

Hexabromocyclododécane (HBCDD) Méthode d'analyse dans les biotes (poisson).

Généralités	
Nom de la famille de substances	Hexabromocyclododécanes
Nom des substances individuelles	<p>α-hexabromocyclododécane (α-HBCDD)</p> <p>β-hexabromocyclododécane (β-HBCDD)</p> <p>γ-hexabromocyclododécane (γ-HBCDD)</p>
Code SANDRE des substances individuelles	<p>Mélange des 3 isomères (α, β et γ-hexabromocyclododécane) : [7128]</p> <p>α-hexabromocyclododécane : [6651] (CAS : 134237-50-6)</p> <p>β-hexabromocyclododécane : [6652] (CAS : 134237-51-7)</p> <p>γ-hexabromocyclododécane : [6653] (CAS : 134237-52-8)</p>
Matrice analysée [code SANDRE du support]	Poisson : [4]
Principe de la méthode	<p>Extraction solide-liquide (ESL) des composés d'intérêt par du pentane, purification de l'extrait à l'acide sulfurique, et analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLHP/ SM-SM) par ionisation avec électrobulbation (ElectroSpray Ionization, ESI) en mode négatif.</p> <p>Pour la quantification, des étalons internes analogues à chaque isomère sont recommandés. Pour réduire les coûts d'analyse, l'utilisation d'un seul étalon interne (le β-HBCDD-$^{13}\text{C}_{12}$) est possible mais cela augmente l'incertitude de mesure à tous niveaux de concentration.</p>
Acronyme	ESL/CLHP/SM-SM
Domaine d'application	De 10 ng/g à 80 ng/g de masse d'échantillon humide (testé jusqu'à cette limite mais le domaine d'application est potentiellement plus large)
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	<p>Taux d'humidité (expression éventuelle des résultats en ng/g de poids sec)</p> <p>Pourcentage de lipides (normalisation interne éventuelle)</p>

Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode

Le choix de la méthode analytique par CHLP/SM-SM au dépens de la méthode CG/SM-NCI (chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse et ionisation chimique négative) fréquemment citée dans la littérature, est motivé par l'instabilité de l'HBCDD lorsqu'il est soumis à des températures supérieures à 160°C. Les diastéréoisomères de l'HBCDD sont thermiquement labiles, les températures habituellement appliquées à l'injecteur et au four du CG peuvent le dégrader en pentabromocyclododécène (PBCDe) et en tétrabromocyclododécadiène (TBCDe). Par ailleurs la méthode CHLP/SM-SM permet l'emploi d'HBCDD ¹³C comme traceur permettant de corriger des pertes lors de l'extraction et de la purification mais également d'éventuelles variations de réponse occasionnées par la matrice par suppression de signal dans la source ESI. ⁽¹⁾

Interférents (préciser la matrice)

Pas d'Interférents identifiés
Matrices testées : Truite et épinouche.

1. "Fluorinated, brominated and chlorinated contaminants in fish for human consumption - methods and measurement", Stefan van Leeuwen, Ed. Wellington Laboratories, ISBN: 978-90-8891-108-8, 2009

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 :	Muscle de poisson : [102]
Conditionnement et conservation des échantillons - Protocole : - Nature du contenant de stockage : - Lavage du contenant : - Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :	<p>Ne pas congeler avant dissection. Conservation de l'échantillon disséqué, broyé et homogénéisé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, à l'abri de la lumière.</p> <p>Préparation : disséquer, broyer/homogénéiser. Flacon de 100 mL en verre ambré ou protégé de la lumière par une feuille d'aluminium. Bouchon à visser; opercule en aluminium entre le col du flacon et le bouchon Flacons et opercules en aluminium calcinés 8 heures à $500\text{ }^{\circ}\text{C}$.</p> <p>Congélation après préparation.</p>
Filtration :	Pas de filtration.
Pré-traitement des échantillons liquide ou solide	Dissection, homogénéisation de l'échantillon par broyage

