

Muscs synthétiques

Méthode d'analyse dans le biote marin

Généralités

Nom de la famille de substances	Muscs synthétiques
Nom des substances individuelles	Musc xylène (MX) Musc cétone (MK) Galaxolide® (HHCB) Tonalide® (AHTN)
Code SANDRE des substances individuelles	Musc xylène : 6342 Musc cétone : 6687 Galaxolide® : 6618
Matrice analysée [code SANDRE du (des) support(s)]	Biote : Poisson [4] Mollusque [30]
Principe de la méthode	Extraction automatisée par solvant (PFE) avec un mélange dichlorométhane/hexane 50/50. Elimination des lipides et autres macro-molécules par chromatographie par perméation de gel (CPG) avec dichlorométhane. Purification sur colonne florisil avec élution à l'hexane. Purification sur colonne de silice/alumine avec élution par un mélange hexane/dichlorométhane 60/40. Concentration de l'extrait puis analyse en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG- SM) avec ionisation par impact électronique (IE) et ionisation chimique négative (ICN).
Acronyme	PFE/CPG/CG-SM
Domaine d'application	Pour une prise d'essai de 3g de poids sec : 1 ng/g à 25 ng/g pour HHCB 0.7 ng/g à 25 ng/g pour AHTN 0.015 ng/g à 2.5 ng/g pour MX 0.050 ng/g à 2.5 ng/g pour MK
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Pourcentage d'humidité (déterminé par gravimétrie)
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	Tous les réactifs doivent être de qualité « pour analyse de résidus » et manipulés sous hotte. De part la nature des composés analysés des précautions doivent être prises pour limiter la contamination analytique, en particulier : ne jamais porter de gants en coton au cours du protocole analytique mais des gants en nitrile, utiliser des solvants réservés à l'analyse des muscs ainsi qu'une verrerie calcinée et rincée au dichlorométhane avant analyse. Le personnel intervenant au cours du process analytique devra également veiller à ne pas utiliser de produits d'hygiène volatils.

**Interférents
(préciser la matrice)**

 Interférents identifiés : Pas d'interférents identifiés.
 Matrices testées : Moule, poisson.

AVERTISSEMENT : Il convient que l'utilisateur de cette méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Cette méthode n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur 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. Certains des solvants utilisés dans le mode opératoire sont toxiques et dangereux. Les manipuler avec précaution.

Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément à cette méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation adéquate.

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :

 Biote : Corps entier (mollusques bivalves)
 Muscle (poisson)

Conditionnement et conservation des échantillons

- Protocole :

Conservation sous forme congelée à -20°C en attente de lyophilisation.

- Nature du contenant de stockage :

Conservation sous forme lyophilisée à l'abri de la lumière et température ambiante, dans flacons en verre.

- Lavage du contenant :

Flacon en verre

- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :

Eau + acides organiques neutralisant (lavage machine), puis passage au four à 450°C pendant 8h.

Filtration :

- Type de filtre et méthode de nettoyage :

Sans objet

- Type de support de filtration :

Pré-traitement des échantillons liquide ou solide

 Mollusques : épurer (24 heures), décoquiller, égoutter, broyer / homogénéiser, lyophiliser
 Poissons : disséquer, broyer/homogénéiser, lyophiliser

Précautions : contamination croisée possible entre échantillons de niveaux de contamination différents. Il est recommandé de faire un blanc de lyophilisation régulièrement.

Le personnel intervenant au cours de la préparation des échantillons devra veiller à ne pas utiliser de produits d'hygiène volatils et à porter des gants en nitrile.

Analyse

Volume ou masse de la prise d'essai (mL or mg selon la phase analysée)

3 g de poids sec, pouvant varier de 2 à 5 g de poids sec (le poids sec doit être déterminé juste avant analyse sur une quantité aliquote pour calculer la reprise d'humidité pouvant se produire entre la lyophilisation et l'analyse).

Dérivation

- Conditions (réactifs, solvants, pH, température et durée)

Sans objet

Extraction

- Liquide / Liquide (préciser la nature et le volume du solvant)
- Micro-ondes (préciser la nature et le volume du solvant ainsi que les paramètres d'utilisation de l'appareil)
- SPE (préciser le type de cartouche, la nature et les volumes des solvants de lavage et d'élution)
- PFE (T°C, P, solvant d'extraction, nombre de cycles, % de flush)

PFE (T°C, P, solvant d'extraction, nombre de cycle, % de flush)

- Avant extraction :
 - Remplir une cellule ASE[®] de 33 mL avec l'échantillon lyophilisé
 - Ajout de l'étalon interne (MX D15)
 - Compléter avec des billes de verre
- Extraction ASE[®] :
 - Nombre d'extraction : 2
 - Solvant d'extraction : dichlorométhane/hexane 50/50
 - Pression : 100 bar
 - Température : 100°C
 - Nombre de cycle : 5
 - Flush : 35 %
 - Purge : 150 s
 - Static : 2 min
- Concentration : Concentrer à l'évaporateur rotatif puis sous jet d'azote jusqu'à 3 mL dans le dichlorométhane

