

## Métaux

### Méthode d'analyse dans le biote

#### Références de la méthode

<b>La méthode qui suit est dérivée de la publication suivante</b>	Chiffolleau J.-F., Auger D., Chartier E. et Grouhel A. Dosage de certains métaux traces dans (Ag, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, V, Zn) dans les organismes marins par absorption atomique. Ed Ifremer, 2002, 36p.
<b>Norme française et/ou européenne dont est tirée la méthode</b>	NF EN ISO 17294-2, avril 2005, pour le dosage des métaux (dans les eaux)
<b>Niveau de validation selon Norman</b>	Niveau 2
<b>Code SANDRE de la méthode</b> (suivant niveau de validation)	

#### Généralités

<b>Nom de la famille de substances</b>	Métaux
<b>Nom des substances individuelles</b>	Cr, Ni, Co, Cu, Zn, As, Cd, Pb
<b>Code(s) SANDRE des substances individuelles</b>	Chrome : 1389 Nickel : 1386 Cobalt : 1379 Cuivre : 1392 Zinc : 1383 Arsenic : 1369 Cadmium : 1388 Plomb : 1382
<b>Matrice analysée</b>	Biote : Végétal Poisson Mollusque Crustacé
<b>Acronyme</b>	ICP-MS

<b>Principe de la méthode</b>	<p>L'échantillon préparé, séché et homogénéisé en vue d'obtenir une prise d'essai représentative est soumis à l'action d'acide nitrique concentré par chauffage soit dans un four micro-ondes dans un réacteur fermé soit avec un bloc chauffant.</p> <p>Le choix de la méthode de minéralisation dépend des organismes ou de la quantité d'échantillon disponible :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- faibles masses (20 à 100 mg), micro-onde (mini réacteurs) ou bloc chauffant (utilisé avec la méthode appropriée)</li> <li>- masses élevées (&gt; 100 mg), micro-onde (creusets) ou bloc chauffant (utilisé avec la méthode appropriée)</li> </ul> <p>L'extrait est ensuite dilué et ajusté au volume dans un tube en polypropylène puis analysé par ICP-MS</p>
<b>Domaine d'application</b>	<p>Borne inférieure : LQ (dépend de chaque élément analysé) Borne supérieure : dépend de la prise d'essai, du volume de minéralisation et de la dilution de l'échantillon</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- cas de la méthode mini réacteurs (micro-onde) et de la méthode 1 (bloc chauffant), pour une prise d'essai de 100 mg et sans dilution de l'échantillon : <b>30 mg/kg</b></li> <li>- cas de la méthode creusets (micro-onde) et de la méthode 2 (bloc chauffant), pour une prise d'essai de 200 mg et sans dilution de l'échantillon : <b>50 mg/kg</b></li> </ul>
<b>Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse</b>	Mesure pourcentage d'humidité résiduelle
<b>Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pour éviter les contaminations, manipuler sous hotte à flux laminaire.</li> <li>- Le matériel est nettoyé avant utilisation (ou son absence de contamination a été vérifiée)</li> <li>- Le matériel est manipulé et stocké avec les précautions nécessaires pour éviter la contamination (éviter le contact avec les mains, protéger le matériel contre les poussières et les graisses entre deux utilisations, etc)</li> <li>- Les réactifs utilisés doivent être de pureté suffisante afin qu'ils n'introduisent pas d'erreur significative dans l'analyse.</li> </ul>

**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

<b>Fraction analysée :</b>	Biote : Corps entier Muscle
<b>Conditionnement et conservation des échantillons</b> - Protocole :	Pour toutes les fractions : les échantillons, s'ils ne peuvent être analysés rapidement ( <i>étude de stabilité en cours</i> ), doivent être congelés avant l'étape de lyophilisation.

