

RAPPORT FINAL

Convention ONEMA-LNE n° 1187/08 - Document DMSI/4 - Page 1/16

Programme AQUAREF 2008

VALIDATION DE LA METHODE DE LA DILUTION ISOTOPIQUE (METHODE PRIMAIRE) SUR UN MATERIAU DE REFERENCE CERTIFIE (ESPECES DU MERCURE DANS UNE MATRICE DE POISSON)

Rédacteurs : Guillaume LABARRAQUE, Paola FISICARO

Février 2009

**La reproduction de ce document n'est autorisée que sous sa forme intégrale
Il comporte 16 pages**

Validation de la méthode de la dilution isotopique (méthode primaire) sur un matériau de référence certifié (espèces du mercure dans une matrice de poisson).

Titre : Validation de la méthode de la dilution isotopique (méthode primaire) sur un matériau de référence certifié (espèces du mercure dans une matrice de poisson).

Auteur : Laboratoire National de métrologie et d'Essais

Sujet (mots-clés) : spéciation du mercure, dilution isotopique, méthode primaire, analyse de spéciation sur matériaux de référence du mercure, évaluation des incertitudes

Résumé : Pour comprendre l'impact et l'interaction d'un élément minéral (métaux et métalloïdes) sur l'environnement, il ne suffit plus de déterminer sa valeur totale, mais aussi les concentrations des espèces chimiques sous lesquelles il apparaît. La voie principale de la biocontamination des humains par le mercure est la chaîne alimentaire. La grande capacité de bio accumulation dans les espèces aquatiques mène à des niveaux élevés du mercure dans les organismes aquatiques bien que les quantités dans l'eau soient très faibles. Il est donc essentiel de disposer d'une méthode de référence pour le dosage des espèces toxiques dans les matrices environnementales. Le LNE a mis en place un protocole métrologique pour réaliser l'analyse de spéciation du mercure dans les produits de la mer. La méthode a été validée à partir de matériaux de référence certifiés (MRC) lyophilisés et de MRC de poisson frais. L'incertitude sur le résultat a été déterminée, et la traçabilité assurée par l'utilisation de la méthode primaire de dilution isotopique.

Diffuseur : AQUAREF

Contributeurs :

Date de publication : 2009-02-01

Type : Texte

Format : .pdf

Identifiant :

Langue : FR

Couverture géographique :

Couverture temporelle :

Droits d'usage : domaine public

URL :

RESUME DE L'ETUDE (OU SYNTHÈSE)

La qualité de toutes données attendues pour exprimer l'état chimique et écologique de tous types de masses d'eaux doit faire appel à une chaîne continue d'actions dites d'assurance qualité qui valident niveau par niveau chaque donnée, et conforte le destinataire final de ces informations.

Depuis plusieurs années, le référentiel ISO/CEI 17025 impose que soient mis en oeuvre les outils suivants pour démontrer la maîtrise de la prestation et son niveau de qualité :

- utiliser des méthodes robustes et validées ;
- utiliser des matériaux de référence certifiés (MRC) s'ils existent ;
- participer à des essais d'inter comparaison entre laboratoire (EIL) ;
- déterminer ses incertitudes, méthode par méthode, substance par substance, matrice par matrice ;
- tenir à jour des dossiers d'équivalence (validation) entre méthodes si nécessaire.

Pour répondre aux exigences du référentiel, les laboratoires doivent disposer de méthodes d'analyse fiables et qui puissent assurer la traçabilité des résultats et donc leur comparabilité.

De nos jours, pour pleinement comprendre l'interaction et l'impact d'un élément minéral (métaux et métalloïdes) sur un environnement il ne suffit plus de déterminer sa teneur totale mais aussi les concentrations des espèces chimiques sous lesquelles il apparaît : c'est-à-dire réaliser une analyse de spéciation. Avec l'évolution de la législation européenne, ce champ émergent de la chimie analytique se retrouve face à une forte demande en terme de qualité de l'analyse, c'est-à-dire de sa traçabilité.

La voie principale de la contamination des humains par le mercure est la chaîne alimentaire. La grande capacité de bio-accumulation dans la chaîne alimentaire aquatique mène à des niveaux considérablement élevés de mercure dans les organismes aquatiques, malgré des quantités très faibles dans l'eau. Afin de répondre au besoin des règlements européens, il est donc essentiel de disposer d'une méthode de référence pour le dosage de la teneur des espèces toxiques dans les matrices environnementales.

En 2008, le LNE a mis en place un protocole métrologique pour réaliser l'analyse de spéciation du mercure, notamment pour le mercure inorganique (Hg^{2+}), et le méthylmercure (MeHg^+), dans des produits de la mer. Afin de valider la méthode, les essais ont été menés sur des matériaux de référence certifiés lyophilisés par l'IRMM (Institute of reference materials and measurements) BCR 463, 464, par le NRC (National Research Council) Dolt-4 et deux MRC de poisson frais du NIST (National Institut of Standard and Technology) SRM-1946,1947 tous caractérisés pour la fraction de masse de mercure total et de méthylmercure (BCR 463, 464).

La mise en pratique d'un protocole métrologique s'articule autour de deux notions fondamentales pour assurer la comparabilité des mesures. La première est la détermination d'une indication quantitative sur la qualité d'un mesurage. Celle-ci s'effectue par la caractérisation de la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, c'est-à-dire le calcul de l'incertitude de mesure (ISO 2007).

