérifier l'étalonnage des lignes de mesure, leur éventuelle dérive ou des aléas analytiques à l'origine d'incertitudes de mesure.

Innovation, position nationale et internationale

Au niveau mondial, l'analyse isotopique composé-spécifique (AICS) est principalement utilisée pour l'étude de processus spécifiques des cycles biogéochimiques de molécules organiques d'origine végétale ou animale, l'investigation ou encore l'évaluation des fraudes. Une autre utilisation possible mais beaucoup moins fréquente de l'AICS est l'étude du transport et la transformation dans l'environnement de polluant tels que les résidus de pesticides et leurs produits de dégradation. A ce jour, seuls quelques groupes de recherche (<10) utilisent l'AICS pour la compréhension et la prédiction du transport et du comportement environnemental de contaminants émergeants. Les études effectuées au LHyGeS intègrent notamment une caractérisation couplant études de laboratoire et de terrain pour générer des séries de donnée fiables alimentant notamment des approches de modélisation. Le chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse de ratio isotopique (GC-C-IRMS) est principalement dédié à l'étude de contaminants organiques dans les hydrosystèmes permettant :

- ✓ L'étude des mécanismes réactionnels de transfert et de transformation biomoléculaire de polluant.
- ✓ L'étude de l'atténuation naturelle de contaminants dans l'environnement, étude des voies de transformation biotiques et abiotiques.
- ✓ L'étude de l'incorporation et de la transformation de molécules isotopiquement marquées par les organismes vivants (micro-organismes, plantes, en particulier) et de leur suivi dans les chaînes alimentaires.

Les travaux en cours au LHyGeS visent en particulier à :

- ✓ Renforcer les travaux structurants en cours sur la caractérisation par couplage de méthodes isotopiques du transport réactif de pesticides et de métaux lourds dans les agro- et hydro-systèmes.
- ✓ Produire des séries de données spatiales et temporelles correspondant à des expériences de terrain et de laboratoire sur le transport réactif de pesticides et d'autres polluants organiques afin de caler et de valider des outils de diagnostic et de modélisation.

Références

Elsayed O, Maillard E, Vuilleumier S, Nijenhuis I, Richnow HH, Imfeld G, 2014. Using compound specific isotope analysis to assess the degradation of chloroacetanilide herbicides in lab-scale wetlands. Chemosphere, 99: 89-95.
L'étude illustre le développement d'une méthode d'analyse des isotopes stable du carbone de molécule herbicides de la famille des chloroacétanilides pour évaluer leur biodégradation dans les systèmes environnementaux. La méthode développée est utilisée concrètement pour l'évaluation de la biodégradation des herbicides dans des milieux humides de laboratoire et a permis de souligner la persistance relative du métolachlore (commercialisé) par rapport à l'alachlore et à l'acétochlore (ces deux substances ayant été retirées du marché).

Imfeld G, Kopinke FD, Fischer A, Richnow H, 2014. Carbon and hydrogen isotope fractionation of benzene and toluene during hydrophobic sorption in multistep batch experiments. Chemosphere, 107: 454-461. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.063.
L'utilisation de l'AICS pour évaluer la dégradation de polluant dans l'environnement suppose que les processus non-destructif (sorption, dilution, volatilisation) ne sont pas associés à un fractionnement isotopique significatif, contrairement aux processus destructifs (dégradation abiotique ou biotique). Cette étude expérimentale montre que plusieurs étapes de sorption sont nécessaires pour générer un fractionnement isotopique significatif pour le carbone et l'hydrogène de molécules hydrophobes du groupe des BTEX. L'étude souligne néanmoins que l'interaction entre certains groupes fonctionnels de la matière organique du sol (-OH) et les molécules de BTEX peut générer un fractionnement isotopique significatif.

Annexe

Extraction of chloroacetanilide herbicides from soil, suspended solids and sediment samples

You need:
- 10 ml syringe
- Becker to rinse elements
- 30 ml conical glass tubes
- 15 ml conical glass tubes
- 50 ml glass syringes
- PTFE filters for syringes
- 100 ml brown glass vials
- 100 or 250 ml evaporating flasks.