- Micro-extraction (support, durée d'exposition, température, sel)
- Autre (préciser)

Purification

(type de purification, paramètres de purification, méthode de concentration)

CPG (chromatographie par perméation de gel)

- Colonne en verre (460 mm x 26 mm) remplie de copolymère de styrène divinylbenzène (Biobeads SX-3, 200-400 Mesh)
- Solvant : dichlorométhane
- Débit : 5 mL/min
- Durée totale du run : 80 min
- Fraction collectée entre 37 et 50 min
- Concentration : Evaporer par système syncore ou équivalent puis sous jet d'azote jusqu'à 500 µL dans l'hexane

Chromatographie d'adsorption sur colonne de florisil

- Préparation : Placer de la laine de verre au fond d'une colonne de verre (250 mm x 6 mm), ajouter 1.5g de florisil désactivée.
- Conditionnement : Passer sur la colonne 10 mL d'hexane/acétate d'éthyle 98/2 (v/v).
- Dépôt et élution : Déposer l'échantillon en tête de colonne puis éluer avec 28 mL d'hexane/acétate d'éthyle 98/2 (v/v).
- Concentration : Evaporer à l'évaporateur rotatif puis sous jet d'azote jusqu'à 1 mL dans l'hexane.

Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice/alumine

- Préparation : Placer de la laine de verre au fond d'une colonne de verre (250 mm x 6 mm), ajouter 1.5g de silice à 5% d'eau puis 1.5g d'alumine à 5% d'eau.
- Conditionnement : Passer sur la colonne 15 mL d'hexane.
- Dépôt et lavage : Déposer l'échantillon en tête de colonne puis laver avec 7 mL d'hexane.
- Elution : Eluer avec 21 mL d'hexane/dichlorométhane 60/40 (v/v).
- Concentration : Evaporer à l'évaporateur rotatif puis sous jet d'azote jusqu'à 500 µL dans l'isooctane. Transférer en vial, ajouter l'étalon d'injection (Phénanthrène D10) puis ajuster le volume à 400 µL.

Conservation de l'extrait

Conservation à -20°C.

Minéralisation

- Type d'appareil utilisé :
- Durée et température de minéralisation :
- Réactifs utilisés :

Sans objet

Volume ou masse finale avant analyse :400 μ L d'isooctane.**Méthode analytique utilisée :**

Indiquer les paramètres complets de la méthode (exemple pour la chromatographie : gradient, phase mobile, débit, T °C, colonne, mode de détection)

Pour la détection par masse : mode d'ionisation et ions de quantification et de confirmation

Conditions chromatographiques

Colonne : Agilent J&W® DB5MS (5% diphenyl et 95% diméthyl) de longueur 40 m, de diamètre interne 0,18 mm et d'épaisseur de phase stationnaire 0,18 μ m.

Gaz vecteur : Hélium

Débit : 0.8 mL/min

Mode d'injection splitless

Température d'injecteur : 280°C

Température de la ligne de transfert : 280°C

Gradient de température (run de 42 min) :

Température (°C)	Rampe (°C/min)	Durée (min)
110	-	1
180	10	0
220	2	0
320	25	10

Volume d'injection : 2 μ L

Conditions spectrométriques HHCB et AHTN

Type : spectromètre de masse avec analyseur quadropolaire

Mode d'ionisation : Impact électronique (EI)

Délai du solvant : 8 min

Température de source : 250°C

Tableau des ions de quantification(Q) et de qualification(q) :

Composés	Temps de rétention (min)	Ion(s) quantifiant(s) (u.m.a.)	Ions qualifiants (u.m.a.)
HHCB	14.94	243	213 258
AHTN	15.12	243	258 159
MX D15	14.74	294	
Phe D10	13.95	188	

Conditions spectrométriques MX et MK

Type : spectromètre de masse avec analyseur quadropolaire

Mode d'ionisation : Ionisation chimique négative (NCI)

Gaz réactant : méthane (40%)

Délai du solvant : 8 min

Température de source : 250°C

Tableau des ions de quantification(Q) et de qualification(q) :

Composés	Temps de rétention (min)	Ion(s) quantifiant(s) (u.m.a.)	Ions qualifiants (u.m.a.)
MX	15.58	267	268
			297
MK	18.71	264	265
			294
MX D15	15.24	282	

**Equipements¹
(modèles utilisés) :**

Appareil de chromatographie : Agilent 7890A®.
 Détecteur de masse : Agilent 5975C (simple quadripôle).
 Passeur d'échantillon : CTC Analytics CombiPAL®.