La seconde notion propre à toute démarche en métrologie est la traçabilité. Elle s'effectue à travers le raccordement d'une mesure à une référence via une chaîne ininterrompue d'étalonnages contribuant chacun à l'incertitude de mesure (ISO 2007), ou à travers l'application d'une méthode de mesure primaire.

SOMMAIRE

RESUME DE L'ETUDE (OU SYNTHÈSE)	3
1. INTRODUCTION	5
1.1. Méthode de référence primaire	5
1.2. Le Mercure et ses espèces	5
1.2.1. Utilisations	6
1.2.2. Cycle bio-géochimique	7
1.2.3. Effet du mercure sur la santé humaine	8
1.2.4. Evaluation du risque lié aux produits de la pêche	9
2. METHODE D'ANALYSE DE SPECIATION DU MERCURE	9
3. EVALUATION DES INCERTITUDES	13
4. CONCLUSIONS	14
5. REFERENCES	15

1. INTRODUCTION

1.1. Méthode de référence primaire

Le LNE, en tant que laboratoire national de métrologie, a pour mission d'assurer le raccordement des résultats de mesure au système des unités internationales (SI). Dans le domaine de la chimie, cela se traduit par le développement de procédures de mesure de référence qui reposent, si possible, sur des méthodes de mesure primaires.

« Une méthode de référence primaire est une méthode ayant les plus hautes qualités métrologiques dont toutes les étapes sont décrites et comprises, pour laquelle un bilan complet d'incertitudes peut être établi en référence aux unités du S.I. et dont les résultats ne font pas référence à la mesure de la quantité de matière d'un étalon de même nature du mesurande pour mesurer un analyte dans un échantillon » (BIPM Comité Consultatif pour la Quantité de Matière, 1995, 1, 38p).

Les méthodes de mesures de la quantité de matière identifiées par le CCQM comme ayant le potentiel pour être considérées comme une méthode primaire sont :

- la dilution isotopique par spectrométrie de masse (DI-MS),
- la coulométrie,
- la gravimétrie,
- la titrimétrie,
- (l'activation neutronique, en discussion actuellement).

1.2. Le Mercure et ses espèces

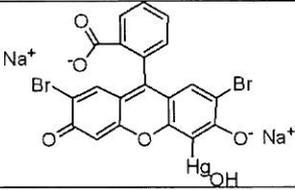
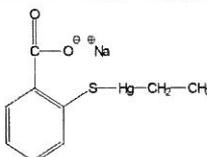
Les espèces de mercure peuvent être regroupées en trois catégories (Qvarnström 2003, Tessier 2004, Horvat 2005, Sannac 2009) :

- i. Le mercure élémentaire ne regroupant qu'une seule espèce : Hg^0 ;
- ii. Le mercure inorganique réunissant le mercure monovalent (Hg^+) et divalent (Hg^{2+}) formant des sels ou des complexes ;
- iii. Le mercure organique rassemblant les espèces de mercure divalent (Hg^{2+}) établissant une liaison covalente avec au moins un atome de carbone.

Dans l'environnement, le mercure (Hg) se retrouve naturellement sous la forme de mercure élémentaire (Hg^0), mercure inorganique divalent (Hg^{2+}), méthylmercure ($\text{CH}_3\text{-Hg}^+$) et diméthylmercure ($\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_3$) (Tessier 2004, Horvat 2005). La dénomination méthylmercure peut regrouper un ensemble de composés formé par l'association du cation $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$ avec un simple anion (comme Cl^-) ou une molécule chargée plus importante comme une protéine (Horvat 2005). D'autres espèces peuvent éventuellement être identifiées dans l'environnement, comme l'éthylmercure, mais leur présence est une conséquence de l'activité anthropique.

Le tableau 1 regroupe les principales formes de Hg synthétisées et utilisées par l'Homme au cours du XX^{ème} siècle.

Tableau 1

Composé	Espèce	Utilisation
Mercure élémentaire	Hg^0	Appareil de mesures (baromètres, thermomètres...), lampes fluorescentes, orpaillage...
Méthylmercure	CH_3-Hg^+	Applications agricoles (fongicide, pesticide, désinfectant)
Ethylmercure	$CH_3CH_2-Hg^+$	
Phénylmercure	$C_6H_5-Hg^+$	
Métoxy-éthylmercure	$CH_3OCH_2CH_2-Hg^+$	
Mercurochrome		Antiseptique
Thimerosal		Conservateur pour l'industrie pharmaceutique

1.2.1. Utilisations

Les sources naturelles de mercure proviennent majoritairement du dégazage de la croûte terrestre et des activités tectoniques comme les éruptions volcaniques et les sources géothermales (Nriagu 1989, WHO 1989, Tessier 2004). L'émission depuis les écosystèmes marins et terrestres est aussi une des sources importantes pour la mobilisation naturelle du mercure au sein de son cycle bio-géochimique. Cependant, cette seconde voie n'est souvent que la conséquence de précédents dépôts atmosphériques sur ces environnements (dépôts pouvant provenir de sources naturelles ou anthropiques) (Pacyna 2006).