Analyse

Masse de la prise d'essai (g).	Muscle de poisson broyé : 5 g de matière humide
Dérivation	Sans objet.
Extraction - Solide / Liquide	<ol style="list-style-type: none"> Ajout des étalons internes (volume de dopage de $20\text{ }\mu\text{L}$ d'un mélange des 3 isomères de l'HBCDD marqués à $5\text{ ng}/\mu\text{L}$ chacun dans le méthanol) aux 5 g d'échantillon humide. homogénéisation ; contact statique de 15 min avant de passer à l'étape suivante. Ajouter 20mL d'acétone. Agitation mécanique 5 min par agitation oscillante Ajouter 20 mL de pentane. Agitation mécanique 5 min par agitation oscillante Ajouter 20 mL d'eau. Agitation mécanique 5 min par agitation oscillante Prélever le surnageant (pentane) avec la phase intermédiaire (émulsion) se trouvant entre le pentane et le mélange eau/acétone, volume récupéré de ~ 20 à 35 mL. Transférer dans un tube de centrifugation adéquat. Centrifugation 10 min à 3500 g Récupérer le surnageant (pentane) dans un tube de centrifugation de 50 mL. Procéder à la purification, 2 types de purification sont possibles en fonction des moyens disponibles : <ul style="list-style-type: none"> - Conserver l'extrait pentane ($\sim 15\text{ mL}$) en l'état et passer à l'étape de purification par destruction des lipides à l'acide

Purification
-Par destruction des lipides à l'acide sulfurique concentré.

sulfurique concentré.

- Si purification par GPC (chromatographie par perméation de gel), concentrer l'extrait et reprendre par 1 mL de dichlorométhane.

1. Ajouter 1 mL d'acide sulfurique à 98% à la phase pentane récupérée, boucher.
2. Agitation mécanique pendant 5 min par agitation type Vortex à 2500 rpm. La précipitation des corps gras est observée.
3. Centrifugation 10 min à 5000 g.
4. Récupérer le surnageant (pentane) et le transférer dans un tube de centrifugation de 50 mL.
5. Recommencer les étapes 1 à 4 sur le surnageant pentane et transférer le surnageant dans un nouveau tube de 50 mL.
6. Ajouter 10 mL d'eau, boucher.
7. Agitation mécanique 5 min par agitation type Vortex à 2500 rpm
8. Centrifugation 10 min à 5000 g.
9. Récupérer le surnageant (pentane) et le transférer dans un tube de 50 mL.
10. Concentration à sec sous flux d'azote.
- 11 Si des gouttelettes de corps gras sont visuellement perceptibles sur les parois du tube, remettre 15 mL de pentane, agiter et recommencer une nouvelle étape de destruction des lipides résiduels (étapes de 1 à 4).
12. Sinon reprendre par 1 mL de méthanol.

-Séparation des lipides par GPC

Une méthode alternative de purification est la chromatographie par perméation de gel (GPC) ou chromatographie d'exclusion stérique (CES), elle permet de séparer les lipides des isomères de l'HBCDD par exclusion stérique.

Injection de 1 mL d'extrait dans le DCM et séparation sur colonne en verre (460 mm x 26 mm) remplie de copolymère de styrène divinylbenzène (Bio-Beads SX-3, 200-400 Mesh). L'élution est réalisée au dichlorométhane à 5 ml / min. Récupérer l'extrait après les 35 premières minutes d'élution sur la colonne pendant 21 minutes (temps d'élution et durée de collecte à déterminer précisément selon configuration du système).

Après la GPC, concentration de l'extrait et reprise par 1 mL de méthanol

Conservation de l'extrait

Pour cette étude, les extraits ont été conservés à 4°C immédiatement après leur préparation, pendant un délai maximum de 12 heures.

Minéralisation

Sans objet

Volume ou masse finale avant analyse :

1 mL dans le méthanol.