<p>- Nature du contenant de stockage :</p>	<p>Dans le cas de prises d'essai faibles, il faut s'assurer de l'homogénéité de l'échantillon. On la vérifie en faisant des réplicats d'analyse.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Les bryophytes sont lavés soigneusement sur site (avec l'eau du milieu) afin d'en extraire le maximum de corps étrangers puis au laboratoire avec de l'eau déminéralisée jusqu'à élimination de toutes les particules solides (dans les 2 cas jusqu'à ce que l'eau renouvelée reste claire) puis triés pour sélectionner les pousses vertes et séchés à l'étuve à 50°C jusqu'à déshydratation complète. Ils sont ensuite broyés avec un broyeur en agate.</li> <li>- Les organismes de petite taille (chironomes, oligochètes ...) sont conditionnés dans des cryotubes en polypropylène puis lyophilisés.</li> <li>- Les organismes de plus grande taille suivent le même processus que les plus petits mais, après la lyophilisation, ils sont broyés le plus finement possible puis homogénéisés.</li> </ul> <p>Les échantillons sont conditionnés dans des tubes ou flacon en polypropylène.</p>
<p>- Lavage du contenant :</p> <p>- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :</p>	<p>Cas des cryotubes en polypropylène : lavés à l'acide, rincés à l'eau déminéralisée et à l'eau ultra-pure.</p> <p><i>En cours</i></p>
<p><b>Filtration :</b></p> <p>- Type de filtre et méthode de nettoyage :</p> <p>- Type de support de filtration :</p>	
<p><b>Pré-traitement des échantillons liquide ou solide</b></p>	<p>Séchage (soit par lyophilisation soit en étuve) puis broyage.</p>

## Analyse

<p><b>Volume ou masse de la prise d'essai (mL ou mg selon la phase analysée)</b></p>	<p>Biote : Végétal <b>100 à 300 mg</b></p> <p>Poisson / Mollusque / Crustacé :</p> <p><b>20 à 100 mg avec minéralisation par micro-onde avec mini-réacteurs</b></p> <p><b>100 à 200 mg avec minéralisation par micro-onde avec creusets</b></p> <p><b>20 à 200 mg avec minéralisation par bloc chauffant</b></p>
<p><b>Dérivation</b></p> <p>- Conditions (réactifs, solvants, pH, température et durée)</p>	

