HAL
open science

Dosage de la morpholine dans les eaux douces par LC-MS/MS.

Margot Begue, Gaëlle Riou, Jules Taberly, Cyril Forestier, Pierre-Hugues Pitel, Valérie Bouchart

To cite this version:

Margot Begue, Gaëlle Riou, Jules Taberly, Cyril Forestier, Pierre-Hugues Pitel, et al.. Dosage de la morpholine dans les eaux douces par LC-MS/MS.. Congrès SEP 2019 13 ème congrès francophone sur les sciences séparatives et les couplages de l'AFSEP., Mar 2019, Paris, France. hal-03429052

HAL Id: hal-03429052

https://normandie-univ.hal.science/hal-03429052v1

Submitted on 15 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

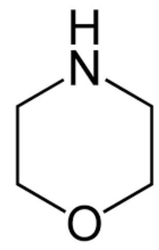
Dosage de la morpholine dans les eaux douces par LC-MS/MS

LABÉO
Pôle d'analyses et de recherche de Normandie
www.laboratoire-labeo.fr

Margot BEGUE [1], Gaëlle RIOU [1], Jules TABERLY [1], Cyril FORESTIER [1], Pierre-Hugues PITEL [1], Valérie BOUCHART [1,2]

[1] LABÉO, 1 route de Rosel, Saint Contest, 14053, Caen Cedex, France – valerie.bouchart@laboratoire-labeo.fr

[2] INSERM U1086 « ANTICIPE »- Université de Caen Normandie, UFR Santé et SF 4206 ICORE, Centre François Baclesse - Avenue du général Harris 14076 Caen cedex 5, France



Structure de la morpholine.

Contexte

La morpholine est une molécule utilisée dans l'industrie comme intermédiaire du caoutchouc et comme agent anticorrosion dans les systèmes de refroidissement pharmaceutique. La N-Nitrosomorpholine est un dérivé de la morpholine, qui se transforme naturellement en présence de nitrites. En 2012, une évaluation des risques sanitaires liés à la présence de N-Nitrosomorpholine dans les eaux destinées à la consommation humaine a été demandée à l'ANSES[1] par la Direction générale de la santé. Le suivi de ces deux molécules dans les eaux superficielles et destinées à la consommation humaine est mis en place par les autorités sanitaires dans les zones potentiellement contaminées. Peu de méthodes sont décrites dans la littérature pour doser la morpholine dans les eaux douces.

Objectif

L'objectif est de développer une méthode d'extraction et d'analyse atteignant une limite de quantification de 0,01µg/L dans l'eau. Cette méthode sera validée selon la NF T90-210, et répondra aux critères de la norme NF XP T90-214.

Méthodes analytiques testées

Colonne Waters BEH C18 1,7µm
150x2,1mm débit 0,45mL/min

Tableau 1 : Gradient de la pompe binaire sur colonne Waters BEH C18

Temps	% EUP + 0,01% Acide formique	% ACN + 0,01% Acide formique
0	97	3
3	97	3
6	10	90
10	10	90
12	97	3

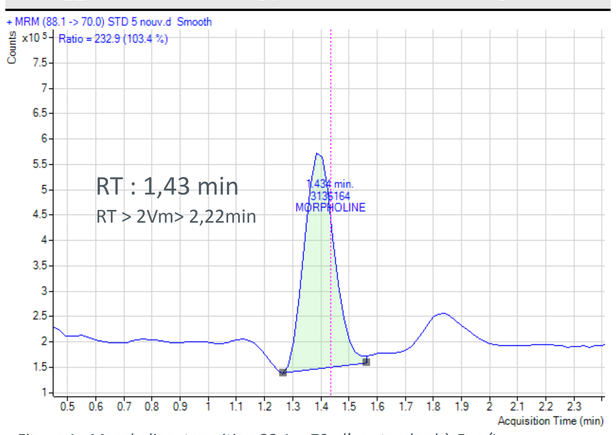


Figure 1 : Morpholine, transition 88,1-> 70, d'un standard à 5µg/L

Colonne Agilent Aqueous C18 1,7µm
150x2,1mm, débit 0,35mL/min

Tableau 2 : Gradient de la pompe binaire sur colonne Agilent Aqueous C18

Temps	% EUP + 0,01% Acide formique	% ACN + 0,01% Acide formique
0	97	3
3	97	3
6	10	90
10	10	90
12	97	3

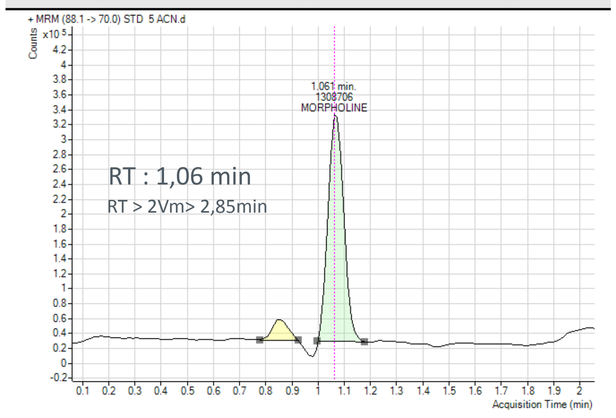


Figure 2 : Morpholine, transition 88,1-> 70, d'un standard à 5µg/L

Le critère de temps de rétention de la norme NF XP T90-214 est non respecté.