Méthode analytique utilisée :**•Conditions chromatographiques :**

1. Colonne : XBridge® C₁₈ (150 mm x 2,1 mm-3,5 µm ; Waters®), thermostatée à 30 °C.
2. Méthode d'élution en mode gradient avec rinçage de la colonne en fin de gradient:

Temps (min.)	Solvant A : Méthanol (%)	Solvant B : Acétonitrile à 0,1 % d'acide acétique (%)	Solvant C : H ₂ O à 10 mM d'acétate d'ammonium (%)	Débit (mL/min)	Etape
0	56	24	24	0,4	Elution des composés d'intérêt
9	70	30	/	0,4	
14	70	30	/	0,4	Rinçage et reconditionnement de la colonne de chromatographie
16	56	24	20	0,4	
19	56	24	20	0,4	

3. Volume d'injection : 10 µL.

•Conditions spectrométriques :

1. Mode d'ionisation : ESI(-),
2. Tension du capillaire : 2,5 kV,
3. Température de la source : 150 °C,
4. Température du gaz de désolvatation (N₂) : 450 °C,
5. Débit en gaz de désolvatation (N₂) : 750 L/h,
6. Débit en gaz rideau (N₂) : 50 L/h,
7. Mode d'acquisition : MRM (Multiple Reaction Monitoring),
8. Débit en gaz de collision (Argon) : 0,17 mL/min

Composés	Temps de rétention (min)	Ion précurseur (m/z)	Transition (m/z)	Dwell Time (s)	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)
α-HBCDD	3.8	640,6	640,6 > 78,9 ^a	0,1	24	13
	3.8	638,6	638,6 > 78,9 ^b	0,1	24	13
α-HBCDD- ¹³ C ₁₂	3.8	652,6	652,6 > 78,9 ^a	0,1	22	13
	3.8	650,6	650,6 > 78,9 ^b	0,1	22	13
β-HBCDD	4.3	640,6	640,8 > 78,9 ^a	0,1	24	13
	4.3	638,6	638,6 > 78,9 ^b	0,1	24	13
β-HBCDD- ¹³ C ₁₂	4.3	652,6	652,6 > 78,9 ^a	0,1	22	13
	4.3	650,6	650,6 > 78,9 ^b	0,1	22	13
γ-HBCDD	4.9	640,6	640,8 > 78,9 ^a	0,1	24	13
	4.9	638,6	638,6 > 78,9 ^b	0,1	24	13
γ-HBCDD- ¹³ C ₁₂	4.9	652,6	652,6 > 78,9 ^a	0,1	22	13
	4.9	650,6	650,6 > 78,9 ^b	0,1	22	13

^a : Transition de quantification

^b : Transition de confirmation

Equipements ¹ (modèles utilisés) :	Chromatographe : UPLC Acquity® (WATERS®). Spectromètre de masse : Triple quadripôle, ACQUITY® TQD (WATERS®).
Type d'étalonnage	Interne
Modèle utilisé Etalons / Traceurs utilisés	Linéaire pondéré α -HBCDD- ¹³ C ₁₂ : traceur d'extraction β -HBCDD- ¹³ C ₁₂ : traceur d'extraction γ -HBCDD- ¹³ C ₁₂ : traceur d'extraction
Domaine de concentration	Gamme d'étalonnage préparée dans le méthanol, de 20 à 250 µg/L.
Méthode de calcul des résultats	Calcul des résultats par étalonnage interne (EI) en mode linéaire. Pour l'étalonnage interne, il est recommandé d'utiliser des analogues marqués au ¹³ C pour chaque isomère comme traceur. L'utilisation d'un seul étalon interne (le β -HBCDD- ¹³ C ₁₂) est possible mais cela augmente l'incertitude de mesure à tous niveaux de concentration.
Rendement Blancs	Pas de correction du rendement Matrices testées : muscle de truite et muscle d'épinoche. Blanc instrumental : injection de méthanol ; pas d'effet mémoire : le résultat est inférieur à la limite de détection pour chacun des 3 composés. Blanc Matrice (muscle de truite et muscle d'épinoche) : analyse de matrice vierge; le résultat est inférieur à la limite de détection pour chacun des 3 composés.