<b>Extraction</b>	S/O																																
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Liquide / Liquide (préciser la nature et le volume du solvant)</li> <li>- Micro-onde (préciser la nature et le volume du solvant ainsi que les paramètres d'utilisation de l'appareil)</li> <li>- SPE (préciser le type de cartouche, la nature et les volumes des solvants de lavage et d'élution)</li> <li>- PFE ( T°C, P, solvant d'extraction, nombre de cycles, % de flush)</li> <li>- Micro extraction (support, durée d'exposition, température, sel)</li> <li>- Autre (préciser)</li> </ul>																																	
<b>Purification</b>	S/O																																
(type de purification, paramètres de purification, méthode d'évaporation)																																	
<b>Conservation de l'extrait</b>																																	
<b>Minéralisation</b>	Deux méthodes de minéralisation peuvent être utilisées selon l'organisme analysé ou la quantité d'échantillon disponible.																																
Type d'appareil utilisé (1)	Minéralisation avec <b>digesteur micro-ondes</b> CEM : Mars 5 HP-500 Plus. Programme de minéralisation pour les 2 cas : mini-réacteurs (de 7 mL) et creusets (de 100 mL)																																
Durée et température et de minéralisation (1) :	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Puissance</th> <th rowspan="2">Rampe (min)</th> <th rowspan="2">Pression (bar)</th> <th rowspan="2">Temp °C Control</th> <th rowspan="2">Palier (min)</th> </tr> <tr> <th>MAX</th> <th>%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>1200W</b></td> <td><b>100</b></td> <td><b>05:00</b></td> <td><b>24.16</b></td> <td><b>050</b></td> <td><b>05:00</b></td> </tr> <tr> <td><b>1200W</b></td> <td><b>100</b></td> <td><b>05:00</b></td> <td><b>24.16</b></td> <td><b>100</b></td> <td><b>05:00</b></td> </tr> <tr> <td><b>1200W</b></td> <td><b>100</b></td> <td><b>05:00</b></td> <td><b>24.16</b></td> <td><b>140</b></td> <td><b>20:00</b></td> </tr> <tr> <td><b>1200W</b></td> <td><b>100</b></td> <td><b>10:00</b></td> <td><b>24.16</b></td> <td><b>160</b></td> <td><b>20:00</b></td> </tr> </tbody> </table>	Puissance		Rampe (min)	Pression (bar)	Temp °C Control	Palier (min)	MAX	%	<b>1200W</b>	<b>100</b>	<b>05:00</b>	<b>24.16</b>	<b>050</b>	<b>05:00</b>	<b>1200W</b>	<b>100</b>	<b>05:00</b>	<b>24.16</b>	<b>100</b>	<b>05:00</b>	<b>1200W</b>	<b>100</b>	<b>05:00</b>	<b>24.16</b>	<b>140</b>	<b>20:00</b>	<b>1200W</b>	<b>100</b>	<b>10:00</b>	<b>24.16</b>	<b>160</b>	<b>20:00</b>
Puissance		Rampe (min)	Pression (bar)					Temp °C Control	Palier (min)																								
MAX	%																																
<b>1200W</b>	<b>100</b>	<b>05:00</b>	<b>24.16</b>	<b>050</b>	<b>05:00</b>																												
<b>1200W</b>	<b>100</b>	<b>05:00</b>	<b>24.16</b>	<b>100</b>	<b>05:00</b>																												
<b>1200W</b>	<b>100</b>	<b>05:00</b>	<b>24.16</b>	<b>140</b>	<b>20:00</b>																												
<b>1200W</b>	<b>100</b>	<b>10:00</b>	<b>24.16</b>	<b>160</b>	<b>20:00</b>																												
Réactifs utilisés (1) :	acide nitrique 65% SUPRAPUR : 2 ou 3 mL pour la méthode mini-réacteurs et 8 à 10 mL pour la méthode utilisant les creusets (varier le volume pour recouvrir la totalité de l'échantillon)																																
<b>Minéralisation</b>	Minéralisation avec <b>bloc chauffant</b> CAS Hotblock																																
Type d'appareil utilisé (2)	Minéralisation à froid pendant 1 heure																																
Durée et température et de minéralisation (2) :	Minéralisation à 90°C pendant 3 heures																																
Réactifs utilisés (2) :	5 mL acide nitrique 65% SUPRAPUR																																

<b>Volume ou masse finale avant analyse :</b>	<p>Volume de l'extrait avant analyse :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 15 mL (compléter le minéralisat avec de l'eau ultra-pure pour atteindre ce volume) : cas des mini-réacteurs (micro-onde) et bloc chauffant si la prise d'essai est entre 20 et 100 mg</li> <li>- 50 mL (compléter le minéralisat avec de l'eau ultra-pure pour atteindre ce volume) : cas des creusets (micro-onde) et bloc chauffant si la prise d'essai est &gt; 100 mg</li> </ul> <p>Volume utilisé lors du dosage par ICP-MS : 10 mL</p>
<b>Méthode analytique utilisée</b> 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	<p>ICP-MS (NF EN ISO 17294-2 avril 2005)</p> <p>Analyse selon 2 modes :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mode normal pour les éléments non interférés et mode CCT (Chambre de Collision Réaction) pour les éléments interférés (Cr et As).</li> <li>- mode CCT : ajout d'un mélange de gaz He/H<sub>2</sub> pendant l'analyse pour corriger les interférences polyatomiques.</li> </ul>
<b>Equipement <sup>1</sup> (modèles utilisés) :</b>	ICP-MS X Series II Thermo Fisher Scientific
<b>Type d'étalonnage</b>	Externe
<b>Modèle utilisé</b> <b>Etalons / Traceurs utilisés</b> <b>Domaine de concentration</b>	<p>Linéaire</p> <p>Y, Rh et Ho pour corriger les effets de matrice et la dérive de l'appareil</p> <p>Cd : 0,01-200 µg/L</p> <p>Cr, Ni, Co, Cu, As et Pb : 0,1-200 µg/L</p> <p>Zn : 0,5-200 µg/L</p>
<b>Méthode de calcul des résultats</b> Rendement Blancs	<p>Utilisation du rendement : Non</p> <p>Soustraction du blanc : Oui quand il est supérieur à 10 % de la concentration de l'échantillon.</p>

