

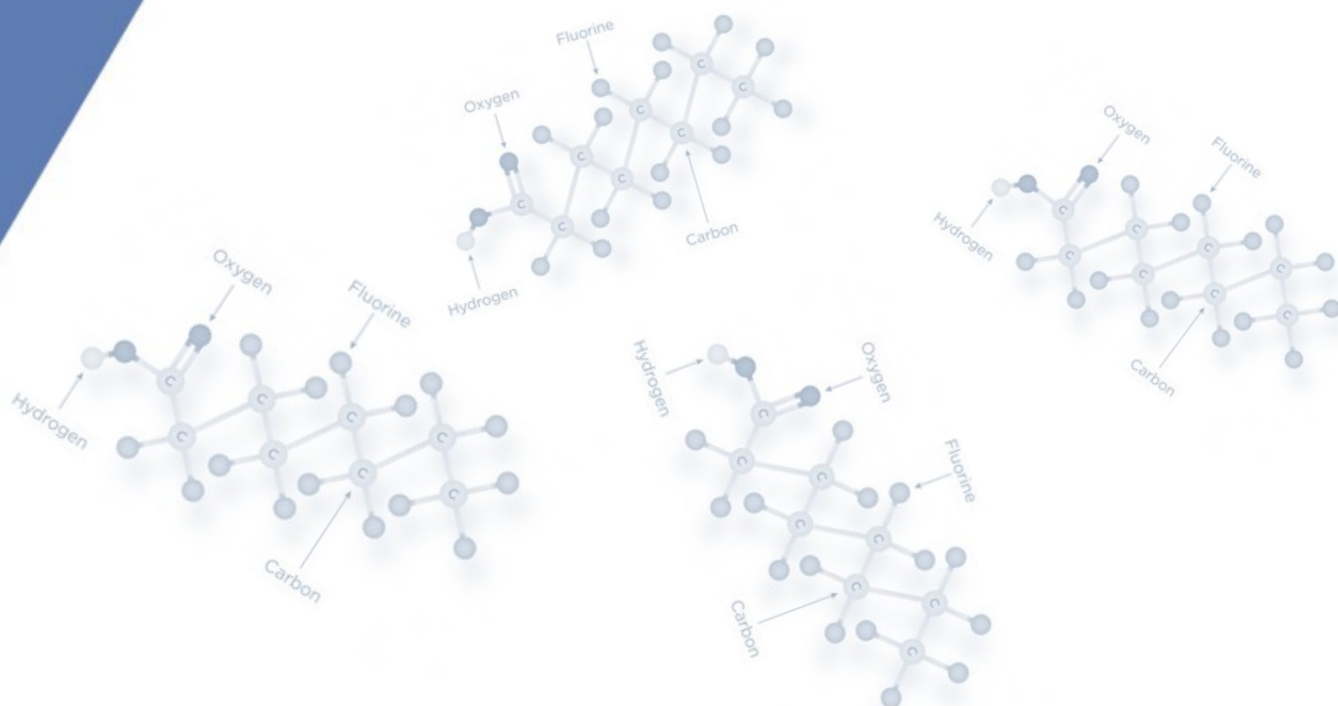


Plan mondial de surveillance des polluants organiques persistants

Protocole 3

Protocole d'Analyse des Polybromodiphényléthers (PBDE) dans et Lait Maternel, l'Air et le Sérum Humain

Novembre 2013



**Procédure d'Analyse des Polluants Organiques Persistants
dans les Matrices Environnementales et Humaines pour la
mise en œuvre du Plan Mondial de Suivi dans le cadre de la
Convention de Stockholm**

**Protocole 3 :
Protocole d'Analyse des Polybromodiphényléthers (PBDE) dans le Lait
Maternel, l'Air et le Sérum Humain**

Service Substances Chimiques
Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE)
Economie Division

Genève

Novembre 2013

Le présent document a été élaboré par :

Institut pour les Etudes Environnementales
Université VU
De Boelelaan 1087
NL-1081HV Amsterdam
Pays-Bas

Pour :

Service Substances Chimiques
Economie Division
Programme des Nations Unies pour l'environnement

Dans le cadre du projet "Mise en place d'Outils et Méthodes pour Inclure les Neufs Nouveaux Polluants Organiques Persistants (POP) dans le Plan Mondial de Suivi" Projet ID GFL 2328-2760-4B97 avec le soutien financier du Fond pour l'Environnement Mondial (GEF-FEM)