L'évaluation des émissions naturelles est sujette à de fortes incertitudes. Outre la difficulté d'identification et de quantification des différentes sources à travers le globe, ces émissions ne sont pas constantes d'une année sur l'autre rendant l'estimation encore plus délicate. Nriagu (1989) estime à 2500 tonnes par an les émissions du mercure libéré par voie naturelle.

Les applications industrielles font principalement appel à du mercure à l'état élémentaire ou à des espèces inorganiques. L'emploi d'espèces organiques tend à diminuer : plusieurs gouvernements ont interdit leur emploi dans les activités agricoles (Horvat 2005) tandis que dans l'industrie pharmaceutique, le thimerosal est suspecté d'impacter la santé humaine (Clarkson 2002) et le mercurochrome est remplacé par d'autres molécules antiseptiques pour éviter tous risques d'allergies (Galindo 1997).

La production du mercure provient essentiellement de son extraction minière : à partir de cinabre (50% du mercure produit en 2003) ou comme sous produit de l'extraction de certains métaux (30%). Son recyclage permet aussi de répondre à environ 20% de la demande (Maxson 2005).

Les principales émissions dans l'environnement de Hg ne sont pas uniquement liées à son utilisation dans des procédés industrielles (responsable d'environ 25% des émissions totales atmosphériques). La combustion d'énergies fossiles avec 65%, la production de ciment (6%) et l'incinération des déchets (3%) représentent des sources importantes de mobilisation de Hg dans l'atmosphère. L'ensemble des émissions anthropiques dans cet environnement est estimé à 2100 tonnes en 2000, soit un chiffre équivalent aux émissions naturelles (Pacyna 2006).

D'autres émissions de Hg peuvent survenir dans les cours d'eaux par l'évacuation de rejets industriels ou sur les sols suite à l'épandage de boues et l'utilisation des composés de Hg dans l'agriculture. Stein *et al.* (1996) annoncent une répartition des émissions anthropiques de 80% pour les rejets atmosphériques, 15% au niveau des sols et 5% de renvois aux niveaux des écosystèmes aquatiques.

Depuis les années 1970, des législations restrictives ont été mises en place au sein de l'Union Européenne pour limiter, jusqu'à l'interdiction dans certains secteurs, les rejets du mercure et de ses composés (Tessier 2004) faisant chuter les émissions européennes de 860 à 239 tonnes entre 1980 et 2000 (Pacyna 2005). Cependant, le mercure reste largement utilisé dans le monde et l'essor économique de certains pays ne permet pas d'entrevoir une diminution durable de sa consommation : entre 1995 et 2000, les émissions atmosphériques ont augmenté de 90% en Afrique (à 400 tonnes), 10% en Asie (1100 t), 20% en Océanie (130 t) et 56% en Amérique du Sud (90 t) (Pacyna 2002 et 2006).

1.2.2. Cycle bio-géochimique

Les rejets naturels et anthropiques de mercure sont principalement réalisés dans l'atmosphère en partie due à sa caractéristique d'être un métal volatil. En conséquence, il est aisément diffusé via l'atmosphère sur de longues distances pour atteindre des écosystèmes éloignés des sources d'émissions ; Hg⁰ possède un temps de résidence dans l'atmosphère estimée entre 0.4 et 3 ans (WHO 1990). Cette caractéristique fait de la pollution au mercure un problème global sur l'échelle de la planète.

Les réactions et processus contrôlant la distribution des espèces du mercure dans l'environnement sont basés sur des phénomènes d'oxydation/réduction, méthylation/déméthylation, précipitation/dissolution et sorption/désorption (Jitaru 2004). Ces évolutions de Hg sont régies par des phénomènes abiotiques et biologiques.

Le bio-géochimique a fortement été perturbé depuis les révolutions industrielles par l'introduction massive de mercure liée aux activités anthropiques : les teneurs des différents compartiments environnementaux sont en moyenne trois fois supérieures à celles de l'ère pré-industrielle (Tessier 2004). La production de méthylmercure (MeHg⁺) au cours du cycle environnemental représente un des principaux dangers liés à ce métal. En effet, cette espèce est capable de former une liaison stable avec les groupes thiols (-SH) des protéines (Monperrus 2004) qui n'est que lentement dégradée et excrétée par les organismes (Horvat 2005). Ainsi, MeHg⁺ est capable de rapidement se diffuser et s'accumuler le long de la chaîne alimentaire pour atteindre des fortes valeurs de concentrations sur les niveaux supérieurs des réseaux trophiques en dépit de faibles teneurs dans les écosystèmes (WHO 1990, Horvat 2005), figure 1.