## Paramètres de validation de la méthode

<b>Norme utilisée</b>	XP T90-210, 1996 (selon les plans d'expérience A et B)
<b>Modèle utilisé</b>	Linéaire
<b>Domaine de validation</b>	0-200 µg/L

<sup>1</sup> 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

**Matériaux de référence certifiés utilisés**

NIST 2976 : tissus de moule,  
IAEA 407 : poissons,  
BCR 278 (IRMM) : moules,  
TORT 2 (CNRC) : hépatopancreas de homard,  
BCR 414 (IRMM) : plancton,  
BCR 60 (IRMM) : plante aquatique.

**Blancs analytiques**  
(concentration ou résultat maximum acceptable)

Les blancs sont vérifiés systématiquement et doivent être inférieurs à la LQ

**Rendement**

Les concentrations sont données en mg/kg (poids sec). Résultats obtenus pour la méthode petits réacteurs.

*En cours.*

**- par type de matrice**

		NIST 2976	IAEA 407	BCR 278	TORT 2	BCR 414	BCR 60
Cr	Conc théorique	0,50 ± 0,16	0,73 ± 0,44	0,78 ± 0,06	0,77 ± 0,15	23,8 ± 1,2	non certifié
	Conc observée	0,43 ± 0,14 n=3	0,58 ± 0,35 n=24	0,65 ± 0,10 n=4	0,85 ± 0,40 n=30	26,7 ± 0,5 n=3	
Ni	Conc théorique	0,93 ± 0,12	0,60 ± 0,36	non certifié	2,50 ± 0,19	18,8 ± 0,8	non certifié
	Conc observée	0,71 ± 0,25 n=3	0,42 ± 0,24 n=22		2,46 ± 1,08 n=30	20,9 ± 0,8 n=3	
Co	Conc théorique	0,61 ± 0,02	0,10 ± 0,04	non certifié	0,51 ± 0,09	non certifié	non certifié
	Conc observée	0,44 ± 0,00 n=3	0,10 ± 0,05 n=25		0,49 ± 0,14 n=30		
Cu	Conc théorique	4,02 ± 0,33	3,28 ± 0,80	9,45 ± 0,13	106 ± 10	29,5 ± 1,3	51,2 ± 1,9
	Conc observée	3,83 ± 0,56 n=3	2,88 ± 0,78 n=26	9,77 ± 0,06 n=3	103 ± 16 n=30	30,8 ± 1,8 n=10	47,4 ± 4,5 n=11
Zn	Conc théorique	137 ± 13	67,1 ± 7,6	83,1 ± 1,7	180 ± 6	112 ± 3	313 ± 8
	Conc observée	140 ± 13 n=3	65,1 ± 15,8 n=24	85,2 ± 10,5 n=3	195 ± 27 n=30	113 ± 7 n=10	307 ± 17 n=9
As	Conc théorique	13,3 ± 1,8	12,6 ± 2,4	6,07 ± 0,13	21,6 ± 1,8	6,82 ± 0,28	non certifié
	Conc observée	12,9 ± 0,08 n=3	12,2 ± 2,4 n=25	6,31 ± 1,36 n=4	21,3 ± 4,1 n=30	7,62 ± 0,46 n=10	
Cd	Conc théorique	0,82 ± 0,16	0,189 ± 0,038	0,348 ± 0,007	26,7 ± 0,6	0,383 ± 0,014	2,2 ± 0,1
	Conc observée	0,84 ± 0,05 n=3	0,177 ± 0,034 n=27	0,333 ± 0,044 n=4	28,4 ± 4,8 n=30	0,414 ± 0,035 n=3	2,26 ± 0,03 n=2
Pb	Conc théorique	1,19 ± 0,18	0,12 ± 0,12	2,0 ± 0,04	0,35 ± 0,13	3,97 ± 0,19	63,8 ± 3,2
	Conc observée	0,98 ± 0,05 n=3	0,11 ± 0,08 n=23	1,71 ± 0,12 n=4	0,37 ± 0,19 n=47	3,38 ± 1,47 n=3	63,3 ± 2,8 n=2

