

6 polybromodiphényléthers, 17 polychlorobiphényles et 8 pesticides organochlorés

Méthode d'analyse dans le biote

Généralités

Nom de la famille de substances	Polybromodiphényléthers (PBDEs), Polychlorobiphényles indicateurs (PCBs I), Polychlorobiphényles Dioxin-like (PCBs DL), Organochlorés (OCI)
Nom des substances individuelles	PBDEs : BDE 28, BDE 47, BDE 99, BDE 100, BDE 153, BDE 154 PCBs I: PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 180 PCBs DL : PCB 77, PCB 81, PCB 105, PCB 123, PCB 126, PCB 156, PCB 157, PCB 167, PCB 169, PCB 189 OCI : Hexachlorobenzène (HCB), Hexachlorobutadiène (HCBD), pp' DDT, op' DDT, pp' DDE, pp' DDD, γ Hexachlorocyclohexane (γ-HCH), Pentachlorobenzène (PeCB)
Code SANDRE des substances individuelles	BDE 28 : 2920 BDE 47 : 2919 BDE 99 : 2916 BDE100 : 2915 BDE 153 : 2912 BDE154 : 2911 PCB 28 : 1239 PCB 52 : 1241 PCB 101 : 1242 PCB 118 : 1243 PCB 138 : 1244 PCB 153 : 1245 PCB 180 : 1246 PCB 77: 1091 PCB 81: 5432 PCB 105: 1627 PCB 123: 5434 PCB 126: 1089 PCB 156: 2032 PCB 157: 5435 PCB 167: 5436 PCB 169: 1090 PCB 189: 5437 HCB: 1199 HCBD: 1652 pp' DDT: 1148 op' DDT: 1147 pp' DDE: 1146 pp' DDD: 1144 γ-HCH: 1203 PeCB: 1888
Matrice analysée	Biote : Poisson [4]

[code SANDRE du (des) support(s)]	Macro invertébrés aquatiques [13] (corbicules, pisidiums, dreissenes, gammares)
Principe de la méthode	- Congélation, lyophilisation, broyage et homogénéisation de l'échantillon - Extraction par fluide pressurisé PFE - Attaque acide et centrifugation de l'extrait - Purification sur phase solide SPE - Dosage par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD)
Acronyme	PFE/SPE/GC-ECD
Domaine d'application	Les limites de quantification sont de l'ordre du ng/g poids sec. Les concentrations maximales retrouvées avoisinent les 400 ng/g poids sec.
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Si résultats à normaliser par g de matière grasse ou en poids frais : Pourcentage de matière grasse (pour poids d'échantillon disponible > 1g) Pourcentage d'humidité (pour poids d'échantillon disponible > 1g)
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	Toute la verrerie doit être maintenue dans un parfait état de propreté. Pour cela, après lavage à la machine (détergent puis acide acétique utilisé comme neutralisant), toute la verrerie est rincée à l'acétone d'une pureté conforme à l'analyse d'ultra traces. Le sable d'Ottawa doit être calciné dans un four à moufle (450°C pendant 4h) puis rincé à l'acétone afin de s'assurer de l'élimination de tous les interférents possibles. Ce sable est ensuite stocké dans un flacon en verre placé dans une étuve à 50°C. Etant donné la volatilité de certains organochlorés, il est primordial de ne pas évaporer les extraits à sec. Afin d'éviter la dégradation du pp'-DDT en pp'-DDE et en pp'-DDD, tous les extraits et solutions devront être conservés dans des flacons en verre ambré au congélateur. Cette précaution, nous permet aussi d'éviter la possible photolabilité de certains PBDE.
Interférents	Interférents identifiés : Interférent présent sur le PeCB lorsque le sable d'Ottawa est mal calciné. Si la quantité d'échantillon est suffisante, l'extraction est refaite, mais dans le cas des invertébrés ou la prise d'essai est souvent inférieure à 0.5 g, la quantification du PeCB se fait après soustraction de la concentration de l'interférent. Matrices testées : Notre protocole a été testé sur des échantillons de poissons (Brèmes, Chevaines) ainsi que sur des échantillons d'invertébrés (Gammares, Dreissenes, Corbicules, Pisidiums) prélevés dans le Rhône.

