



Analyse quantitative de l'urée dans l'eau par HPLC-APCI-MS-MS et HPLC-ES-MS-MS

Hédi Abidi*, doctorant, Jean-Louis Gass*, ingénieur et Marie Florence Grenier-Loustalot*, directeur de recherche CNRS et directeur du SCA (Service Central d'Analyses)

Summary Quantitative analysis of urea in water by two chromatographic methods (HPLC/APCI/MS/MS and HPLC/ES/MS/MS) Two simple and rapid quantitative methods for urea concentration measurement in water has been developed by using two techniques online HPLC/APCI/MS/MS (high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation/tandem mass spectrometry) and HPLC/ES/MS/MS (high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation/tandem mass spectrometry), both in positive ion mode. These methods allow the specific quantitative determination of urea in different kinds of water without any prior sample preparation. The limit of sensitivity of the two techniques was about 50 ppb and the calibration proved to be linear in the range 50 ppb up to 10 ppm. This system was applied to determine the concentration of urea present in the water of swimming pool.

Mots-clés Urée, HPLC-ES-MS-MS, HPLC-APCI-MS-MS, eau de piscine.
Key-words Urea, HPLC/ES/MS/MS, HPLC/APCI/MS/MS, swimming pool water.

Généralités

La concentration en urée dans des eaux de différentes origines (mers, nappes phréatiques, piscines, lacs) peut varier de quelques ppb à quelques ppm selon l'emplacement géographique, la faune, la flore et les diverses sources polluantes de l'environnement. L'urée est connue comme étant un agent de développement du phytoplancton dans les zones côtières et les eaux océaniques [1-2]. Dans le cadre de travaux développés au laboratoire sur l'analyse de traces et d'ultratracés de micropolluants organiques dans des matrices complexes, nous avons développé une technique d'analyse simple et rapide qui permet de doser l'urée dans l'eau, présente à l'état de traces, et en milieux plus ou moins chargés en sels et/ou autres composés organiques. Cet article décrit une nouvelle approche de ce type d'analyse et présente une application : la détermination *in situ* de la concentration en urée dans des eaux de piscine, par dosage direct, sans aucune préparation de l'échantillon.

Deux techniques de dosage sont décrites [1-3] dans la littérature. La première repose sur le dosage colorimétrique de l'urée en présence de diacétylmonoxime à 520 nm [1-3]. Cette technique est utilisée pour le dosage de l'urée dans les plasmas sanguins [3] ainsi qu'en milieu marin [1-2]. Le seuil de détection est de l'ordre de la dizaine de ppb. Cette technique présente l'avantage de mettre en œuvre des moyens analytiques simples mais souffre de quelques inconvénients, notamment une reproductibilité

difficile à obtenir [1], une mise en œuvre assez laborieuse et des temps d'analyse plutôt longs (plus d'une demi-journée).

La deuxième technique est basée sur le traitement de l'échantillon par l'uréase [4-6]. En présence de cette enzyme, l'urée subit une décomposition enzymatique conduisant à la formation d'ions ammonium qui sont dosés par une électrode spécifique [6]. Cette technique est plus élaborée mais présente de nombreux inconvénients [2-3] dus aux réactions chimiques mises en jeu, en particulier : l'hydrolyse de l'urée qui peut être partielle, induisant une erreur de dosage par défaut [2] et l'hydrolyse d'autres composés azotés par l'uréase, conduisant à une erreur par excès lors de la quantification de l'ammoniaque [1].

A l'heure actuelle, l'utilisation de techniques chromatographiques couplées à des détecteurs type spectrométrie de masse doit permettre d'aborder ce dosage de manière plus rationnelle et sensible. En effet, depuis quelques années [7], l'utilisation de couplage HPLC-MS jouit d'un essor considérable notamment dans les domaines de la pharmacologie et de l'environnement [7-8]. La synthèse et la découverte de molécules peu volatiles et très polaires ont induit le développement de techniques de séparation en milieu liquide, notamment la chromatographie liquide haute pression. Cette technique autorise, à partir de colonnes spécifiques, l'analyse directe de certaines familles de composés, sans traitement préalable de l'échantillon, là où l'analyse par chromatographie gazeuse nécessitait une

* Unité de Service et de Recherche, CNRS 059, BP 22, 69390 Vernaison. Tél. : 04.78.02.22.00. Fax : 04.78.02.41.74.
E-mail : mf.grenier-loustalot@sca.cnrs.fr



dérivation de ces molécules pour les rendre volatiles.

