

Chimie

Chemistry

1. Introduction

Le Pôle Métrologie chimique et biomédical du LNE est en charge du développement des références de la métrologie en chimie. Les activités recouvrent quatre sous-domaines: préparation et analyse de mélanges gazeux, analyse inorganique, analyse organique, et électrochimie. Le Pôle a pour mission de développer une métrologie appliquée aux domaines de la santé, de l'environnement et de l'agroalimentaire, et de répondre ainsi aux questions sociétales.

2. Domaine inorganique : Développement d'un protocole métrologique pour l'analyse de spéciation du mercure et du sélénium dans des matrices environnementales et agroalimentaires par HPLC-ID-ICP-MS

L'étude de la répartition des formes chimiques d'un même élément, définies par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) sous le terme d'« analyse de spéciation », permet d'améliorer la connaissance des répercussions et du comportement des métaux et métalloïdes, dans les études environnementales, agroalimentaires ou de santé publique.

Les analyses de spéciation font appel à une procédure analytique complexe :

- l'échantillonnage et le prélèvement d'une fraction représentative de la cible de l'étude ;
- le traitement de l'échantillon pour permettre l'extraction des analytes sous leur forme originelle et les obtenir dans un état compatible avec leur analyse ;
- la séparation et l'isolement de chaque espèce issue de l'échantillon ;
- l'identification et ou la mesure de la quantité d'analyte.

Le LNE a abordé l'étude de la spéciation du sélénium. De par ses propriétés bénéfiques supposées, il entre dans la composition de plusieurs types de compléments alimentaires commercialisés en Europe, mais lors des procédés employés pour la fabrication de certains compléments, les espèces initiales se retrouvent rarement dans le produit fini et de nouvelles formes peuvent se rencontrer en sortie de fabrication., qui peuvent se révéler bénéfiques ou nocives et impacter la santé humaine.

Les techniques analytiques utilisées pour réaliser les analyses de spéciation reposent sur le couplage de la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) reliée à un Spectromètre de Masse à Couplage Inductif du Plasma (ICP-MS). Ce montage a permis l'utilisation de la Dilution Isotopique (DI) comme méthode de dosage, son application autorise la traçabilité des analyses au SI.

La méthode développée a porté sur le dosage du sélénium total et de la sélénométhionine (SeMet). Trois matrices différentes ont été analysées : une levure lyophilisée, un complément pharmaceutique composé d'une levure enrobée d'excipients et une farine de blé. Ainsi la méthode a aussi été validée sur trois gammes de fractions de masse différentes en SeMet (de 10 mg(Se)-kg⁻¹ à 2 000 mg(Se)-kg⁻¹), démontrant de la robustesse du protocole développé. Le budget d'incertitude associé au résultat fait partie intégrante de la validation de méthode grâce à sa démarche de mise en avant des facteurs influents sur le résultat final. Les incertitudes associées ont d'ailleurs permis de caractériser les échantillons avec une fidélité relative comprise entre 3 % et 10 % de la fraction de masse.

La méthode développée a permis la participation du LNE à une comparaison interlaboratoire organisée dans le cadre du Comité Quantitatif pour la Quantité de Matière (CCQM-K60) pour le dosage du sélénium total et de la sélénométhionine.

Participation à la comparaison CCQM-K60

Cette comparaison clé a été organisée par le LGC (Royaume-Uni) et le CNRC (Canada) avec pour objectif la détermination du sélénium total et de la sélénométhionine dans une farine de blé.

En combinant les deux comparaisons, vingt-deux laboratoires ont participé à la détermination du sélénium total (dont huit pour la K60, sur la figure 1) et quatorze à celle de la sélénométhionine (dont quatre pour la K60, sur la figure 2). La moyenne arithmétique et la médiane associées de leurs écarts types respectifs sont représentés dans les deux cas. La médiane s'est révélée être la meilleure méthode pour évaluer les résultats.

Pour la détermination de la sélénométhionine, la plupart des laboratoires ont employé l'extraction enzymatique et quelques-uns une extraction par l'acide méthane sulfonique. Tous les participants à la comparaison, sauf un, ont basé leur protocole sur le

couplage HPLC-ICPMS avec mise en œuvre de la dilution isotopique CCQM-K60.

Les résultats du LNE sont excellents et vont permettre de solliciter une demande d'extension de la portée d'accréditation et de déposer de futures CMC.

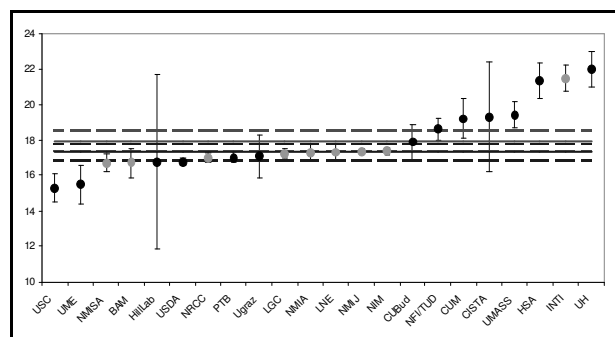


Fig. 1 – CCQM-K60 et P86.1 : analyse du Se total (en mg/kg).