Type d'étalonnage

Interne

**Modèle utilisé
Etalons / Traceurs utilisés**

Linéaire, méthode de calcul par facteurs de réponse relatifs.
 L'étalon interne utilisé pour l'ensemble des composés est le musc xylène marqué au ²H.

Domaine de concentration

L'étalon externe utilisé est le phénanthrène marqué au ²H.
 En impact électronique : de 5 à 200 pg/μL pour HHCB et AHTN.
 En Ionisation chimique : de 0.1 à 20pg/μL pour MX et MK.

**Méthode de calcul des résultats
Rendement**

Intervalle de conformité : 40 à 120%
 Correction par le rendement : non, utilisation d'une méthode par étalonnage interne.

Blancs

Appareillage : inférieur à la LD
 Réactifs : inférieur à la LD
 Méthode : supérieur à la LQ (réalisé sur billes de verre)

Soustraction du blanc de méthode:
 Oui, si celui ci est supérieur à la limite de quantification

Références de la méthode**La méthode est dérivée de la publication suivante**

Aaron M. Peck, John R. Kucklick, Michele M. Schantz (2006)
 Synthetic musk fragrances in environmental Standard Reference Materials.
 Anal Bioanal Chem (2007) 387: 2381–2388

Norme dont est tirée la méthode

/

¹ Les matériels cités ici constituent des exemples d'application satisfaisante. Ces mentions ne constituent pas une recommandation exclusive, ni un engagement quelconque de la part du rédacteur ou d'AQUAREF

Niveau de validation selon Norman

Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée

Prise en compte de plusieurs documents lors de la validation :
 -Norme NF T90 2010.
 -Directive et recommandation européenne en application (notamment la réglementation 2012/252/CE).
 -Les guides techniques d'accréditation (GTA) émanant du Cofrac (notamment le Lab GTA 26).

Domaine de validation

De 7.5 à 200 pg/μL pour HHCB.
 De 5 à 200 pg/μL pour AHTN.
 De 0.1 à 20pg/μL pour MX.
 De 0.4 à 20pg/μL pour MK.

Matériaux de référence utilisés

Pas de matériaux de référence disponible.

Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)

Blancs réalisés sur billes de verre sur l'ensemble du protocole à partir de l'extraction
 Suivi des blancs analytiques dans une carte de contrôle. Le blanc analytique doit se situer dans l'intervalle x (moyenne sur 10 blancs réalisés en conditions de fidélité intermédiaire) $\pm 2\sigma$ (écart type sur les 10 blancs).

Rendement

- par type de matrice
 - par niveau de concentration
 - par molécule
- (si moyenne préciser le nombre de répétitions et l'écart-type)

Déterminé après enrichissement de différents échantillons de moule (La Plaine sur Mer) et de poisson (Colin, Alaska) (n=15)
 HHCB : $104 \pm 17 \%$
 AHTN : $87 \pm 14 \%$
 MX : $106 \pm 11 \%$
 MK : $100 \pm 11 \%$

MX-D15 : $96 \pm 10 \%$ (n=29 ; échantillons réels de moules prélevées sur les côtes françaises et de bars pêchés dans l'estuaire de Loire)

Limite de quantification(LQ) Limite de détection (LD)

(indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)

La réglementation 2012/252/CE définit la limite spécifique acceptée de quantification comme étant la concentration d'un analyte dans l'extrait d'un échantillon qui produit une réponse instrumentale aux différents ions à contrôler par un rapport S/B (signal/bruit) de 3:1 pour le signal le moins intense.
 La LQ est donc déterminée par un rapport S/B (signal/bruit) de 3:1 pour le signal le moins intense.
 La LD est déterminée par un rapport S/B (signal/bruit) de 3:1 pour le signal le plus intense.
 La LQ et la LD ont été déterminées sur 23 échantillons de moules et 6 échantillons de poisson (cf description ci-dessus). L'exactitude des limites de quantification fixées (cf valeurs ci dessous) a été vérifiée selon la norme NF T90 2010 par rapport à un écart maximal acceptable de 60%

Substances	LQ _{moule} (pg/g)	LQ _{poisson} (pg/g)
HHCB	1000	1000
AHTN	700	700
MX	15	10
MK	50	25

Incertitudes (%) sur les résultats
- par type de matrice
- par niveau de concentration
- par molécule
(reproductibilité avec méthode de détermination)

Les incertitudes ont été déterminées selon la norme NF T90-210 pour la matrice moule et la matrice poisson.
Incertitude élargie $U(y)$ avec $U(y) = 2 \times u(y)$, où $u(y)$ = incertitude combinée

Molécule	U(y) relatif % matrice moule	U(y) relatif % matrice poisson
HHCB	34	17
AHTN	29	9
MX	18	22
MK	25	15

Contacts

Auteurs

Charles POLLONO ; Céline TIXIER

Institut

Ifremer (RBE/BE/LBCO)

Contact

cpollono@ifremer.fr