Suite du rapport page suivante

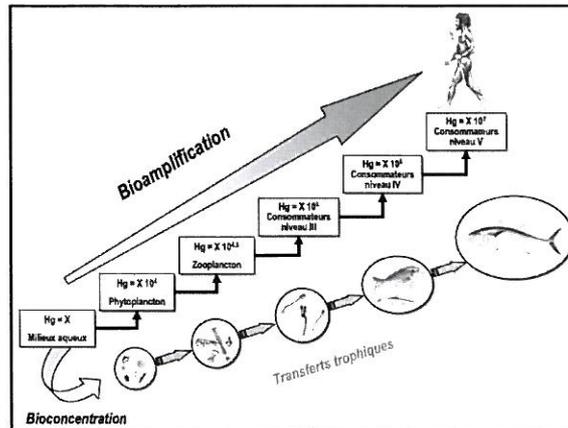


Figure 1 : Schéma de bio-amplification du MeHg

Les différents compartiments environnementaux ne sont pas égaux face à ce risque. Les systèmes aquatiques présentent une plus forte teneur en MeHg⁺ au niveau de leur biote en comparaison avec les systèmes terrestres malgré des teneurs équivalentes dans leurs sédiments (Dietz 2000). Une des raisons provient d'une meilleure biodisponibilité de cette espèce dans les écosystèmes aquatiques liée à une méthylation de Hg²⁺ en MeHg⁺ pouvant aussi bien intervenir dans les sédiments que dans la colonne d'eau (Monperrus 2004). Une seconde explication proviendrait de réseaux trophiques plus étendus dans les milieux aquatiques qui augmenteraient le facteur global de bioconcentration (Dietz 2000). Cependant, même si l'apport de la contamination en MeHg⁺ impacte majoritairement les systèmes aquatiques à l'heure actuelle, la pression anthropique toujours plus importante sur le cycle du mercure risque, à terme, de conduire à l'introduction de MeHg⁺ dans une plus grande échelle au sein des écosystèmes terrestres (Cristol 2008).

1.2.3. Effet du mercure sur la santé humaine

L'exposition de l'Humain au mercure se réalise principalement au travers l'inhalation de mercure élémentaire et de l'ingestion de méthylmercure.

L'ingestion et l'exposition des populations au mercure se réalise majoritairement à travers la consommation de produits de la pêche (WHO 1990, Dietz 2000) dans lesquels MeHg⁺ représente 75 à 95% du mercure total (Gotchfeld 2003). La consommation d'espèces se situant aux niveaux supérieurs des réseaux trophiques représente la plus grande exposition en MeHg⁺.

Du point de vue de risques sur la santé humaine, les formes les plus préoccupantes sont la vapeur de mercure élémentaire et les composés organiques à courtes chaînes alkyles (WHO 1976). En particulier, le méthylmercure représente une véritable menace de par le fait qu'il est l'espèce majeure de l'exposition humaine au mercure.

Au cours du XX^{ème} siècle, l'extrême toxicité du méthylmercure a pu être illustrée, avec des conséquences tragiques, à travers plusieurs cas d'intoxications massives de populations à Minamata et Niigata au Japon via la consommation de poissons et en Irak avec la fabrication de pains à partir de graines traitées (WHO 1990, Gochfeld 2003).

Lors d'une exposition, le méthylmercure cible en premier lieu le cerveau et le système nerveux (Mergler 2007). Cette espèce possède surtout une activité de neurotoxique par l'inhibition de la synthèse des protéines et de l'ARN (WHO 1990, Monperrus 2004). Ses effets sont irréversibles (Horvat 2005) et peuvent entraîner la mort (WHO 1990, INERIS 2006). Dans le cas d'exposition prénatal, les dommages causés par MeHg^+ sont encore plus importants provoquant des malformations congénitales, des retardements psychomoteurs et empêchant le bon développement du système nerveux (WHO 1990, Monperrus 2004). Des enfants peuvent présenter des symptômes d'intoxication au mercure même si la mère ne présente aucun signe d'empoisonnement (Mergler 2007).

Bien que l'exposition générale des populations soit inférieure à celles observées lors d'intoxications massives, un nombre grandissant de preuves démontrent que l'exposition de certaines populations est suffisante pour induire des altérations anormales de plusieurs systèmes, ce qui représente un important problème de santé publique (Mergler 2007). Il est donc important de pouvoir contrôler et quantifier les apports en méthylmercure dans les produits de la pêche pour pleinement rendre compte des risques associés à leur consommation.

1.2.4. Evaluation du risque lié aux produits de la pêche

Plusieurs organismes officiels ont évalué la Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire (DHTP) pour le méthylmercure (EFSA 2004, INERIS 2006) :

- l'agence américaine pour la protection de l'environnement (US-EPA) propose la valeur de $0.7 \mu\text{g}$ par poids corporel et par semaine (noté $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{sem}^{-1}$),
- l'agence américaine d'enregistrement des substances toxiques et des maladies (ATSDR) suggère une valeur de $2.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{sem}^{-1}$,
- l'organisation mondiale pour la santé (WHO) propose la valeur de $1.6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{sem}^{-1}$.

Toutes ces valeurs sont exprimées en méthylmercure. La différence entre les doses hebdomadaires tolérables s'expliquent par les études épidémiologiques prises en comptes et leur mode de calcul (EFSA 2004, INERIS 2006). Les agences en liaison avec les pouvoirs publics français (AFSSA pour la France et EFSA au niveau de l'Europe) prennent préférentiellement en compte la valeur préconisée par la WHO (AFSSA 2004, EFSA 2004).

2. METHODE D'ANALYSE DE SPECIATION DU MERCURE

Pour réaliser l'analyse de spéciation du mercure depuis des produits marins, il est essentiel de pouvoir séparer les deux espèces majoritairement présentes dans ce type d'échantillon : Hg^{2+} et MeHg^+ .