Références de la méthode

La méthode est dérivée de la publication suivante	S. Morris, P. Bersuder, C.R. Allchin, B. Zegers, J.P. Boon, P.E.G. Leonards, J. de Boer: "Determination of brominated flame retardant, hexabromocyclododecane, in sediments and biota by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry" Trends in Analytical Chemistry, Vol. 25, N°4, 2006.
Norme dont est tirée la méthode	Sans objet.
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1

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

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée

Norme NF T 90-210 (Mai 2009)

Domaine de validation

α -HBCDD, β -HBCDD et γ -HBCDD: 10 à 80 ng/g poids humide. Purification par destruction des lipides à l'acide sulfurique concentré.

Matériaux de référence utilisés

Pas de matériau de référence disponible.

Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)

Blancs méthodes et échantillons analysés inférieurs à la LQ/3.

Rendement

- par molécule

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

Détermination suivant NF T90-210 (2009) réalisée par ajout d'une quantité connue de chacun des 3 isomères de l'HBCDD dans les biotes (par dilution isotopique)
Nombre d'essais par niveau de concentration : 2 répétitions/jour pendant 5 jours.

Valeur des niveaux (ng/g poids humide exprimée en dopant ajouté)	α -HBCDD		β -HBCDD		γ -HBCDD	
	Rdt (n=10)	Ecart type (n=10)	Rdt (n=10)	Ecart type (n=10)	Rdt (n=10)	Ecart type (n=10)
10 (LQ)	99%	8%	101%	8%	95%	9%
20	99%	7%	98%	5%	96%	5%
30	100%	10%	101%	6%	102%	4%
80	101%	9%	101%	5%	97%	6%

Limite de quantification(LQ)

LQ : Détermination suivant NF T90-210 (2009) réalisée par ajout d'une quantité connue de chacun des 3 isomères dans les biotes
Nombre d'essais à la LQ : 2 répétitions/jour pendant 5 jours.
Valeur définie quelque soit le choix du traceur d'extraction.

Composés	LQ (ng/g poids humide)
α -HBCDD	10
β -HBCDD	10
γ -HBCDD	10

Incertitudes (%) sur les résultats

- par molécule
(reproductibilité avec méthode de détermination)

Estimation des incertitudes réalisée à partir des données de fidélité interne par interpolation à différents niveaux de concentration couvrant le domaine de la méthode.

Facteur d'élargissement : $k = 2$

Nombre d'essais par niveau de concentration : 2 répétitions/jour pendant 5 jours.

Matrice : muscle de truite

Valeur des niveaux : (ng/g poids humide exprimé en dopant ajouté)

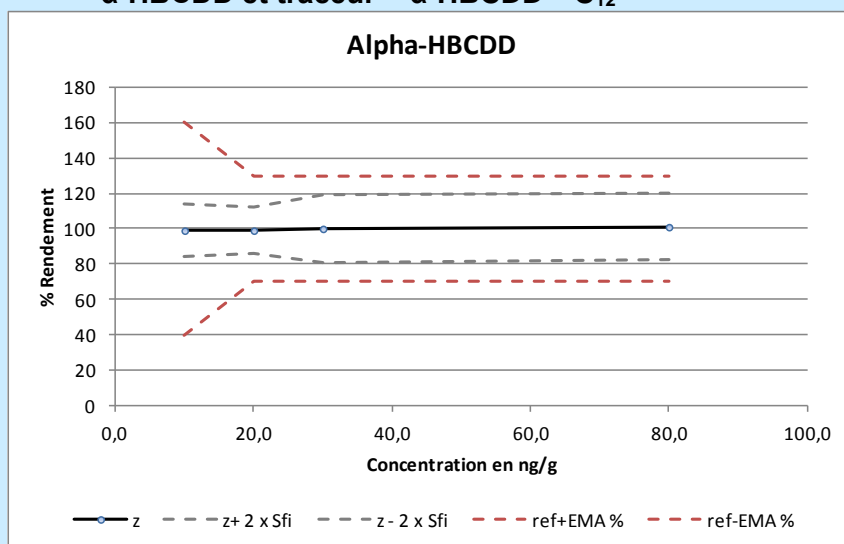
En noir trait plein : recouvrement (justesse)

