

Analyse des PBDE dans les biotes marins

Références de la méthode

La méthode qui suit est dérivée de la publication suivante	Johansson <i>et al.</i> , 2006. Chemosphere 64, 296-305 Eljarrat <i>et al.</i> , 2002. J. Mass Spectrom, 37, 76-84. Munsch <i>et al.</i> , 2005. Analyses de contaminants organiques (PCB, OCP, HAP) dans les organismes marins. Ed. ifremer, méthodes d'analyses en milieu marin, 44p.
Norme française et/ou européenne dont est tirée la méthode	Néant
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1
Code SANDRE de la méthode (suivant niveau de validation)	

Généralités

Nom de la famille de substances	Polybromodiphényléthers (PBDE) ou Ethers diphényliques polybromés. La méthode décrite ci-dessous est potentiellement applicable, après validation spécifique, à d'autres congénères que ceux mentionnés. Les congénères choisis ci-dessous sont ceux retrouvés majoritairement dans les biotes marins, et ceux pour lesquels on dispose sur le marché d'étalon purs, et de valeurs de référence (matériaux certifiés).
Nom des substances individuelles	BDE 28 : 2,4,4' tribromo diphényl éther BDE 47 : 2,2',4,4' tétra bromo diphényl éther BDE 49 : 2,2',5,4' tétra bromo diphényl éther BDE 66 : 2',3,4,4' tétra bromo diphényl éther BDE 99 : 2,2',4,4',5 pentabromo diphényl éther BDE 100 : 2,2',4,4',6 pentabromo diphényl éther BDE 153 : 2,2',4,4',5,5' hexabromo diphényl éther BDE 154 : 2,2',4,4',5,6' hexabromo diphényl éther BDE 183 : 2,2',3,4,4',5,6' heptabromo diphényl éther BDE 209 : décabromodiphényléther
Code(s) SANDRE des substances individuelles	BDE 28 : 2920. BDE 47 : 2919. BDE 99 : 2916. BDE 100 : 2915.

Matrice analysée	BDE 153 : 2912. BDE 154 : 2911. BDE 183 : 2910. BDE 209 : 1815. Biote : Poisson Mollusque
Acronyme	ASE – CPG/SM
Principe de la méthode	Extraction des PBDE par extraction par solvant pressurisé à chaud (ASE) au dichlorométhane, purification et séparation par chromatographie de perméation de gel (GPC) et chromatographie d'adsorption, analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (SM) en mode ionisation chimique négative
Domaine d'application	4 pg / g à 400 ng / g poids sec
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Pourcentage d'humidité (déterminé par gravimétrie) Pourcentage de lipides (déterminé par gravimétrie, matières extractibles par un mélange hexane/acétone 80:20 v/v)
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	Manipulation sous hotte, utilisation de verrerie calcinée pour échantillon et extraits, protection UV du laboratoire recommandée (certains congénères comme BDE 209 sont particulièrement photo-dégradables), atmosphère à empoussièremment contrôlé recommandée, utilisation de solvants de qualité Atrasol ou équivalent

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 (mollusque) Foie (poisson) Muscle (poisson) Autre : Gonades
Conditionnement et conservation des échantillons	Conservation sous forme congelée à -20°C en attente de lyophilisation, conservation sous forme lyophilisée à l'abri de la lumière et température ambiante, dans flacons en verre ambré.
- Protocole :	Mollusques : épurer (24 heures), décoquiller, égoutter, broyer/homogénéiser, lyophiliser Poissons : disséquer, broyer/homogénéiser, lyophiliser
- Nature du contenant de stockage :	Certaines molécules se dégradent à la lumière, il est recommandé de stocker les échantillons à l'abri de la lumière. L'utilisation de verre ambré est donc recommandée.
- Lavage du contenant :	Eau + acides organiques neutralisants (lavage machine), puis passage au four à 450°C pendant 8 heures
- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :	

Filtration : - Type de filtre et méthode de nettoyage : - Type de support de filtration :	Sans objet
Pré-traitement des échantillons liquide ou solide	Décoquillage/Dissection, Broyage, Lyophilisation Précautions : contamination croisée entre échantillons de niveaux de contamination différents possible, contamination par BDE 209 possible selon atmosphère ambiante du lyophilisateur. Il est recommandé de faire un blanc à cette étape de traitement de l'échantillon.