La séparation des espèces de mercure se fait préférentiellement par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse (Jitaru 2004, Monperrus 2004, Tessier 2004). Cependant, depuis plusieurs années, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée au spectromètre de masse avec ionisation par plasma induit (ICP-MS) se révèle comme une technique intéressante pour réaliser l'étude de spéciation du mercure (Boszke 2005). L'amélioration des limites de quantification de ce détecteur élémentaire a rendu son utilisation compatible avec l'HPLC pour la détermination du mercure dans des teneurs usuellement rencontrées au sein d'échantillons naturels (de l'ordre du $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Contrairement à la technique séparative la plus répandue, la chromatographie en phase gazeuse (GC), l'HPLC ne nécessite pas d'étape de dérivation des analytes, ainsi le risque de conversion des espèces durant le traitement ou la contamination par l'ajout de réactifs est limité. Cependant dû à l'emploi de l'HPLC, des restrictions doivent être prises pour s'assurer de la compatibilité de la phase mobile avec le type de détection choisie.

La première étape d'une analyse de spéciation consiste à récupérer les analytes de principaux intérêts avant leur séparation. Dans le cadre des travaux réalisés au LNE, cela consiste à transférer les espèces du mercure présentes dans une matrice solide sous forme liquide pour leur passage en HPLC.

Pour réaliser l'extraction depuis des matrices poissons, le choix a été dicté par celui de la phase mobile. En effet, les teneurs en mercure dans ce type d'échantillon, relevant du niveau de traces, ne permettent pas toujours une dilution du surnageant avant analyse. Celui ci doit donc être adapté pour son passage en HPLC avec seulement des étapes de séparation phase solide/liquide et de filtration après incubation de l'échantillon. Les conditions choisies sont reprises de Hight *et al.* (2006) : extraction par 10 g·L⁻¹ L-Cys, HCl, H₂O avec incubation à 60 °C pendant 2 h.

Cependant, l'application de ce solvant d'extraction n'a pu être envisagée : une aussi forte concentration en cystéine contamine l'échantillon en mercure inorganique comme le confirme la Figure 2 obtenue suite à l'analyse du solvant d'extraction par la phase inverse.

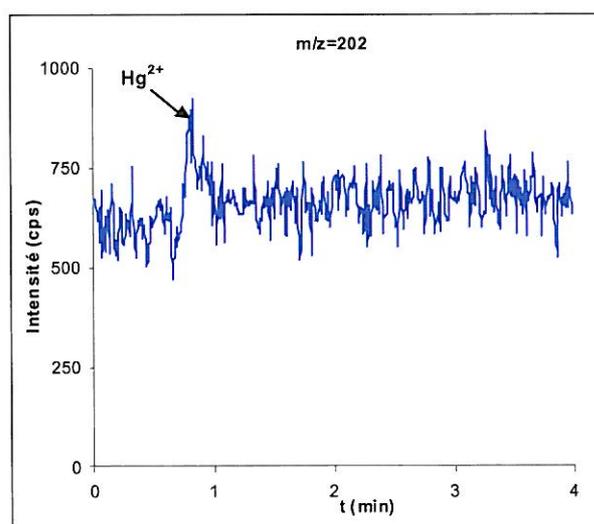


Figure 2 : Séparation sur la phase inverse d'une solution à 10 g·L⁻¹ de L-Cys, HCl, H₂O

Les essais sur l'extraction de Hg ont donc été menés en utilisant la phase mobile (0.5 g·L⁻¹ de L-Cys, HCl, H₂O et 0.5 g·L⁻¹ de L-Cys) comme solvant d'extraction pour limiter la contamination de nos échantillons. L'avantage sera aussi de disposer de surnageants directement compatibles avec leur séparation.

En plus du protocole proposé par Hight *et al.* (2006), plusieurs modes sont essayés pour accélérer le temps de préparation des échantillons. Ses tests ont porté sur l'extraction d'une prise d'essai de 200 mg en présence de 40 mL de phase mobile avec :

- 2 h d'incubation au bain-marie à 60 °C avec agitation magnétique,
- 15 min de bain à ultrasons (US) et agitation manuelle toutes les 15 min,
- 30 min de bain à ultrasons et agitation manuelle toutes les 15 min,
- 45 min de bain à ultrasons et agitation manuelle toutes les 15 min,
- 60 min de bain à ultrasons et agitation manuelle toutes les 15 min.

L'activation de l'extraction par les ondes micro-ondes (MW) a aussi été testée, seulement de par la capacité des godets, les quantités de matières ont du être réduites : 150 mg d'échantillon sont mis en présence de 20 mL de phase mobile. La puissance délivrée par le four micro-ondes était de 70 W pendant 6 min, ces paramètres sont basés sur les travaux de Tseng et al. (1997) qui activaient ainsi leur extraction avec l'hydroxyde de tétraméthylammonium.

Pour juger de l'efficacité des protocoles d'extraction, il a été préféré le suivi de la concentration en méthylmercure, plutôt que la teneur totale en mercure, afin de s'assurer du respect de la spéciation tout au long du protocole. A l'issue des mises en solution, les surnageants sont dosés par étalonnage externe. Cette valeur est ramenée à la concentration initiale contenue dans la prise d'essai et corrigée du taux d'humidité de l'échantillon (déterminée selon la même procédure que pour le sélénium). Pour évaluer le rendement d'extraction du protocole, cette concentration est ramenée à la valeur de référence fournie par le certificat.