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 :
[code SANDRE de la (des)
fraction(s)]

Biote : Poissons (Muscle, [102])
Invertébrés : corps entier non dé-coquillé (pisidium) [121]
corps entier (gammare) [119]
corps entier dé-coquillé (dreissènes, corbicules)
[176]

**Conditionnement et
conservation des échantillons**
- Protocole :

Invertébrés (Gammare):
Congeler les échantillons de gammare à -20°C. Lyophiliser les échantillons (3 à 4 jours) à -60°C sous une pression de 0,035 mbar. Cette durée peut varier suivant la quantité d'échantillon à lyophiliser. Déterminer le poids sec par pesée puis broyer et homogénéiser manuellement avec un pilon. Stocker les échantillons dans un flacon en verre ambré au dessiccateur jusqu'à analyse.

Poissons :

Découper les filets sur poisson frais. Peser les filets pour déterminer le poids frais et les congeler à -20°C. Lyophiliser les filets (3 à 4 jours) à -60°C sous une pression de 0,035 mbar. Cette durée peut varier suivant la quantité d'échantillon à lyophiliser. Déterminer le poids sec par pesée, broyer et homogénéiser au broyeur à billes. Stocker les échantillons dans un flacon en verre ambré au dessiccateur jusqu'à analyse, pour une durée indéterminée.

- Nature du contenant
de stockage :

Flacons en verre ambré avec bouchon en polypropylène

- Lavage du contenant :

Lavage à la machine (avec détergent puis acide acétique)
Rinçage à l'acétone « pour analyse de résidus ».

Filtration :

S/O

**Pré-traitement des échantillons
liquide ou solide**

L'échantillon est congelé à environ -20°C, puis lyophilisé.

Analyse

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

Biote : Poissons / Macro invertébrés (500 mg poids sec)

Extraction

Extraction PFE avec cellule de 11 ml :
Les cellules utilisées sont préalablement nettoyées au détergent, puis rincées à l'eau et à l'acétone avant de subir un cycle d'extraction à l'ASE® avec un mélange Cyclohexane/Acétone (70/30).

Protocole d'extraction :

Placer 1 filtre en cellulose au fond de la cellule PFE ainsi qu'une petite quantité (une spatule environ) de sable d'Ottawa. Peser

environ exactement 0,5 g d'échantillon directement dans la cellule. Ajouter 100 μ L (poissons) ou 50 μ L (macroinvertébrés) d'une solution de traceurs analytiques (BDE 77, PCB 34, PCB 119, PCB 141, PCB 198, PCB 209) à 1 mg/L dans l'isooctane. L'ensemble est laissé en contact à l'air libre jusqu'à évaporation du solvant (10 min environ). Rajouter une petite quantité (2 spatules environ) de sable puis homogénéiser à l'aide d'une petite spatule. Compléter le volume restant de la cellule avec du sable d'Ottawa et tasser le tout. Placer ensuite un filtre en cellulose sur le dessus et bien tasser le tout avant de refermer la cellule. Le programme d'extraction est le suivant :

durée (min)	étape
5	Préchauffage
5	Chauffage à 100°C
5	Phase statique avec un mélange cyclohexane/acétone (70/30, v/v) (100°C, 100 bars) pendant 5 minutes puis vidange (60% du volume de la cellule). Cycle répété 3 fois
1	Purge

Evaporer sous pression réduite sur système Syncore® (Büchi) puis finir l'évaporation sous courant d'azote (jusqu'au volume résiduel de matière grasse).

Purification

Première étape : Attaque acide pour éliminer les graisses

Ajouter 1 mL de cyclohexane à l'extrait obtenu précédemment. Acidifier avec 0,5 mL d'acide sulfurique concentré puis passer le tube au vortex.

Centrifuger (15 min à 2000 g à 6°C) et récupérer le surnageant. Renouveler l'opération 3 fois et regrouper les 3 fractions de surnageant organique.

Evaporer sous flux d'azote jusqu'à environ 1 mL.

Deuxième étape : Purification par SPE manuelle

Sur cartouches Florisil®, 1 g, 6 mL.