Colonne Waters BEH Amide 1,7µm
100x2,1mm débit 0,2mL/min

Tableau 3 : Gradient de la pompe binaire sur colonne Waters BEH Amide

Temps	% EUP à 5mM Bicarbonate ammonium	% ACN
0	10	90
15	40	60
20	40	60
35	10	90

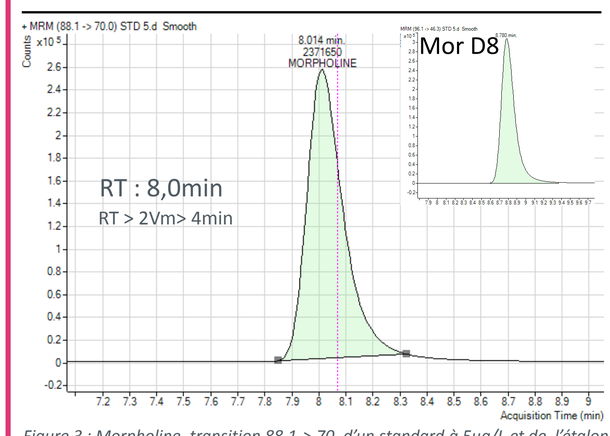


Figure 3 : Morpholine, transition 88,1-> 70, d'un standard à 5µg/L et de l'étalon interne morpholine D8 (MorD8) 96,1 -> 46,3

Paramètres chromatographiques retenus

LC-MS/MS Agilent 6495B
utilisée en mode ESI +

Paramètres MS/MS
Gaz : 300°C à 10L/min
Sheat Gaz : 300°C à 11L/min
Capillaire : 4000V
Nébuliseur : 40 psi
Température colonne : 40°C

Acquisition
Morpholine : 88,1 -> 70,0; 88,1-> 44,0
Morpholine D8 : 96,1 -> 46,3; 96,1-> 49,3

Méthodes d'extractions testées

Cartouche SPE : SUPELCLEAN™ ENVI-Carb ™, 6 cc, 500mg

Solvant d'élution :
- 5mL ACN/MeOH 50:50
- 5mL ACN/MeOH 50:50
- 10mL Acétone

Évaporation jusqu'à 100µL sous flux d'azote

Reprise dans 50µL ACN + 450µL EUP, dilution au 5ème en EUP/ACN 90:10 puis injection

Rendement d'extraction : 0%
→ La molécule n'est pas retenue sur cette phase.

Cartouche SPE : Waters Oasis ® HLB, 6cc, 200mg

Solvant d'élution :
- 6mL MeOH 10mM Acétate d'ammonium
- 6mL MeOH 10mM Acétate d'ammonium

Évaporation jusqu'à 100µL sous flux d'azote

Reprise dans 50µL ACN + 450µL EUP, dilution au 5ème en EUP/ACN 90:10 puis injection

Rendement d'extraction : 25%
→ Le rendement obtenu n'est pas satisfaisant.

Cartouche SPE : Waters OASIS ® MCX, 6cc, 150mg

Solvant d'élution :
- 2mL MeOH
- 2mL MeOH +5% NH_4OH

Évaporation jusqu'à 400µL sous flux d'azote

Reprise dans 450µL ACN + 50µL EUP, dilution au 5ème en EUP/ACN 10:90 puis injection

Rendement d'extraction : 100%
→ **Cette méthode d'extraction est retenue.**

Système d'extraction :
AutoTrace ™ SPE Workstation

Volume échantillon 500mL
Étalon interne : Morpholine D8 : 125µL à 200µg/L

Validation de la méthode selon la norme NF T90-210

- **Étude de linéarité** : Gamme d'étalonnage avec référence synthétique, étalonnage interne en dilution isotopique. **2**-5-10-**20**-50-**80**-100µg/L.
- **Détermination des limites de quantification** (LQ) LQ : 0,01µg/L; LD : 0,004µg/L.
- **Étude d'Exactitude sur eaux de captage :**