La Figure 3 présente les résultats obtenus sur les protocoles accompagnés de leur écart-type (n=3).

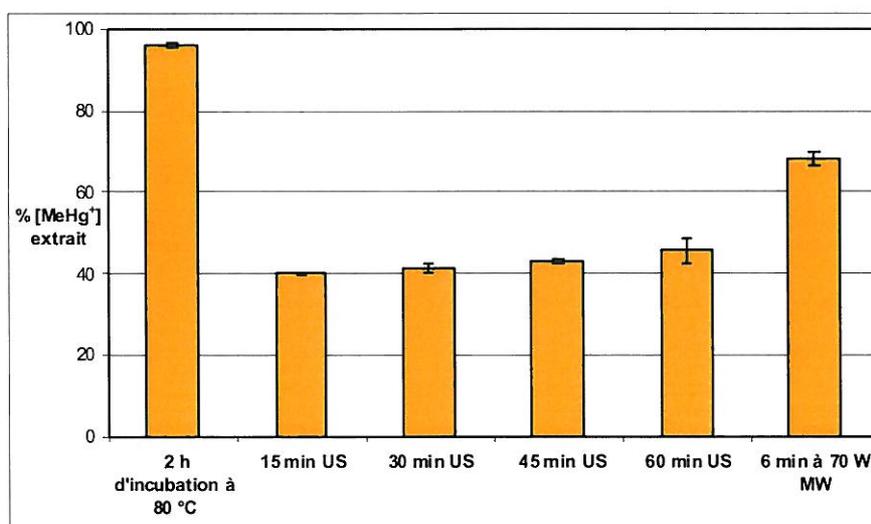


Figure 3 : Efficacité d'extraction des protocoles testés

L'observation des résultats obtenus pour l'utilisation des ultrasons (US) montre que ce mode opératoire ne permet pas une amélioration de la mise en solution, le rendement d'extraction augmente avec le temps d'action mais pour atteindre un maximum de 45 %. Cette technique n'étant pas concluante pour accélérer efficacement le traitement de l'échantillon, elle est abandonnée pour la suite des tests.

L'action du champ micro-onde par contre semble intéressante car avec seulement 6 min d'action à une puissance de 70 W, un rendement de 70 % est obtenu. Il a donc été choisi d'optimiser son action avec des essais portant sur différents temps d'exposition (6 min et 11 min) et pour différentes puissances d'ondes (70, 100, 140 et 210 W).

La Figure 4 présente les résultats obtenus accompagnés de leur écart-type (n=3).

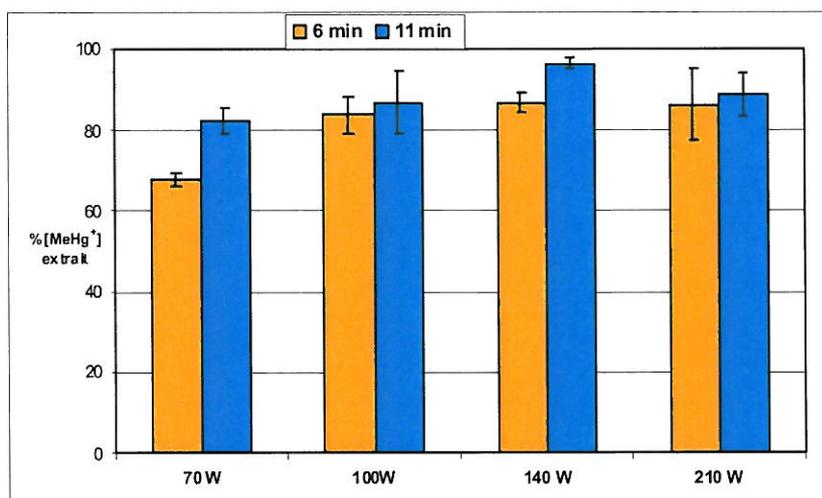


Figure 4 : Efficacité d'extraction des protocoles utilisant les micro-ondes

L'extraction quantitative est atteinte pour 140 W de puissance. Au-delà de cette puissance, l'efficacité de l'extraction diminue ce qui peut être expliquée par une possible déméthylation de MeHg⁺ au cours du traitement.

Une fois le protocole expérimental établi, le dosage du méthylmercure par dilution isotopique (DI) et spectrométrie de masse ICP/MS a été mis en place. Cette technique est capable de résultats de haute exactitude et traçables aux unités du système international (SI) et reconnue par le CCQM comme méthode de mesure primaire.

Le mode opératoire de la DI repose sur la modification du rapport isotopique naturel de l'échantillon à travers l'ajout d'une espèce avec un rapport isotopique modifié et connu. La mesure de la proportion entre les deux populations permet d'obtenir la teneur d'analyte initiale.

Des essais avec l'utilisation de deux espèces marquées ont aussi été réalisés. Ce mode de dosage a permis d'étudier d'éventuelles conversions d'espèces par des phénomènes de méthylation et/ou déméthylation. La validation du processus a été faite par l'analyse de plusieurs MRC se présentant sous la forme de poudre lyophilisée, BCR 463, 464 et Dolt-4 ou sous forme de chairs fraîches SRM-1946, -1947, tous caractérisés pour la fraction de masse de mercure total et méthylmercure (BCR 463).