Analyse

Volume ou masse de la prise d'essai (mL ou mg selon la phase analysée)	Biote : Poisson / Mollusque / Crustacé : 0,5 g à 10 g 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 - ASE (T°C, P, solvant d'extraction, nombre de cycles, % de flush) - Autre (préciser)	<p>Sur cellules (volumes 11 ml à 33 ml) remplies d'échantillon lyophilisé + poudre de verre (les cellules auront été préalablement nettoyées à l'ASE avec un mélange DCM :méthanol 50 :50, la poudre de verre passée à 450°C pendant une nuit):</p> <p>Deux cycles d'extraction successifs selon les conditions suivantes :</p> <p>Solvant : Dichlorométhane (DCM) Pression : 138 bars Température : 100°C Temps chauffage : 5 minutes Temps d'extraction : 5 x 2 minutes pour chaque extraction (deux extractions au total) Volume de rinçage : 35% pour chaque extraction Temps de purge : 150 secondes</p> <p>Après extraction : concentration des extraits à l'évaporateur rotatif ou système équivalent, puis à l'évaporateur sous jet d'azote, dans le DCM</p>

Purification

(type de purification, paramètres de purification, méthode d'évaporation)

1. CES : chromatographie d'exclusion stérique sur colonne en verre (460 mm x 26 mm) remplie de copolymère de styrène divinylbenzène (Bio-Beads SX-3, 200-400 Mesh), au moyen d'un système automatisé. L'élution est réalisée au dichlorométhane à 5 ml / min. Récupérer l'extrait après les 40 premières minutes d'élution sur la colonne au moyen d'un collecteur de fraction (temps d'élution à déterminer précisément selon configuration du système).

Après CES : concentrer et reprendre l'extrait dans l'iso-octane

2. Chromatographie d'adsorption sur colonne en verre (300 mm x 10 mm) remplie de : laine de verre, silice (7g, 100-200 Mesh) désactivée (5% eau en masse), alumine (7g, 70-230 Mesh) désactivée (5% eau en masse).

Elution par

F0 : 25 ml 100% hexane

F1 : 17 ml 100% hexane

F2 : 30 ml mélange hexane/dichlorométhane 90:10, v/v

Récupérer et regrouper F1 et F2

Concentrer l'extrait dans l'iso-octane

Minéralisation

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

Sans objet

Volume ou masse finale avant analyse :

On concentre à l'évaporateur sous jet d'azote à un volume de 20 µl à 500 µl selon les niveaux de contamination des échantillons, dans l'iso-octane

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

CPG

Tous congénères sauf BDE 209 :

DB-5-MS (5% Diphényl et 95% Diméthyl arylène siloxane), 40 m, 0.18 mm d. i., 0.18 µm épaisseur de phase+ 1–2 m «colonne de rétention » désactivée non polaire

Programmation four : 60° (1 min.), 180°C (40%min.) , 240°C (15°C/min.), 300°C (4°C/min.), 25 min., 305 (50%min.), 2 min.

Gaz vecteur : Hélium, 0,8 ml/min

BDE 209 : DB-1 (100% Diméthylpolysiloxane), 15 m, 0.25 mm d. i., 0.10 µm épaisseur de phase, + 1–2 m «colonne de rétention» désactivée non polaire
Programmation four : 70°C (1,5 min.), 175°C (40%min.), 250°C (10°C/min.), 320°C (50°C/min.), 3 min.

Gaz vecteur : Hélium, 2,5 ml/min

Injecteur : on-colonne, programmation de température « oven track » (suit la température du four)

Volume injecté : 1 µl

SM

Interface: 280°C

Source: 210°C

Quadripôle: 150°C

Energie électron: 160-235 eV

Courant d'émission : 50 µA

Mode : SIM

Gaz réactant : méthane ($2,5 \cdot 10^{-4}$ Torr)

Congénères	Ions de quantification	Ions qualifiants
BDE 28	79+81	161, 327
BDE 47, BDE 49, BDE 66	79+81	161, 327
BDE 99, BDE 100	79+81	161, 405
BDE 153, BDE 154	79+81	161, 563
BDE 183, BDE 190 (étalon interne)	79+81	161, 563
BDE 209	487+489	409
C ¹³ BDE 209	493+495	415

Equipement (modèles utilisés) :CPG Agilent 6890N
SM Agilent 5973N (simple quadripôle)**Type d'étalonnage**