Conditionnement : 8 mL d'un mélange cyclohexane/DCM (95 :5 ; v/v) puis 8 mL de cyclohexane.

Percolation : Déposer l'extrait sur la cartouche. Rincer le tube contenant l'extrait avec 0,5 mL de cyclohexane puis déposer les 0,5 mL sur la cartouche.

Elution : 2*2,5 mL d'un mélange cyclohexane/DCM (95 :5 ; v/v)

Ajouter 50 μ L (poisson) ou 25 μ L (macroinvertébrés) de dodécane (keeper).

Evaporer l'extrait sous azote jusqu'à environ 50 μ L (poissons) ou 25 μ L (macroinvertébrés). Reprendre avec 950 μ L (échantillon de poisson) ou 475 μ L (échantillon d'invertébrés) d'une solution d'étalons internes (tetrachloroxylène TCX + octochloronaphtalène OCN) à 10,5 μ g/L dans l'isooctane

Conservation de l'extrait	3 mois au congélateur -20°C																																	
Volume ou masse finale avant analyse :	1 mL (Poissons) et 0.5 mL (Macroinvertébrés)																																	
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	Quantification : Colonne RTX®-5 (Restek) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm + 10 m de colonne de garde. Température injecteur : 280°C Température détecteur : 300°C Programmation de température : <table><tr><th>Température (°C)</th><th>Rampe (°C/min.)</th><th>Durée (min.)</th></tr><tr><td>80</td><td></td><td>1.0</td></tr><tr><td>150</td><td>20</td><td>5.0</td></tr><tr><td>220</td><td>20</td><td>0.0</td></tr><tr><td>260</td><td>2</td><td>0.0</td></tr><tr><td>300</td><td>20</td><td>5.0</td></tr></table> Temps total d'analyse: 40 min Volume d'injection : 2 µL Mode d'injection : splitless Confirmation : Colonne RTX®-PCB (Restek) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm + 10 m de colonne de garde. Température injecteur : 280°C Température détecteur : 300°C Programmation de température <table><tr><th>Température (°C)</th><th>Rampe (°C/min.)</th><th>Durée (min.)</th></tr><tr><td>80</td><td></td><td>1.0</td></tr><tr><td>240</td><td>20</td><td>0.0</td></tr><tr><td>280</td><td>2</td><td>0.0</td></tr><tr><td>300</td><td>20</td><td>10.0</td></tr></table> Temps d'analyse : 40 min Volume d'injection : 2 µL Mode d'injection : splitless	Température (°C)	Rampe (°C/min.)	Durée (min.)	80		1.0	150	20	5.0	220	20	0.0	260	2	0.0	300	20	5.0	Température (°C)	Rampe (°C/min.)	Durée (min.)	80		1.0	240	20	0.0	280	2	0.0	300	20	10.0
Température (°C)	Rampe (°C/min.)	Durée (min.)																																
80		1.0																																
150	20	5.0																																
220	20	0.0																																
260	2	0.0																																
300	20	5.0																																
Température (°C)	Rampe (°C/min.)	Durée (min.)																																
80		1.0																																
240	20	0.0																																
280	2	0.0																																
300	20	10.0																																
Equipements ¹ (modèles utilisés) :	GC/ECD (CP 3800 Varian).																																	
Type d'étalonnage	Interne																																	
Modèle utilisé	Quadratique Etalon interne (OCN)																																	
Etalons / Traceurs utilisés	Traceurs de méthode (PCB 34, PCB 119, PCB141, PCB 198, PCB 209 et BDE 77)																																	
Domaine de concentration	De 1 à 400 ng/g poids sec Les limites de quantification sont de l'ordre du ng/g poids sec. Les concentrations maximales avoisinent les 400 ng/g poids sec.																																	

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

Méthode de calcul des résultats**Rendement**

Utilisation du rendement :

Pour assurer la justesse de la mesure :

- 1^{ère} correction : Chaque concentration est corrigée par le rendement d'extraction de l'analyte considéré, déterminé lors de la validation.
- 2^{ème} correction : Avant toute extraction, on dope l'échantillon avec les traceurs de méthode (PCB 34, 119, 141, 198, BDE 77). Chaque analyte est associé à un traceur de méthode (5 traceurs pour 31 analytes). Ces traceurs nous permettent de vérifier le bon déroulement de notre protocole analytique complet. Chaque concentration mesurée est corrigée par rapport au rendement d'extraction du traceur qui lui est associé.
- On effectue une double quantification, sur deux colonnes chromatographiques différentes. Si le biais obtenu est acceptable (RPD < 25% au-delà de 5 fois la limite de quantification, sinon RPD < 40%), on effectue la moyenne pour rendre le résultat final.