**- par niveau de concentration**
**- par molécule**

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

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

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

Méthode : mode de détermination d'une LQ pré-supposée. De l'eau ultra-pure est dopée et dosée, la LQ est ensuite rapportée à la masse (ce test est impossible à réaliser sur des échantillons réels car il n'y en a pas si peu contaminés en As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb ou Zn).

Résultats obtenus pour la méthode petits réacteurs.

Pour une prise d'essai de 30 mg :

**Spécificité de la méthode  
(préciser la matrice)**

Cd, la LQ est de 0,03 mg/kg  
Cr, Ni, Co, Cu, As et Pb, la LQ est de 0,05 mg/kg  
Zn, la LQ est de 0,25 mg/kg

Testée : Oui (méthode petits réacteurs) dans tissus de moule, poissons, hépatopancreas de homard, plancton et plante aquatique.

**Incertitudes (%) sur les  
résultats**

Incertitude élargie (%) obtenue par l'approche « contrôle interne ». Résultats obtenus pour la méthode petits réacteurs.  
*En cours.*

- par type de matrice

- par niveau de

concentration

- par molécule

(reproductibilité avec méthode de détermination)

Elément	As			
Niveau concentration (mg/kg)	0.05 à 1	1 à 10	10 à 50	>50
Carte autocontrôle MRC animal			20	
Carte autocontrôle MRC végétal		6		

Elément	Cd			
Niveau concentration (mg/kg)	0.03 à 1	1 à 10	10 à 50	>50
Carte autocontrôle MRC animal	19		17	
Carte autocontrôle MRC végétal	8	1		

Elément	Co			
Niveau concentration (mg/kg)	0.05 à 1	1 à 10	10 à 50	>50
Carte autocontrôle MRC animal	42			
Carte autocontrôle MRC végétal		1		

Elément	Cr			
Niveau concentration (mg/kg)	0.05 à 1	1 à 10	10 à 50	>50
Carte autocontrôle MRC animal	53			
Carte autocontrôle MRC végétal			2	

Elément	Cu			
Niveau concentration (mg/kg)	0.05 à 1	1 à 10	10 à 50	>50
Carte autocontrôle MRC animal		27		18
Carte autocontrôle MRC végétal			8	

Elément	Ni			
Niveau concentration (mg/kg)	0.05 à 1	1 à 10	10 à 50	>50
Carte autocontrôle MRC animal	54	43		
Carte autocontrôle MRC végétal			4	

Elément	Pb			
Niveau concentration (mg/kg)	0.05 à 1	1 à 10	10 à 50	>50
Carte autocontrôle MRC animal	60			
Carte autocontrôle MRC végétal		44		4

Elément	Zn			
Niveau concentration (mg/kg)	0.25 à 10		10 à 50	>50
Carte autocontrôle MRC animal				20
Carte autocontrôle MRC végétal				6

## Contacts

<b>Auteurs</b>	Marina Coquery
<b>Institut</b>	Cemagref Lyon
<b>Adresses mail</b>	<a href="mailto:marina.coquery@cemagref.fr">marina.coquery@cemagref.fr</a>