En gris trait pointillé : Valeur haute et basse de fidélité intermédiaire

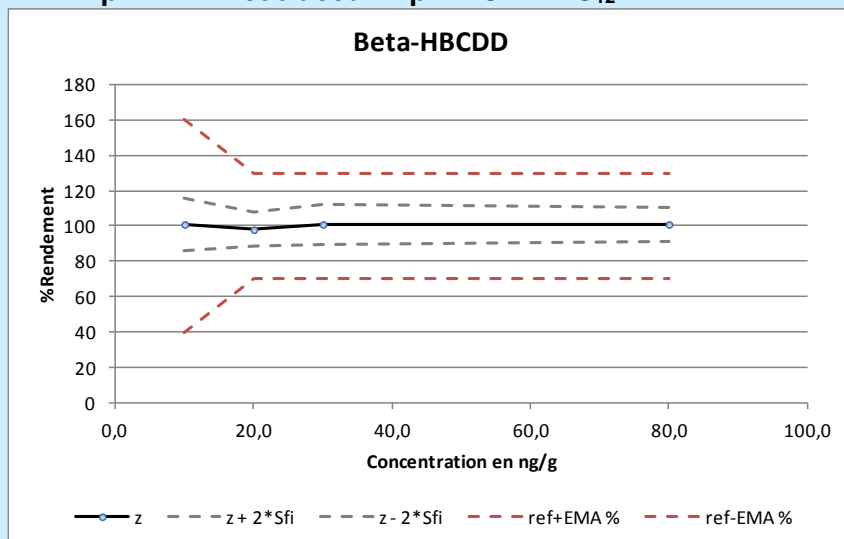
En rouge trait pointillé : Limite haute et basse d'acceptabilité

1. Résultats avec 3 traceurs d'extraction.

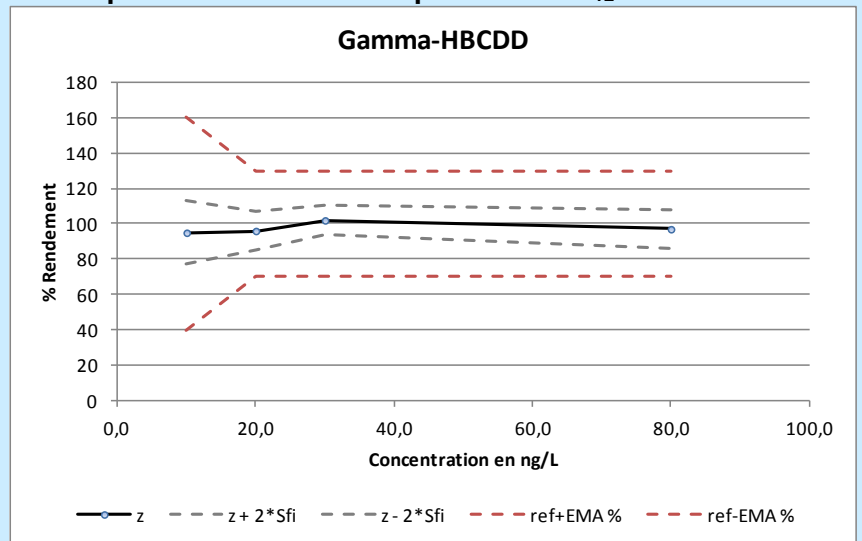
- **α -HBCDD et traceur = α -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$**



- **β -HBCDD et traceur = β -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$**