Niveaux	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Valeur de référence	0.010	0.10	0.4
Ecart Maximal Acceptable en %	60%	30%	30%
Fidélité			
Écart-type de répétabilité ($s_{répét}$)	0.001	0.002	0.017
Écart-type de fidélité (s_{FI})	0.002	0.011	0.028
Coefficient de variation de répétabilité ($CV_{répét}$)	9.22%	1.62%	4.13%
Coefficient de variation de fidélité (CV_{FI})	17.07%	11.41%	6.98%
Estimation des incetitudes avec la norme NF ISO 11352	36.5%	25.7%	15.1%
Justesse			
Valeur moyenne estimée	0.010097673	0.096485312	0.404618679
Biais (%)	1.0%	-3.5%	1.2%
Conclusion sur le biais	négligeable	négligeable	négligeable
Etude de l'exactitude avec la T90-210			
Limite haute d'acceptabilité	0.0160	0.1300	0.5200
Limite haute de tolérance	0.0135	0.1185	0.4611
Limite basse de tolérance	0.0066	0.0745	0.3482
Limite basse d'acceptabilité	0.0040	0.0700	0.2800
Conclusion : l'exactitude de la méthode est	**vérifiée**	**vérifiée**	**vérifiée**

Objectifs de performance : Ecart Maximal Acceptable 60% à la LQ et 30 % niveaux 2 et 3

Figure 4 : Profil d'exactitude de la morpholine en µg/L

- **Étude de rendement**:

Molécule	Rendement d'extraction LQ	Rendement d'extraction niveau 2	Rendement d'extraction niveau 3	Rendement moyen	Coefficient Variation critère <20%
Morpholine	101%	96,5%	101,2%	99,6%	2,67%

Conclusion :
La morpholine est conforme aux objectifs de coefficient de variation entre les 3 niveaux étudiés.

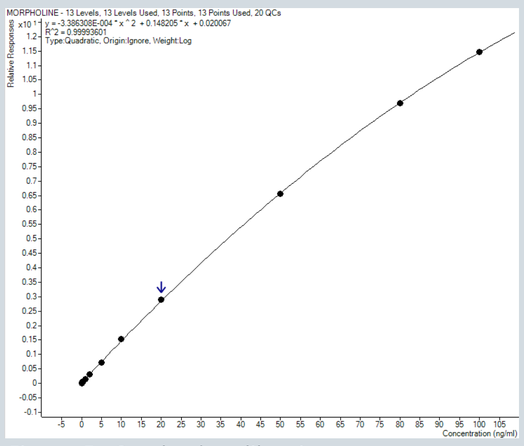


Figure 5 : Courbe de calibration.

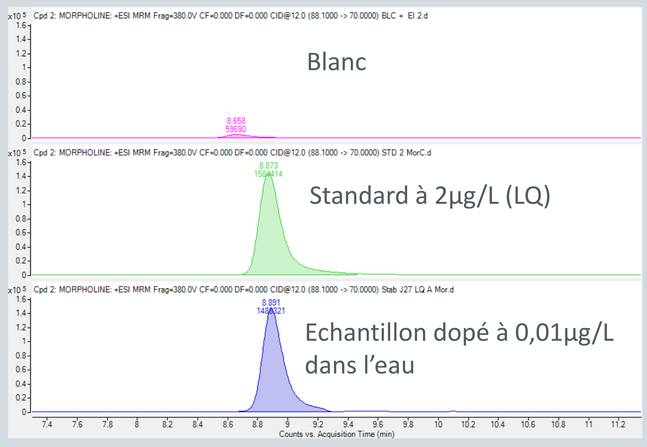


Figure 6 : Morpholine transition 88,1 -> 70 dans une même série.

- **Étude de robustesse en eaux douces** :

6 eaux de captage — 6 eaux de distribution — 6 eaux superficielles

2 eaux dopées à la LQ (0,010µg/L) , aux niveaux 2 (0,1 µg/L) et 3 (0,4µg/L)

- **Étude de justesse :**
  - utilisation d'une référence croisée d'un autre fournisseur.
  - pas de circuit EIL pour cette molécule.
  - organisation d'un essai croisé avec un autre laboratoire : envoi d'un échantillon dopé à 0.1µg/L de morpholine : Biais -2.1%, l'étude est **conforme.**
- **Étude de stabilité :**
  - La morpholine dans l'échantillon d'eau est stable pendant 27 jours.

Conclusion

La méthode est validée selon la norme NF T90-210 et accréditée en portée flexible selon le programme COFRAC LAB GTA 05.

[1] ANSES Saisine n°2012-SA-0188

Flashez et contactez
Valérie Bouchart
valerie.bouchart@laboratoire-labeo.fr

13ème Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP
25-28 MARS 2019 PARIS