1 CHAMP D'APPLICATION

Le Plan Mondial de Suivi de la Convention de Stockholm fixe un cadre pour l'analyse des polluants organiques persistants (POP) ; à cet égard, les congénères recommandés pour l'analyse dans les matrices-clé sont répertoriés (voir chapitre 2 des "Directives sur le Plan Mondial de Suivi des polluants organiques persistants, PNUE 2013). Un protocole est nécessaire pour s'assurer que ces composés sont toujours correctement analysés par les différents laboratoires et toujours de la même façon. Pour favoriser l'analyse des POP dans les laboratoires dédiés, le Service Substances Chimiques de la Division de la Technologie, de l'Industrie et de l'Économie (DTIE) du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) développe des procédures standard pour l'analyse des POP, initiaux ou nouveaux.

Le Plan Mondial de Suivi (GMP sigle anglais), établi par l'article 16 de la Convention de Stockholm (<http://chm.pops.int/Convention/ConferenceofthePartiesCOP/Meetings/COP5/COP5Documents/tabid/1268/Default.aspx>) requiert l'analyse des Polluants Organiques Persistants (POP) dans les matrices correspondantes. Un protocole est nécessaire pour s'assurer que ces composés sont toujours correctement analysés et toujours de la même façon.

Cette procédure est axée sur les Polybromodiphényléthers (PBDE). Le protocole suivant décrit la méthode de préparation des échantillons, d'extraction, de purification et d'analyse de huit PBDE recommandés pour l'analyse (voir Tableau 1) dans le lait humain, le sérum humain et l'air, conformément au GMP.

Tableau 1 : Congénères de PBDE à analyser suivant le protocole sous-jacent

Numéro du congénère de PBDE	Structure	Matrice de base
17	2,2',4-Tribromodiphényléther	Facultatif : Air
28	2,4,4'-Tribromodiphényléther	Facultatif : Air
47	2,2',4,4'-Tetrabromodiphényléther	Air, Lait/Sang Humain
49	2,2',4,5'-Tetrabromodiphényléther	
99	2,2',4,4',5-Pentabromodiphényléther	Air, Lait/Sang Humain
100	2,2',4,4',6-Pentabromodiphényléther	Facultatif : Air, Lait/Sang Humain
153	2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphényléther	Air, Lait/Sang Humain
154	2,2',4,4',5,6'-Hexabromodiphényléther	Air, Lait/Sang Humain
183	2,2',3,4,4',5',6-Heptabromodiphényléther	Air, Lait/Sang Humain

2 PRINCIPE

Tous les PBDE doivent être extraits de leurs matrices, car la plupart des composants matriciels interfèrent dans le résultat final. Les PBDE peuvent être extraits : d'échantillons de lait humain par Extraction Liquide-Liquide (LLE sigle anglais), d'échantillons d'air (sur mousse de polyuréthane (PUFs)) par le procédé d'extraction Soxhlet, et d'échantillons de sérum humain par extraction en phase solide (SPE sigle anglais). La purification des extraits peut être effectuée sur colonne de silice acide, suivie d'une purification sur colonne de silice désactivée à plus de 1,5% (m/m). L'analyse instrumentale des extraits purifiés de tous les échantillons s'effectue par chromatographie en phase gazeuse associée à une spectrométrie de masse (basse résolution)(GC-MS sigle anglais). Tous les composés-cibles pourront par la suite être identifiés et quantifiés.

3 PRÉCAUTIONS

Avant de procéder à l'analyse et à la préparation des substances nécessaires, il est indispensable de prendre deux précautions :

1. La non-contamination des solvants et du matériel utilisés doit être vérifiée, afin de démontrer qu'ils ne contiennent aucune trace de PBDE concernés.
2. Le présent protocole décrit l'analyse de PBDE. Cependant, certains paramètres et conditions analytiques décrits par le protocole peuvent être modifiés, tout en obtenant les mêmes résultats. Dans le cas d'une modification du protocole, la méthode devra être intégralement optimisée et validée pour garantir la compatibilité des données.