Au cours de nos essais, une séparation optimale a été obtenue sur colonne greffée C_{18} , et pour ce qui concerne le spectromètre de masse, deux méthodes d'ionisation ont été utilisées : ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et ionisation par électrospray (ES). Après avoir mis au point les méthodes de séparation, de détection, et de quantification sur des échantillons témoins modèles, nous avons appliqué cette méthode à la détermination du taux d'urée présent dans des eaux de piscine.

Matériels et méthodes

Appareillage et conditions analytiques

• HPLC

La séparation a été effectuée sur un chromatographe HPLC Alliance 2690 (Waters) équipé d'une pompe quaternaire de type seringue avec passeur automatique d'échantillons, à partir d'une colonne chromatographique (Nucleosil 100 Å C_{18} 150*2mm GLT 3 μ , commercialisée par Colochrom) et une phase mobile (eau désionisée et acidifiée à 0,1 % d'acide formique) à 0,2 mL/min.

• MS

Le détecteur utilisé est un spectromètre de masse Quattro LC-Micromass, équipé de triples quadripôles permettant une analyse MS-MS. Cet appareil fonctionne avec une interface soit de type électrospray, soit de type APCI en mode d'ionisation positive.

Les conditions analytiques sont les suivantes :

- en électrospray : température de la source 130 °C, température du gaz de désolvatation 250 °C, débit du gaz de nébulisation 80 L/h, tension capillaire 3,5 kV.
- en APCI : température de la source 130 °C, température du gaz de désolvatation 350 °C, débit du gaz de nébulisation 600 L/h, tension de décharge corona 3,5 kV.

La pression du gaz vecteur, N_2 , est de 90 psi.

La tension appliquée sur le cône d'échantillonnage permet de guider les ions formés vers le premier analyseur. Cette tension est fixée à 30 volts.

Le gaz de collision de l'ion pseudomoléculaire de l'urée $(M+H)^+$ est l'argon. Le vide dans la chambre de collision est de 10^{-3} Torr. L'énergie de collision est de 15 eV. L'acquisition est effectuée en mode « multiple reaction monitoring » (MRM) sur la transition m/z 61 \rightarrow m/z 44 caractéristique de l'urée. En effet, l'urée ionisée en mode positif

(en APCI ou en électrospray) induit la formation d'un ion pseudo-moléculaire $([NH_2-CO-NH_3]^+, m/z = 61)$. Cet ion est sélectionné au moyen du premier analyseur et subit une deuxième ionisation par collision avec un gaz neutre, l'argon, qui conduit à un ion fils $m/z = 44 [NH_2-CO^+]$. Le courant ionique détecté peut être attribué uniquement à l'urée.

Échantillons

• Préparation des solutions étalons

Une masse voisine de 10 mg d'urée, mesurée précisément, est introduite dans une fiole jaugée de 1 litre et complétée avec de l'eau désionisée. A partir de cette solution à 10 ppm d'urée, une gamme d'étalonnage est préparée. L'urée (99 %, Aldrich) a été utilisée sans purification préalable.

La solution mère est diluée pour obtenir 1 mL de solution à 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ppb et 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ppm en urée.

10 μ L de ces solutions sont injectés sur le couplage HPLC-MS-MS. La courbe de calibration est obtenue en traçant la surface du pic de l'ion $m/z = 61 \rightarrow m/z = 44$, caractéristique de l'urée en fonction de la concentration en urée.

• Eaux de piscine

Les échantillons d'eaux de piscine qui ont été analysés proviennent d'un centre nautique possédant des équipements classiques tels qu'un grand bassin et un bassin « ludique ». Les eaux ont été prélevées dans les deux bassins à différentes heures de la journée et ont été analysées sans autre préparation, directement par HPLC-MS-MS en mode électrospray ou APCI.

Résultats et discussion

Analyse des solutions étalons

Quel que soit le mode d'ionisation, APCI ou électrospray, la courbe d'étalonnage est une droite (figure 1) dans la gamme de concentration 50 ppb-10 ppm avec un degré de linéarité r supérieur à 0,99. La limite de détection est de 50 ppb (signal/bruit ≥ 3).