1. Make sure that the dry weigh of the analyzed soil and OC content have been measured before you start the extraction. Make a list of the samples with clear labels.

2. Weigh about 5 g of wet soil in a previously weighted 30 mL glass tubes and note the exact weigh. The glass tubes are in the second cupboard, with GC consumers goods.
3. For a calibration curve or optimization of extraction method, spike a known amount of the targeted chloroacetanilide(s) in each vial qs for 500 µL with Elix water. Cover the vial with an aluminium foil to protect from light and prevent from contamination. Incubate overnight at 20°C. Note everything you do in your lab book.
4. Prepare a solution of 60/40 v:v ACN/H_2O (Elix water) in 1 liter brown vial. The solvents are in the cupboard under the stairs.
5. Switch on the drying oven at 115°C. (Press "SET" and choose your temperature with the arrows and repress "SET").
6. Wash your 10 ml syringe three times in a first Becker, two times in the second and one time in the third with pure ethanol. Add exactly 4 mL of the 60/40 v:v ACN/H_2O (Elix water) in the tubes. Do not forget to put your waste in the appropriate bin.
7. Vortex for 1 min each conical glass tube.
8. Incubate 30 min at 115°C.
9. Cool at room temperature for about 30 min, at lab temperature.
10. Vortex 1 min.
11. Centrifuge at 3500 rpm for 10 min. (Switch on the centrifuge; press "Select" and choose program 1 with the wheel and press "Start". OK will appear. Then close the lid and repress "Start"). Do not forget to put Parafilm around each conical tube to avoid breaking the tubes and equilibrate carefully the centrifuge.
12. Take out very carefully each tube and take off Parafilm.
13. With a 10 ml clean pipette (washed three times in the first Becker with ethanol, then two times in a second Becker with ethanol, then one time in the last Becker with ethanol) and tip for solvents, carefully transfer the supernatant avoiding touching the pellet in a (pure ethanol) cleaned 15 mL vial (for further centrifugation). Be careful not to shake or shock the tubes. Between each sample, clean your syringe three times, two times, and one time in three different ethanol Becker.
14. Procedure through steps 5 to 10 a second time and transfer carefully the supernatant in the same vial in which the first supernatant was poured. When you put the mix solvent (ACN/H2O; step 4) add 0,1 % of H_3PO_4. Be careful because 4 µl is a very small volume so put your tube very close to the acid, not to lose one drop. Clean three times your syringe between each sample with ethanol and/or 60/40 v/v ACN/H_2O Elix water.
15. Centrifuge the collected 8 ml supernatant at 3500 rpm for 10 min with the program 1, and put green adaptors in the centrifuge. No Parafilm is needed because of adaptors.
16. Filtration (PTFE) is performed with 0,2 µm VWR filters (they are in the second cupboard with GC consumers' goods) and with syringes (50 ml glass syringes SAMCO or RUTHE tidy in the third drawer called "syringes"); filtrate is collected in a 100 ml cleaned solvent vial (cleaned up upstairs in the fifth cupboard). Refill the syringe with 20 ml of ACN (100%) to rinse it and rinse conical tubes too.
17. Rotovap the filtrate with bath at 45°C, at 250 mBars, and rotation position n°5 until reaching about 1 or 2 mL (water). When you put your supernatant in the evaporation flask, add 2 or 3 ml of ACN for taking all from the 100 ml vial. Use 100 or 250 ml evaporating flasks; they are with all glasses, in the

glass cupboard. Clean the glass connector between the evaporation vial and Rotovap with 70% ethanol between each sample.

18. Clean the evaporating flask with 50 ml of Elix water, in two times, for collecting all evaporate and add it into the air dried 100 ml vial.

19. Store the solution at 4°C and proceed to SPE extraction within 24 hours. Use method 18 with C18 cartridges and see the separate SPE protocol if needed.

20. Store the extract in freezer (-20°C).