4 MATÉRIEL ET RÉACTIFS

4.1 Matériel

Balance (précision 0.01 g)

Ballon Monocol (1 L)

Agitateur

Dessiccateur à Vide

Four (37 °C et 140 °C)

Agitateur Vortex

Flacon verre (15 ml)

Tube verre (20 ml)

Pipette (100 µL)

Réfrigérateur (4 °C)

Système de concentration en verre Kuderna-Danish (KD)

Système d'échantillonnage (PUF) mousse de polyuréthane

Granules pour ébullition, lavés à l'acétone et toluène

Système Soxhlet en verre et dispositif de chauffage électrique, ou bain-marie

Bain à ultrasons

Dispositif SPE

Tube de récupération en verre (20 ml)

Colonne de verre, membrane de verre frité 22 cm x 20 mm diamètre intérieur (di)

Colonne de verre pour gel de silice 15 cm longueur x 11 mm diamètre intérieur

Laine de verre silanisée, J.T. Baker, Deventer, Pays-Bas

Pipettes Pasteur

Flacon verre pour chromatographie en phase gazeuse (2 ml)

Boucheuse/Déboucheuse

Joint-Scellé, aluminium argenté 11 mm, PTFE/ garniture caoutchouc

Colonne capillaire, CP-SIL-8CB, WCOT silice fondue, 50 m x diamètre intérieur (D.I) 0.25 mm x Film 0.25 µm, Varian

4.2 Réactifs

H₂SO₄, 95-97%, pro analysis, Sigma Aldrich 30743, Steinheim, Allemagne

Gel de silice 60 (0.063 mm-0.200 mm), Merck 1.07734, Darmstadt, Allemagne

Eau, déminéralisée

Acétone, Ultraresi, J.T. Baker, Deventer, Pays Bas

Toluène, pro analysis, analytical reagent grade, Fisher Chemical, Loughborough, Leicestershire, RU

Iso-octane, suprasolve, Produit Merck No 1.15440, Darmstadt, Allemagne

BDE 58 stock solution, Wellington, BDE-58, 50 µg/ml, Ontario Canada

Etalon Interne (I.S.) (BDE 58) (100 ng/ml en iso-octane)

Etalon Interne I.S. (BDE 58) (100 ng/ml en acétone)

Mousse de Polyuréthane (PUF) disque, 14 cm x 1.35 cm, surface 365 cm², masse 4.40 g, volume 207 cm³, Tisch Environmental, Cleves, OH, Etats-Unis

n-Hexane, Ultra Resi-Analyzed, J.T. Baker 9262, via Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Pays-Bas

Acide Formique, 98-100%, Sigma Aldrich 27001, Steinheim, Allemagne

2-propanol, LC-MS Chromasolv[®], Fluka 34965, Steinheim, Allemagne

Acide Formique/ 2-propanol (4 :1, v/v)

Eau/2-propanol (4 :1, v/v)

Oxalate de Sodium, Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne

Solution Oxalate de Sodium 0.15 M

Méthanol, qualité CLHP (HPLC sigle anglais), J.T. Baker, Deventer, Pays-Bas

Ether Diéthylique (DEE), pro analysis, Merck Emsure[®] 1.00921, Darmstadt, Allemagne

Heptane, J.T. Baker, Deventer, Pays-Bas

Dichlorométhane (DCM), Picograde, Promochem SO-1185, via LGC Standards, Wesel, Allemagne

Cartouches SPE : Oasis[®] HLB custommade SPE extraction cartridges (540 mg/3 ml), produit Waters No 186003852, Milford Massachusetts, Etats-Unis

DCM/ méthanol (7 :3, v/v)

Eau/ méthanol (19 :1, v/v)

Eau/ 2-propanol (7 :3, v/v)

Eau/ méthanol (3 :7, v/v)

Azote (gaz)

Hexane/ DCM (3 :1, v/v)

Na₂SO₄ anhydre, pro analysis ; chauffé pendant 16 heures à 250 °C

Hexane/ DCM (7 :3, v/v)

DEE en hexane (15%, v/v)

Solution PBDE (Wellington PBDE solution, concentration 1000-5000 ng/ml), BDE-MXE, Wellington, Ontario, Canada

Solution de calibration : solution PBDE diluée 5, 10, 20, 50, 225, 550, 1000 et 2500 fois

4.3 Instrumentation

GC-MS ionisation négative par capture d'électrons (ECNI), Agilent, Santa Clara, CA, Etats-Unis :

GC : 6890N

Injecteur : 7683B

MSD : 5975 inertXL MSD

CI bron : G3170-65403 (kit)

EI bron : G2591-64710 (kit)

Logiciel d'acquisition, traitement des données et stockage, AgilentChemstation, Version E.02.00.493, Agilent, Santa Clara, C.A., États-Unis

5 PREPARATION DE SILICE ACIDE ET DE SILICE DESACTIVEE

5.1 Préparation de silice acide (40% H₂SO₄ (m/m))

- Utiliser une balance de précision pour mélanger, dans un ballon d'1L, 200g de H₂SO₄ et 300 g de gel de silice ;
- Homogénéiser le mélange en agitant manuellement jusqu'à disparition de tout grumeau de plus d'1cm³;
- Ensuite, placer le gel de silice dans un agitateur et agiter plusieurs heures ; puis
- Placer dans un dessiccateur toute la nuit.