Interne (BDE 190)

Modèle utilisé

Linéaire

Etalons / Traceurs utilisés

Etalons externes de rendement : BDE 139, et BDE 209 marqué C13 pour le BDE 209. Etalon interne : BDE 190

Domaine de concentrationGamme d'étalonnage : 2-200 pg / μ l sauf BDE 209 10-200 pg / μ l**Méthode de calcul des résultats**

Correction par le rendement : Non

Paramètres de validation de la méthode

Méthode utilisée en laboratoire de recherche, non entièrement validée au sens de la norme T 90-210

Norme utilisée

Néant

Modèle utilisé

Linéaire

Domaine de validation**Matériaux de référence certifiés utilisés**

WMF-01 (poisson lyophilisé, Wellington Laboratories), contenant les congénères certifiés suivants: 28, 47, 99, 100, 153, 154 et 183

Blancs analytiques

(concentration ou résultat maximum acceptable)

Blancs réalisés sur billes de verre sur l'ensemble du protocole à partir de l'extraction

< LD pour tous congénères, sauf BDE 209. Pour BDE 209 : < 3 fois la concentration minimale déterminée dans l'échantillon le moins concentré, typiquement < 5 pg / μ l injecté, équivalent à environ 100 pg dans l'extrait**Rendement****- par type de matrice****- par niveau de concentration****- par molécule**

(si moyenne préciser le nombre de répétitions et l'écart-type)

Sur matrice poisson (échantillon réel certifié non dopé, analysés à différents temps)

(n = 11)

BDE 28 : 110% +/- 1%

BDE 47 : 118% +/- 9%

BDE 99 : 101% +/- 9%

BDE 100 : 99% +/- 9%

	<p>BDE 153 : 82% +/- 13%</p> <p>BDE 154 : 101% +/- 12%</p> <p>BDE 183 : 73% +/- 14%</p> <p>BDE 139 : moyenne = 101 % +/- 14 % (n = 75)</p> <p>BDE 209 marqué C13 : 91 % +/- 16 % (n = 63)</p>
<p>Limite de détection (LD)</p> <p>Limite de quantification (LQ)</p> <p>(indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)</p>	<p>Sur matrice moule peu contaminée (proche LD), analyse de trois réplicats indépendants, injectés chacun 6 fois. Ecart type (SD) calculé sur la moyenne des réplicats.</p> <p>LD= (3 x sd) = 1,9 à 4,6 pg / g</p> <p>LQ = (10 x sd) = 6,2 à 15,2 pg / g</p>
<p>Spécificité de la méthode (préciser la matrice)</p>	<p>Testée : Non</p> <p>Interférents possibles : entre congénères de PBDE, PBB, TBBPA, MeO-BDE</p>
<p>Incertitudes (%) sur les résultats</p> <p>- par type de matrice</p> <p>- par niveau de concentration</p>	

- par molécule
(reproductibilité avec méthode de détermination)

Etude de **répétabilité** menée sur 7 réplicats

Matrice : muscle de poisson (non dopé)

Congénère	Moyenne (ng/g)	RSD (%)
BDE 28	0.17	6
BDE 49	1.32	4
BDE 47	5.44	4
BDE 66	0.13	12
BDE 100	1.89	8
BDE 99	0.37	6
BDE 154	0.76	14
BDE 209	0.12	33
%		
BDE 139 (étalon rendement)	97	3

Matrice : foie de poisson (non dopé)

Congénère	Moyenne (ng/g)	RSD (%)
BDE 28	2.16	6
BDE 49	14.91	7
BDE 47	61.14	7
BDE 66	1.55	8
BDE 100	22.14	7
BDE 99	4.57	7
BDE 154	10.78	11
BDE 209	0.47	29
%		
BDE 139 (étalon rendement)	98	9

Etude de **reproductibilité** déterminée sur matrice poisson (échantillon certifié, n = 11)

Congénère	Moyenne (ng/g)	RSD (%)
BDE 28	3.4	10
BDE 47	144.9	7
BDE 100	35.6	9
BDE 99	37.9	9
BDE 153	14.0	16
BDE 154	20.0	12
BDE 183	0.4	20
%		
BDE 139 (étalon rendement)	92.7	14

Contacts

Auteurs
Institut
Adresses mail

Catherine Munsch
IFREMER
cmunschy@ifremer.fr