Blancs

Un blanc appareillage est effectué à chaque série d'analyses afin de vérifier la propreté de l'appareillage utilisé. La concentration mesurée doit être inférieure à la LQ.

Un blanc méthode est réalisé à chaque série. Pour ce faire, mettre du sable d'Ottawa dans une cellule PFE puis appliquer la totalité du protocole. La concentration mesurée doit être inférieure à la LQ.

Soustraction du blanc : effectuée si la contamination présente une concentration supérieure à la LQ (cas rare, observé avec le PeCB que lorsque la calcination de sable est partielle)

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

F. Bordet, D. Inthavong, J. Mallet, L. Maurice, Analysis of traces of organo-chloride pesticides and of polychloro-biphenyls in foods of animal origin. Multiresidue rapid method. Study of the repeatability and improvement of purification, Analusis, 1996, vol 24, 328-333.

Labadie Pierre ; Alliot Fabrice ; Bourges Catherine, Desportes Annie, Chevreuil Marc, Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: Case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons, Analytica Chimica Acta, 2010, vol 675, 97-105.

Norme dont est tirée la méthode

/

Niveau de validation selon Norman

Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode**Norme utilisée**

Adaptation de la NF T90-210 (mai 2009)

Domaine de validation

De 0,5 à 200 ng/g pour les invertébrés
De 1 à 400 ng/g pour les poissons

Matériaux de référence utilisés

Un même échantillon de gammarex prélevés dans le Rhône a été extrait (avec et sans dopage) et analysé à chaque série d'analyse. Cet échantillon nous a servi à établir des cartes de contrôles.

Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)

< LQ

Rendement

Une matrice de référence « interne » a été analysée (dopée et non dopée) en 4 réplicats (avec trois opérateurs différents, à des dates différentes et sur du matériel différent, i.e. extractions ASE® faites dans un autre laboratoire).

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous

Niveau de dopage 40 ng/g

Colonne RTX-5 (n = 8)		
Composé	Rendement moyen (%)	CV (%)
HCb	46	14
PeCB	90	4
HCBd	92	6
Gamma HCH	99	7
PCB 34	101	5
PCB 28	91	7
PCB 52	87	4
PCB 101	86	4
PCB 119	100	7
pp DDE + PCB 81	97	9
PCB 77	90	3
PCB 123	106	3
PCB 118	90	6
BDE 28	99	3
pp DDD	102	7
op DDT	102	10
PCB 153	84	6
PCB 105	97	8
PCB 141	98	9
pp DDT	103	9
PCB 138	90	10
PCB 126	85	3
PCB 167	83	4
PCB 156	73	4
PCB 157	77	2
PCB 180	66	4
BDE 47	68	3
PCB 169	73	1
PCB 198	63	12
BDE 77	56	3
PCB 189	69	3
BDE 100	70	4
BDE 99	67	5
PCB 209	76	18
BDE 154	92	4
BDE 153	99	5

Colonne RTX-PCB (n = 8)		
Composé	Rendement moyen (%)	CV (%)
HCb	39	2
PeCB	74	7
HCBD	90	7
Gamma HCH	95	3
PCB 34	92	6
PCB 28	80	8
PCB 52	77	8
PCB 101	83	3
PCB 119	97	3
pp DDE	96	7
PCB 81	89	2
PCB 77	98	3
PCB 123	93	4
op DDT	108	12
PCB 118	89	6
BDE 28	94	2
PCB 153	91	6
pp DDD	104	8
PCB 141	84	6
PCB 105	83	3
PCB 138 + pp DDT	80	11
PCB 126	63	3
PCB 167	72	3
PCB 156	51	4
PCB 157 + PCB180	60	8
BDE 47	62	4
PCB 198	60	6
PCB 169	63	2
BDE 77	68	5
PCB 189	61	5
BDE 100	66	3
BDE 99	69	4
PCB 209	73	1
BDE 154	82	6
BDE 153	82	6

Limite de quantification(LQ)

Les LQ n'ont pas pu être estimées selon la norme T 90-210 puisque nous n'avons pas encore trouvé de matrices non contaminées. Pour estimer nos LQ, nous avons choisi le premier point de gamme confirmé et nous l'avons corrigé du rendement. Les LQ ainsi estimées sont consignées dans le tableau des incertitudes ci-dessous.