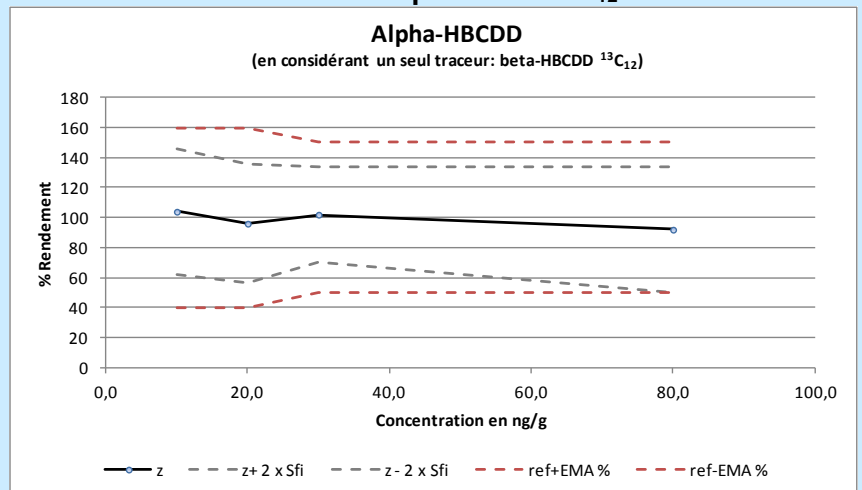


• γ -HBCDD et traceur = γ -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$

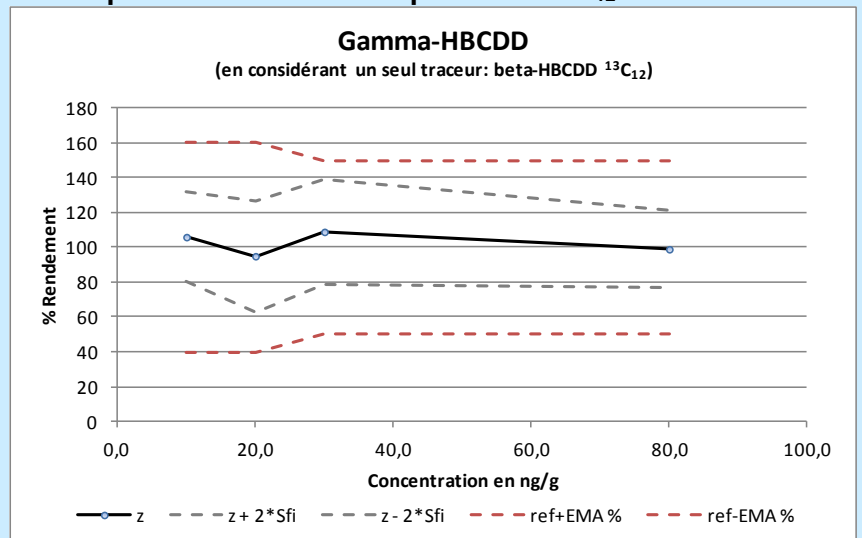


2. Résultats avec le β -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$ comme seul traceur d'extraction.

• α -HBCDD et traceur = β -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$



• γ -HBCDD et traceur = β -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$



Rendu des résultats en HBCDD total

La Directive Cadre Eau impose un rendu en somme des isomères du HBCDD.