Les tableaux 2 à 6 récapitulent les résultats sur les deux espèces obtenus par double dilution isotopique ainsi que les valeurs certifiées. Les incertitudes indiquées sont des incertitudes élargies (k=2).

Tableau 2: Concentrations mesurées dans le BCR-463

	Valeur mesurée mg(Hg)/kg	incertitude mg(Hg)/kg	Valeur certifiée mg(Hg)/kg	Incertitude mg(Hg)/kg
MeHg ⁺	2.87	± 0.19	2.83	± 0.15
Hg totale	2.807	± 0.097	2.85	± 0.16

Tableau 3 : Concentrations mesurées dans le BCR-464

	Valeur mesurée mg(Hg)/kg	incertitude mg(Hg)/kg	Valeur certifiée mg(Hg)/kg	Incertitude mg(Hg)/kg
MeHg ⁺	5.12	± 0.29	5.12	± 0.16
Hg totale	5.20	± 0.22	5.24	± 0.10

Tableau 4 : Concentrations mesurées dans le Dolt-4

	Valeur mesurée mg(Hg)/kg	incertitude mg(Hg)/kg	Valeur certifiée mg(Hg)/kg	Incertitude mg(Hg)/kg
MeHg ⁺	1.434	± 0.078	1.33	± 0.12
Hg totale	2.76	± 0.17	2.58	± 0.22

Tableau 5 : Concentrations mesurées dans le SRM-1946

	Valeur mesurée mg(Hg)/kg	incertitude mg(Hg)/kg	Valeur certifiée mg(Hg)/kg	Incertitude mg(Hg)/kg
MeHg ⁺	0.407	± 0.040	0.394	± 0.015
Hg totale	0.448	± 0.017	0.433	± 0.009

Tableau 6 : Concentrations mesurées dans le SRM-1947

	Valeur mesurée mg(Hg)/kg	incertitude mg(Hg)/kg	Valeur certifiée mg(Hg)/kg	Incertitude mg(Hg)/kg
MeHg ⁺	0.256	± 0.027	0.233	± 0.010
Hg totale	0.264	± 0.015	0.254	± 0.005

3. EVALUATION DES INCERTITUDES

L'association de l'incertitude au résultat d'une mesure est une étape essentielle pour assurer la traçabilité et la comparabilité des valeurs et pour démontrer la validation de la méthode appliquée.

La démarche élaborée dans le cadre de la présente étude pour associer une incertitude repose sur la méthode analytique préconisée par le GUM (Guide to the expression of Uncertainty in Measurement).

Il est possible de découper le calcul de l'incertitude en quatre étapes :

1. Définition du mesurande avec l'écriture du modèle mathématique le représentant. Chaque grandeur d'entrée du modèle est estimée et la valeur du résultat (mesurande) est déterminée.
2. Evaluation de l'incertitude-type de chaque grandeur d'entrée : à chaque paramètre de l'équation de C_{ech} est associé son type de variable.
3. Détermination de l'incertitude-type composée du résultat grâce à la loi de propagation des incertitudes qui donne la valeur de la variance (égale à l'incertitude-type au carré) de C_{ech} :

$$V(C_{ech}) = u^2(C_{ech}) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 \times u^2(x_i)$$

Avec :

- x_i paramètre de l'équation de C_{ech}
- $u(C_{ech}), u(x_i)$ incertitude-type de C_{ech} OU x_i
- $V(C_{ech})$ variance de C_{ech}
- f équation mathématique de C_{ech} .

4. Expression du résultat accompagné de son incertitude élargie. Cette grandeur définit un intervalle, autour du résultat d'un mesurage, dont on peut s'attendre à ce qu'il comprenne une fraction élevée de la distribution des valeurs qui pourraient être attribuées raisonnablement au mesurande.

Cette approche pour l'évaluation des incertitudes est intéressante car elle nous permet d'évaluer le poids des différentes composantes de l'incertitude du résultat traduisant de l'importance du paramètre sur l'expression finale de U , à travers les coefficients de sensibilité $(\partial f / \partial x_i)$.

4. CONCLUSIONS

L'analyse de spéciation est un des grands challenges de la chimie analytique moderne. Les mécanismes d'accumulation ou d'expulsion d'élément toxique comme le mercure à travers un organisme sont très dépendants de l'espèce chimique considérée. L'information apportée par la détermination totale d'un élément n'est pas suffisante pour établir sa toxicité.

Cette étude a montré les capacités de la technique par micro ondes pour l'extraction des différentes espèces du mercure dans un matériau de poisson lyophilisé certifié en méthylmercure sans affecter les espèces du mercure. Typiquement la méthode validée dans cette étude nécessite moins d'une heure pour la préparation de l'échantillon en seulement une seule étape avant l'analyse par couplage HPLC-ICP/MS comparée à celle beaucoup plus longue comportant deux étapes (extraction puis dérivation) habituellement mise en œuvre pour une analyse par couplage GC-ICP/MS. Le couplage HPLC-ICP/MS présente donc une bonne alternative aux techniques plus conventionnelles.