5.2 Préparation de silice désactivée avec 1.5% d'eau

- Introduire environ 0.5 kg de gel de silice dans un ballon ;
- Porter le gel de silice à 140 °C dans un four toute une nuit ;
- Laisser le gel de silice refroidir à température ambiante dans un dessiccateur ;
- Mélanger 1.5g d'eau déminéralisée à 98.5g de gel de silice ;
- Homogénéiser le mélange en agitant manuellement jusqu'à disparition de tout grumeau de plus d'1cm³;
- Ensuite, placer le gel de silice dans un agitateur et agiter plusieurs heures ; puis
- Placer dans un dessiccateur toute la nuit.

6 MÉTHODE

6.1 Préparation des échantillons

Note :L'ensemble de la verrerie doit être rincée à l'acétone avant utilisation !

6.1.1 LaitMaternel

- Conditionnerles échantillons de lait humain (25 ml) dans un four à 37 °C pendant 2 h ;
- Mélanger les échantillons au vortex pendant 1 min ;
- Peser 5 mlde lait dans un tube en verre vide (20 ml) ;
- Ajouter 100 µL d'étalon interne I.S. (100 ng/mleniso-octane) ;puis
- Placer les échantillons au réfrigérateur toute la nuit.

6.1.2 Air

Pour les échantillons d'air, des disques PUF sont utilisés.

6.1.2.1 *Préparationdu PUF*

- Nettoyagepréalable d'un PUF :
 - Procéderà uneextraction Soxhletsur PUF à l'acétone (24 h), suivie d'une extraction à l'hexane (24 h) ;
 - Sécher le PUF et placer dans un dessiccateur (24 h).

6.1.2.2 *Echantillonnage de l'air :*

- Placer un PUF dans un échantillonneur passifpendant trois mois sur un site d'échantillonnage en extérieur. Eviter toute éventuelle contamination liée au contact manuel (porter des gants), etc.

6.1.2.3 *Préparation des échantillonsd'air :*

- Extraire le PUF de l'échantillonneur ;puis
- Placer 100 µL d'Etalon Interne I.S. (100 ng/mleniso-octane) sur le PUF.

6.1.3 Sérumhumain

- Homogénéiser les échantillons de sérum humain (10 ml) en agitant manuellement pendant 1 min ;
- Peser 5 mld'échantillon de sérum humaindans un flacon de verre (15 ml) ;
- Ajouter 100 µL d'Etalon Interne I.S. (100 ng/mlenacétone) ;
- Mélanger les échantillons au vortex pendant 1 min ;
- Conserver les échantillons de sérum à 4 °C pendant une nuit ;
- Conditionner les échantillons à température ambiante ;

- Ajouter 5 ml d'acide formique/ 2-propanol (4 :1, v/v) ;
- Mélanger au vortex et soumettre au bain à ultrasons pendant 5 min ;
- Placer les échantillons dans l'obscurité pendant 50 min pour permettre la dénaturation des protéines ;
- Ajouter 5 ml d'eau/2-propanol (4 :1, v/v) ; puis
- Mélanger au vortex et soumettre au bain à ultrasons pendant 5 min ;

6.2 Extraction des échantillons

Note : L'ensemble de la verrerie doit être rincée à l'acétone avant utilisation !

6.2.1 Lait Maternel

- Ajouter successivement à l'échantillon:
 - 2.5 ml de solution d'oxalate de sodium à 0.15M
 - 5 ml de méthanol
 - 5 ml de DEE
 - 5 ml de n-heptane.
- Agiter soigneusement le tube d'échantillon entre chaque ajout de solvant ;
- Si des émulsions se forment entre les deux phases, ajouter une petite quantité de méthanol jusqu'à ce que les émulsions s'interrompent ;
- Transférer la couche organique supérieure dans un dispositif Kuderna-Danish (KD) ;
- Reproduire l'extraction deux fois de plus. Dans un premier temps, en ajoutant successivement 5 ml de DEE et 5 ml de n-heptane, et, dans un deuxième temps, en ajoutant 3 ml de chaque ;
- Transférer la phase organique dans le même dispositif KD entre chacune des extractions ;
- Ajouter 1 ml d'iso-octane et 2 granules pour ébullition ;
- Concentrer l'extrait à 1 ml en utilisant un évaporateur rotatif ou un KD. Dans le cas où un évaporateur rotatif est utilisé, s'assurer qu'il reste propre en rinçant méticuleusement le réfrigérant entre chaque échantillon ;