Pour la détermination de la limite de quantification, les limites de quantification obtenues pour chaque congénère sont ajoutées ce qui pour cette méthode produit :

$$LQ \text{ (HBCDD)} = 30 \text{ ng/g (poids humide)}$$

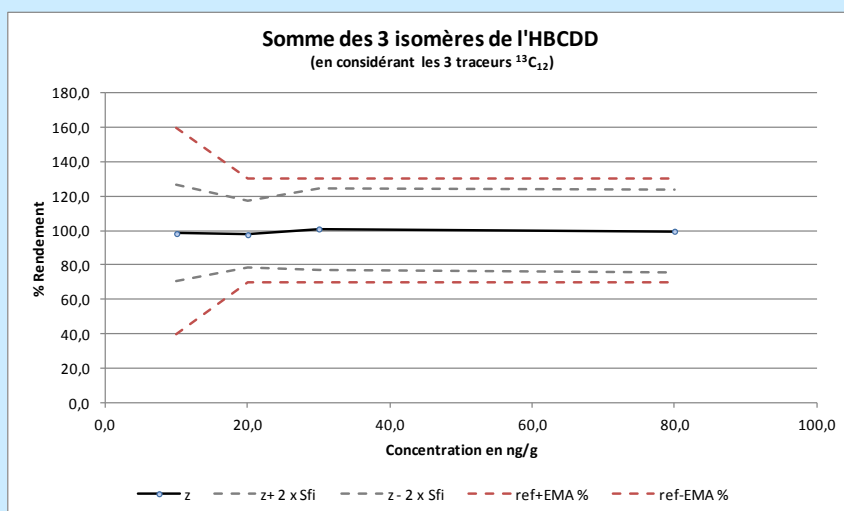
(valeur de NQE pour le HBCDD = 167 ng/g poids humide ; 1/3 NQE = 55 ng/g poids humide)

Pour rendre une valeur globale en HBCDD :

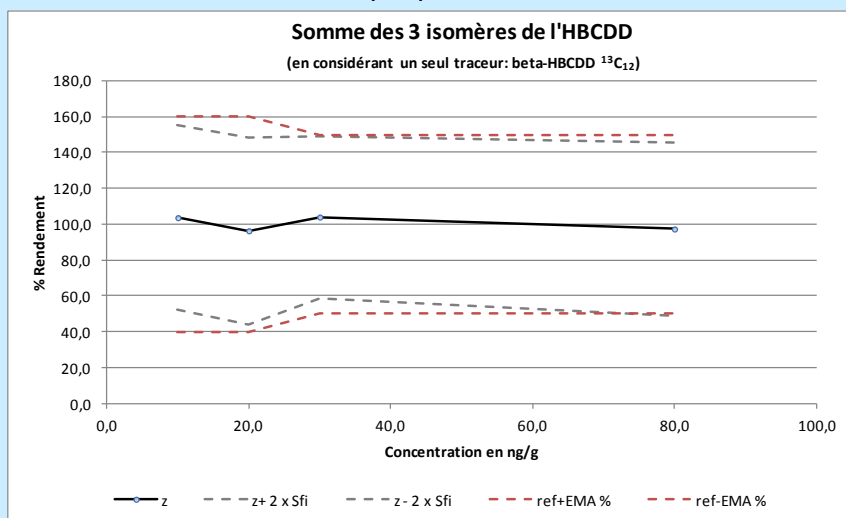
- Dans le cas où la concentration quantifiée pour chaque congénère est supérieure à leur LQ respective, effectuer la somme des 3 isomères.
- Dans le cas où seul un ou 2 congénères sont quantifiés avec une concentration >LQ. Alors, par précaution, une valeur de LQ sera attribuée pour les ou les congénères non quantifié (s). Une somme des concentrations des 3 congénères est effectuée selon ces considérations.
- Si aucun des 3 isomères n'est quantifié, la concentration sera indiquée en <LQ (de la somme des LQ des 3 congénères).

L'incertitude du résultat rendu pour le HBCDD total est calculée comme la somme quadratique de l'incertitude de chaque isomère à leur valeur mesurée.

1. dans le cas où chaque isomère est quantifié par rapport à son homologue marqué en $^{13}\text{C}_{12}$:



2. dans le cas où chaque isomère est quantifié par rapport au seul traceur marqué β -HBCDD- $^{13}\text{C}_{12}$:



Contacts

Auteurs

Claudine CHATELLIER, François LESTREMAU

Institut

INERIS

Contact

francois.lestremau@ineris.fr