Incertitudes (%) sur les résultats

Méthode d'évaluation : Une matrice de référence « interne » a été analysée (dopée et non dopée) à chaque série d'extraction. Les résultats ont servi à établir une carte de contrôle.
Facteur d'élargissement : $k = 2$

- par niveau de concentration
(reproductibilité avec méthode de détermination)

	LQ estimée (ng/g poids sec)	Niveau Bas Matrice interne de référence non dopée (n=20, n=19' ou n=14*)	
		Valeur cible (ng/g poids sec)	Incertitudes élargies relatives (2CVR) (%)
HCb	2,4	nd	
PeCB	0,6	nd	
HCBD	0,5	1,2	30,5'
g-HCH	0,5	1,5	22
PCB 28	0,6	9,6	17
PCB 52	0,6	12,2	15,5
PCB 101	0,6	14,7	14
pp-DDE	0,5	5,1	23
PCB 81	0,5	4	35,5
PCB 77	0,5	nd	
PCB 123	0,5	nd	
PCB 118	0,5	8,9	21,5
BDE 28	0,5	nd	
pp-DDD	0,5	nd	
op-DDT	0,5	1,8	53*
PCB 153	0,5	16,2	12,5
PCB 105	0,6	2,3	49,5
pp-DDT	0,6	4,2	16*
PCB 138	0,6	14,2	17
PCB 126	0,7	nd	
PCB 167	0,7	nd	
PCB 156	0,8	nd	
PCB 157	0,7	nd	
PCB 180	0,8	2,0	43,5
PBDE 47	0,8	7,1	28
PCB 169	0,7	nd	
PCB 189	0,8	nd	
PBDE 100	0,7	2,9	29,5
PBDE 99	0,7	2,5	32
PBDE 154	0,6	nd	
PBDE 153	1,1	nd	

nd : non déterminé

		Niveau Haut Matrice interne de référence dopée (n=19 ou n=14*)	
	LQ estimée (ng/g poids sec)	Valeur cible (ng/g poids sec)	Incertitudes élargies relatives (2CVR) (%)
HCB	2,4	46,3	45,5
PeCB	0,6	41,7	15,5
HCBD	0,5	43	17,5
g-HCH	0,5	42,5	14,5
PCB 28	0,6	48,9	14,5
PCB 52	0,6	51,7	16,5
PCB 101	0,6	54,7	13,5
pp-DDE	0,5	44,9	19
PCB 81	0,5	43,6	14,5
PCB 77	0,5	41,3	23,5
PCB 123	0,5	39,6	19,5
PCB 118	0,5	47,8	14
BDE 28	0,5	40,7	17
pp-DDD	0,5	39,3	15,5
op-DDT	0,5	44,6	32,5
PCB 153	0,5	54,8	16
PCB 105	0,6	41,9	15,5
pp-DDT	0,6	44,9	17*
PCB 138	0,6	52,4	15
PCB 126	0,7	39,7	17,5
PCB 167	0,7	39,6	14,5
PCB 156	0,8	40,5	16,5
PCB 157	0,7	41,2	20,5
PCB 180	0,8	43,6	20,5
PBDE 47	0,8	48,2	15
PCB 169	0,7	40,6	15
PCB 189	0,8	41	13
PBDE 100	0,7	45,2	20,5
PBDE 99	0,7	45,3	20,5
PBDE 154	0,6	42,5	21
PBDE 153	1,1	42,1	22

Contacts

Auteurs	F. Serveto et C. Miège
Institut	IRSTEA (ex Cemagref) Lyon
Contact	cecile.miege@irstea.fr