6.2.2 Air

- Procéder à une extraction Soxhlet sur PUF avec DCM (12 h) ;
- Ajouter 1 ml d'iso-octane et concentrer l'extrait à 1 ml en utilisant un évaporateur rotatif ou un KD.

6.2.3 Sérum humain

L'extraction en phase solide (SPE sigle anglais) est utilisée pour l'extraction du sérum.

- Installer une cartouche SPE dans le dispositif d'extraction en phase solide (SPE) ;
- Humidifier la cartouche SPE avec 3 ml de méthanol suivis de 3 ml de DCM/ méthanol (7 :3, v/v) avec un débit de 1.5 ml/min ;
- Conditionner la cartouche SPE avec 5 ml de méthanol suivis de 5 ml d'eau/ méthanol (19 :1, v/v) avec un débit de 1.5 ml/min ;

- Ajouter le prélèvement d'échantillon (15 ml) à la cartouche SPE avec un débit de 0.4 ml/min ;
- Ajouter 5 ml d'eau/ méthanol (19 :1, v/v) à la cartouche SPE avec un débit de 0.4 ml/min ;
- Humidifier la cartouche SPE avec 10 ml d'eau/ 2-propanol (7 :3, v/v) avec un débit de 1.5 ml/min ;
- Sécher la cartouche pendant 45 min sous vide de 38 kPa ;
- Nettoyer la cartouche avec 3 fois 20 µL d'eau/méthanol (3 :7, v/v) ;
- Éluer le PBDE de la cartouche dans un tube de récupération propre (20 ml) avec 12 ml de DCM/ méthanol (7 :3, v/v) sous vide de 8 kPa ;
- Après que les 12 ml de DCM/méthanol ont disparu de la cartouche, faire monter la pression à 20 kPa pendant 10 secondes pour éluer le solvant résiduel ;
- Ajouter 1 ml d'iso-octane à l'extrait ;
- Concentrer l'extrait à environ 500 µL dans un bain-marie (max 40 °C) sous flux d'azote ; puis
- Ajouter l'hexane/ DCM (3 :1, v/v) à l'extrait jusqu'à 1 ml.

6.3 Purification de l'échantillon

6.3.1 Lait humain, air, et sérum humain

La purification d'extraits d'échantillons de lait humain, d'air et de sérum humain comprend deux étapes. La première étape implique la purification à travers une colonne de silice acide. La deuxième étape implique la purification à travers une colonne de silice désactivée à 1.5% (m/m).

6.3.1.1 *Purification à travers une colonne de silice acide*

- Préparer une colonne de silice acide en remplissant une colonne de verre (avec une membrane de verre fritté) avec 20 g de H₂SO₄-silice à 40% (Voir paragraphe 5.1) puis ajouter 1 cm de Na₂SO₄. Secouer légèrement la colonne entre les différents ajouts jusqu'à l'élimination de toutes les bulles d'air ;
- Rincer la colonne avec 25 ml d'hexane/ DCM (7 :3, v/v) ;
- Présenter l'extrait d'échantillon en haut de la colonne ;
- Rincer le tube d'échantillon 2 fois avec 1 ml d'hexane/ DCM (7 :3, v/v) ;
- Placer un dispositif KD sous la colonne ;
- Éluer le PBDE de la colonne avec 75 ml d'hexane/ DCM (7 :3, v/v) ;
- Ajouter 1 ml d'iso-octane et 2 granules pour ébullition au dispositif KD ; puis
- Concentrer l'extrait à 1 ml en utilisant un évaporateur rotatif ou un dispositif KD.