La différence de pente observée suggère que l'ionisation de l'urée en mode APCI présente un rendement légèrement supérieur à celle générée par électrospray : en effet, pour une même concentration en urée, l'intensité du signal, toujours mesurée sur le 44, est plus forte. Ce rendement d'ionisation légèrement plus intense est observé à la suite de deux étapes : création et sélection des ions 61, suivie de la collision de ces fragments avec le gaz réactant (argon), conduisant à la formation des

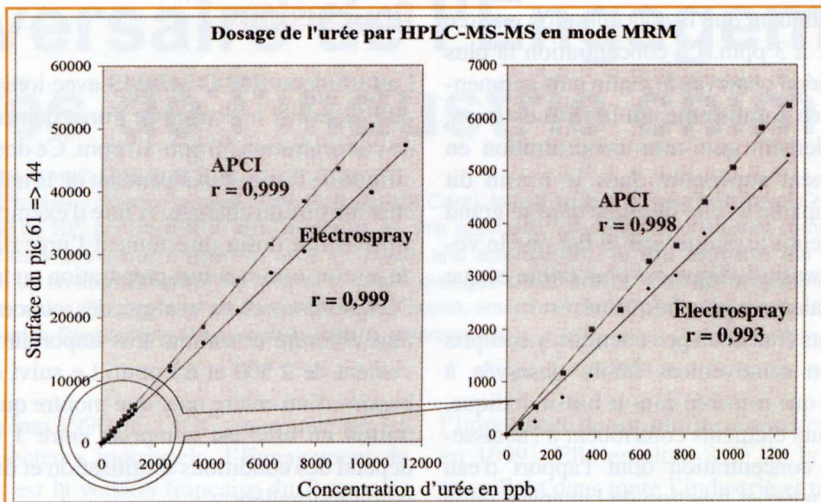
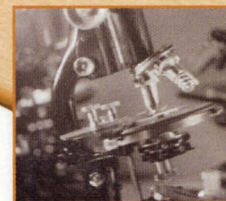


Figure 1 - Droites d'étalonnage en APCI et en électrospray.

fragments 44 dont l'intensité du courant ionique est finalement mesurée. Ce rendement d'ionisation légèrement supérieur pourrait être acquis au cours de la première phase de l'ionisation : en mode APCI, la décharge corona et le passage d'un courant d'azote à 350 °C, température sensiblement plus élevée que celle entretenue en électrospray, pourrait favoriser l'ionisation chimique développée par le solvant (H_3O^+).

Ces courbes d'étalonnage montrent qu'il apparaît préférable de doser l'urée en mode d'ionisation chimique à pression atmosphérique, pour la sensibilité accrue dans le domaine des faibles concentrations. Cette technique offre l'avantage de permettre un dosage spécifique de l'urée présente dans des eaux chargées ou non chargées. En effet, des essais effectués sur des eaux de différentes origines (eau

industrielle, eau potable), dopées en urée dans les mêmes gammes de concentration, ont conduit à des courbes d'étalonnage superposables.

Cette technique a été utilisée avec succès pour la détermination des taux d'urée dans des eaux de piscine.

Détermination de concentrations en urée dans des eaux de piscines

Trois campagnes de prélèvement d'eaux de piscine d'un centre nautique ont été effectuées. Les deux premières séries de prélèvements ont été analysées par HPLC-APCI-MS-MS, la dernière série par HPLC-ES-MS-MS.

Les résultats d'analyses sont regroupés dans le *tableau I*.

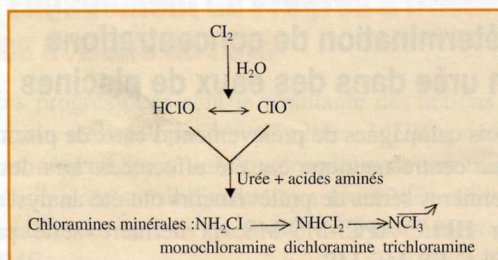
Tableau I - Concentration en urée mesurée dans l'eau de piscine.