La validation du protocole analytique a été effectuée sur des MRC avec l'établissement d'un budget complet d'incertitudes, approche GUM. La traçabilité des mesures est obtenue par la mise en œuvre de la méthode par dilution isotopique et spectrométrie de masse ICP/MS en prenant soin de prendre en compte l'ensemble des sources d'incertitudes.

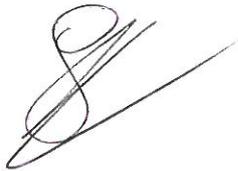
5. REFERENCES

1. AFSSA, Avis relative à la réévaluation des risques sanitaires du méthylmercure liés à la consommation des produits de la pêche au regard de la nouvelle dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP), 16 mars 2004.
2. L. Boszke, High-Performance Liquid Chromatography as a Valuable Tool for Determination of Mercury Species in Environmental Samples. A Review, *Chemia Analytyczna*, 2005, 50, 489-505.
3. T.W. Clarkson, *The Three Modern Faces of Mercury*, *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110, 11-23.
4. D.A. Cristol, R.L. Brasso, A.M. Condon, R.E. Fovargue, S.L. Friedman, K.K. Hallinger, A.P. Monroe, A.E. White, *The Movement of Aquatic Mercury Through Terrestrial Food Webs*, *Science*, 2008, 320, 335.
5. R. Dietz, F. Riget, M. Cleemann, A. Aarkrog, P. Johansen, J.C. Hansen, *Comparison of contaminants from different trophic levels and ecosystems*, *The Science of the Total Environment*, 2000, 245, 221-231.
6. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food*, *The EFSA Journal*, 2004, 34, 1-14.
7. P. A. Galindo, F. Feo, R. García, E. Gómez, J. Borja, F. Fernández, *Mercurochrome allergy. Immediate and delayed hypersensitivity*, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1997, 52, 1138-1141.
8. M. Gochfeld, *Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56, 174-179.
9. S.C. Hight, J. Cheng, *Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation*, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 567, 160-172.
10. M. Horvat, D. Gibicar, *Speciation of Mercury: Environment, Food, Clinical, and Occupational Health* dans "Handbook of Elemental Speciation II", ed. John Wiley and Sons, LTD, Angleterre, 2005.
11. INERIS, *Mercurure et ses dérivés*, Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Version N°3.1 novembre 2006.
12. ISO/CEI Guide 99 :2007, Vocabulaire international de métrologie (VIM).
13. ISO Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure 1995.
14. P. Jitaru, *Ultra-trace speciation analysis of mercury in the environment*, Thèse de doctorat de l'Université d'Anvers, 2004.
15. P.A. Maxson, *Global mercury production, use and trade* dans "Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales: Atmospheric Processes and Human Exposures Around the World", ed. Springer, Etats-Unis, 2005.
16. D. Mergler, H.A. Anderson, L. Hing Man Chan, K.R. Mahaffey, M. Murray, M. Sakamoto, A.H. Stern, *Methylmercury Exposure and Health Effects in Humans: A Worldwide Concern*, *Ambio*, 2007, 36, 3-11.
17. M. Monperrus, *Utilisation de traceurs isotopiques stables pour la spéciation du mercure et des butylétains Application à l'étude de la biométhylation du mercure dans les environnements aquatiques*, Thèse de doctorat de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2004.
18. J.O. Nriagu, *A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals*, *Nature*, 1989, 338, 47-49.
19. E. G. Pacyna, J.M. Pacyna, *Global emission of mercury from anthropogenic sources in 1995*, *Water, Air and Soil Pollution*, 2002, 137, 149-165.

20. J.M. Pacyna, J. Munthe, K. Larjava, E. G. Pacyna, *Mercury emissions from anthropogenic sources: estimates and measurements in Europe* dans "Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales: Atmospheric Processes and Human Exposures Around the World", ed. Springer, Etats-Unis, 2005.
21. E. G. Pacyna, J.M. Pacyna, F. Steenhuisen, S. Wilson, *Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000*, Atmospheric Environment, 2006, 40, 4048-4063.
22. J. Qvarnström, *On the reliability of methods for the speciation of mercury based on chromatographic separation coupled to atomic spectrometric detection*, Thèse de doctorat de l'Université de Umea, 2003.
23. S. Sannac, *Développement d'un protocole métrologique pour l'analyse de spéciation du sélénium et du mercure dans des matrices environnementales par HPLC-ID-ICP-MS*. Thèse de doctorat du LNE et de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, en rédaction.
24. E.D. Stein, Y. Cohen, A.M. Winer, *Environmental Distribution and Transformation of Mercury Compounds*, Critical Reviews in Science and Technologies, 1996, 26, 1-43.
25. E. Tessier, *Etude de la réactivité et du transfert du tributylétain et du mercure dans les environnements aquatiques*, Thèse de doctorat de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2004.
26. WHO, *Environmental Health Criteria 1, Mercury*, ed. World Health Organisation, Suisse, 1976.
27. WHO, *Environmental Health Criteria 86, Mercury-Environmental Aspects*, ed. World Health Organisation, Suisse, 1989.
28. WHO, *Environmental Health Criteria 101, Methylmercury*, ed. World Health Organisation, Suisse, 1990.

Paris, le 28 avril 2009

**La Responsable du
Pôle Chimie et Biologie**



Sophie VASLIN-REIMANN

**La Responsable du Département
Biomédical et Chimie Inorganique**



Paola FISICARO