6.3.1.2 *Purification à travers une colonne de silice désactivée à 1.5% (m/m)*

- Préparer une colonne de silice désactivée à 1.5% (m/m) en remplissant une colonne de verre avec 1.8 g de silice désactivée avec 1.5% d'eau (voir 5.2) puis ajouter 1 cm de Na₂SO₄. Secouer légèrement la colonne entre les différents ajouts jusqu'à l'élimination de toutes les bulles d'air ;
- Ajouter 6 ml d'hexane pour traiter la colonne ;
- Ajouter l'extrait d'échantillon à la colonne dès que le ménisque atteint la couche de Na₂SO₄ ;

- Placer un dispositif KD sous la colonne dès que la totalité de l'extrait est répandu dans la colonne ;
- Rincer le tube d'extrait trois fois avec 1 ml d'hexane et verser les dans la colonne ;
- Eluer avec 11 ml d'hexane suivis de 12 ml de DEE / hexane (15%, v/v) ;
- Après récupération de la totalité des éluats, ajouter 1 ml d'iso-octane et 2 granules pour ébullition au dispositif KD ;
- Concentrer l'extrait à 500 µL en utilisant un évaporateur rotatif ou un KD ; puis
- Transférer l'extrait dans un flacon en verre pour chromatographie en phase gazeuse et analyser par GC-MSD (ECNI mode) (voir paragraphe 7).

7 ANALYSES INSTRUMENTALES

Veillez noter que le gradient et les paramètres MS dépendent du système GC-MS et du type de colonne utilisés. Ces paramètres doivent être optimisés en interne pour chaque équipement et colonne.

- Installer la colonne d'analyse ;
- Régler le spectromètre de masse (MS). Si le réglage échoue, la source doit être nettoyée ;
- Vérifier le dispositif en effectuant un rapport signal sur bruit pour chaque PBDE. Pour ce faire, injecter la solution d'étalonnage de plus basse concentration ;
- Définir une requête d'analyse des PBDE dans le logiciel. Les paramètres pour la séparation et la détection GC-ECNI-MS sont donnés dans le Tableau 2 ;
- Disposer tous les flacons contenant les extraits, les blancs de procédure, et les solutions d'étalonnage sur le plateau de l'échantillonneur automatique ;
- Définir l'ordre de mesure à l'ordinateur, des solutions d'étalonnage, des échantillons, du blanc et des substances de référence dans un ordre aléatoire ; puis
- Démarrer l'acquisition.

Tableau 2 : Paramètres pour l'analyse de PBDE par GC-ECNI-MS

Colonne :	Colonne capillaire, CP-sil-8CB, WCOT Silice fondue, 50 m x diamètre intérieur (I.D) 0.25 mm x Film 0.25 µm, Varian
Volumed'injection :	1 µL
Mode d'injection :	Pulsé sans division
Gazvecteur :	Helium
Débit nominal initial :	2.6 ml/min
Gaz de réglage :	Méthane

8 QUANTIFICATION

Pour l'identification et la quantification, des logiciels sont disponibles, tels que Chemstation, Masshunter, etc.

Employer le logiciel pour identifier les pics-cible du chromatogramme GC/MS basé sur le temps de rétention (RT sigle anglais) et le rapport m/z (voir Tableau 3 concernant les paramètres pour la détection et la quantification de PBDE après séparation sur colonne CP-Sil-8CB).

Utiliser l'aire des pics associés aux solutions d'étalonnage pour tracer une courbe d'étalonnage de chaque composé ciblé. Comparer l'aire et le temps de rétention associés à chaque pic de solution d'étalonnage avec ceux des échantillons et calculer les concentrations en PBDE.

Tableau 3 : Paramètres GC/MS pour la séparation de PBDE sur colonne CP Sil-8CB

Composé	Description	m/z	RT (min)
BDE 17	Composé cible	79	18.7
BDE28	Composé cible	79	19.2
BDE47	Composé cible	79	30.8
BDE49	Composé cible	79	29.0
BDE99	Composé cible	79	38.0
BDE100	Composé cible	79	36.7
BDE153	Composé cible	79	42.7
BDE154	Composé cible	79	41.3
BDE183	Composé cible	79	47.5
BDE58	I.S. étalon interne	79	31.5

9 QA/QC

A des fins de contrôle de qualité, inclure un blanc, un échantillon double et un prélèvement de matériau de référence dans chaque série de 12 échantillons maximum. Participer aux études interlaboratoires (ILS sigle anglais) et analyser les matériaux de référence certifiés (CRMs sigle anglais) de façon régulière est fortement recommandé pour assurer la qualité des analyses.

10 RÉFÉRENCES

PNUE (2013) : Directives sur le Plan Mondial de Suivi pour les polluants organiques persistants. PNUE/POPS/COP.6/INF/31, 4 Février, accessible depuis www.pops.int