Date	Heure	Bassin	[urée] en ppm	Méthode d'analyse
10/10/2000	7h00	Ludique	0,85	HPLC - APCI - MS - MS
	10h00		1,72	
	15h00		1,91	
	18h00		1,65	
	21h00		2,25	
11/10/2000	7h00	Ludique	1,34	HPLC - APCI - MS - MS
	10h00		1,75	
	15h00		2,1	
	18h30		3,1	
	21h00		2,8	
5/11/2000	6h00	Ludique	2,20	HPLC - ES - MS - MS
	10h00		1,60	
	14h45		2,60	
	18h00		2,70	
	6h00	Grand bassin	1,33	
	14h45		1,20	
	18h00		1,30	



Ces résultats indiquent que la concentration en urée peut varier de 1 à 3 ppm. La concentration la plus faible est en général observée le matin puis augmente dans la journée parallèlement à la fréquentation. Il apparaît également que cette concentration en urée est nettement supérieure dans le bassin dit « ludique » comparée à celle mesurée dans le grand bassin, ce qui peut s'expliquer par le fait que le volume d'eau du bassin ludique est plus faible et que ce bassin est également plus fréquenté.

Tous ces résultats étaient un peu attendus, y compris la concentration relativement faible observée à l'ouverture bien que mesurée dans le bassin ludique. En effet, plusieurs éléments contribuent à l'abaissement de cette concentration dont l'apport d'eau « neuve », journalier et fonction de l'intensité de la fréquentation enregistrée la veille, et l'action continue du chlore. La concentration en chlore est en effet automatiquement maintenue 24 h/24 à environ 1 mg/L d'eau et, parallèlement à sa fonction pathogène, cet agent dégrade également les molécules azotées en général, et donc l'urée, en chloramines selon le schéma réactionnel, très simplifié [9] :



L'action combinée de ces éléments, chlore et renouvellement partiel de l'eau, explique que le taux d'urée demeure à peu près stable malgré les variations quelquefois importantes de fréquentation.

Conclusions

La technique HPLC-MS-MS avec ionisation APCI ou ES permet le dosage de l'urée dans des gammes de concentration 50 ppb-10 ppm. Ce dosage est spécifique de l'urée et indépendant de la nature de l'eau, chargée ou non chargée. A titre d'exemple, elle nous a permis de doser directement l'urée dans les eaux de piscine, sans aucune préparation ou traitement de l'échantillon, et ce malgré des concentrations en ions chlorure et sodium très importantes, respectivement de 2 500 et 65 ppm. Le suivi de plusieurs bassins d'un centre nautique montre que la concentration en urée est comprise entre 1 et 3 ppm et dépend des conditions d'utilisation et de la fréquentation journalière.

Références

- [1] Mulvenna P.F., Savidge G., A modified manual method for the determination of urea in seawater using diacetylmonoxime reagent, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **1992**, *34*, p. 429-438.
- [2] Price N.M., Harrison P.J., Comparison of methods for the analysis of dissolved urea in seawater, *Marine Biology*, **1987**, *94*, p. 307-317.
- [3] Beale R.N., Croft D., A sensitive method for the colorimetric determination of urea, *Journal of Clinical Pathology*, **1961**, *14*, p. 418-424.
- [4] Kodama S., Suzuki T., Highly sensitive method for urea detection in wine, *Journal of Food Science*, **1995**, *60* (5), p. 1097-1109.
- [5] Matsudo T., Sasaki M., Determination of urea and citrulline in fermented foods and beverages, *Bioscience Biotech. Biochem.*, **1995**, *59* (5), p. 827-830.
- [6] Hara H., Kitagawa T., Okabe Y., Continuous-flow determination of low concentrations of urea in natural waters using an immobilized urease enzyme reactor and ammonia gas sensing membrane electrode detector system, *Analyst*, **1993**, *118*, p. 1317-1320.
- [7] Ferrer I., Barcelo D., LC-MS methods for trace determination of pesticides in environmental samples, *Analisis*, **1998**, *26* (6), p. 118-122.
- [8] Hoja H., Marquet P., Verneuil B., Lotfi H., Dupuy J.L., Dreyfuss M.F., Lachatre G., Dosage de buprénorphine et de norbuprénorphine dans l'urine et le sérum par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation de type électrospray (LC/ES/MS), *Analisis*, **1996**, *24* (4), p. 118-122.
- [9] Besse P., Alouini Z., Seux R., Devenir de l'urée dans les eaux de piscines, *Piscines et Santé : Recueil des actes du Colloque National 17-18-19 Juin 1985*, **1985**, p. 104-112.