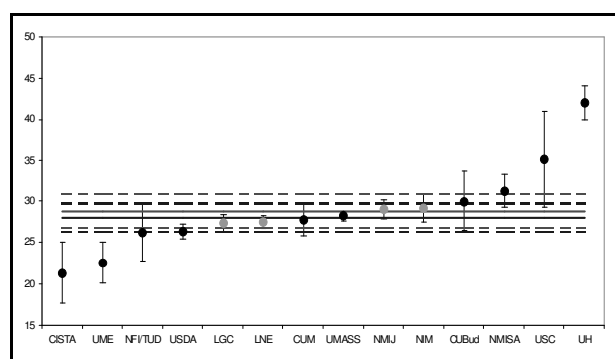


Fig. 2. – CCQM-K60 et P86.1 : analyse de la SeMet (en mg/kg).

Le LNE dispose maintenant de méthodes de mesures primaires pour les analyses de spéciation, elles seront appliquées à d'autres éléments d'intérêt.

3. Métrologie dans le domaine des gaz : Participation à la comparaison BIPM.QM-K1 (Ambient Level Ozone)

Une comparaison internationale BIPM.QM-K1-Ozone, pilotée par le BIPM a été organisée pendant les années 2007 et 2008. L'objectif était de déterminer si les réponses des étalons des laboratoires participants étaient significativement différentes de celles du photomètre SRP27 du BIPM. Chaque laboratoire participant s'est déplacé au BIPM avec soit, ses étalons de référence, soit un étalon de transfert pour participer à une comparaison avec les étalons du BIPM. L'étalon de référence du BIPM est un photomètre NIST référencé SRP27. Un autre photomètre NIST identique appartenant au BIPM référencé SRP28 est utilisé au cours de ces deux années pour garantir la stabilité du photomètre SRP27.

Le LNE a choisi de participer à cette comparaison en utilisant le nouveau photomètre SRP40 du LNE comme étalon de référence afin d'établir une relation entre le ce

photomètre et le photomètre de référence SRP27 du BIPM et de déterminer s'ils fournissent ou non des concentrations significativement différentes. Cette comparaison était un moyen de valider le changement d'étalon de référence pour l'ozone au niveau français.

Les résultats sont reportés sur la figure 3.

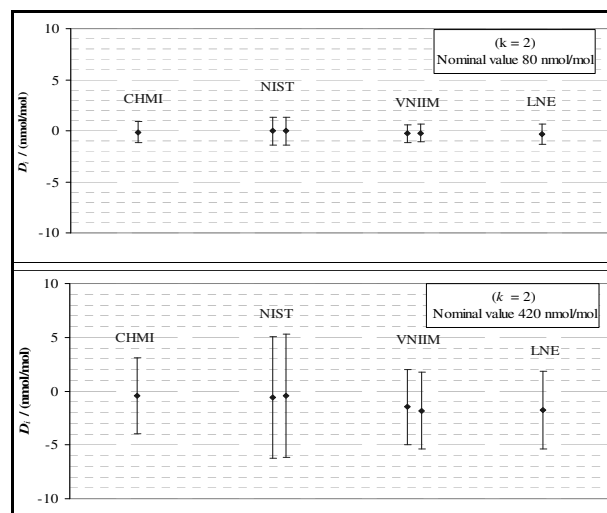


Fig. 3. – Représentation graphique de l'équivalence à 80 nmol/mol (haut) et 420 nmol/mol (bas).

Les résultats de cette comparaison ont permis de montrer que le nouveau photomètre SRP40 dont s'est équipé le LNE en 2008 et corrigeant les biais systématiques démontrés par le BIPM est un étalon de référence très performant pour les mesures de concentrations d'ozone. Le photomètre SRP40 est maintenant l'étalon de référence français utilisé pour l'étalonnage de l'ensemble des générateurs d'ozone des laboratoires en charge de la surveillance de la qualité de l'air depuis juin 2008.

4. Domaine Biomedical et chimie organique : Méthode d'analyse de trois pyréthroïdes dans le jus de pomme concentré

Le LNE développe depuis plusieurs années des méthodes de référence pour l'analyse des pesticides en particulier dans les matrices aqueuses et le blé. Une méthode d'analyse spécifique a ainsi été mise au point afin de participer à la campagne CCQM-P91 « Pyrethroids in apple juice concentrate », basée sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

4.1. Méthodes d'extraction des pyréthroïdes

L'extraction liquide-liquide est la méthode d'extraction la plus courante, cependant, elle présente l'inconvénient d'une grande consommation de solvant et une mise en œuvre longue. L'Extraction sur Phase Solide (SPE) permet de pallier ces inconvénients, elle est mise en œuvre au LNE. Un grand nombre de phases sont disponibles, permettant une grande sélectivité des

molécules à extraire. La figure 4 présente le protocole d'extraction de la SPE.

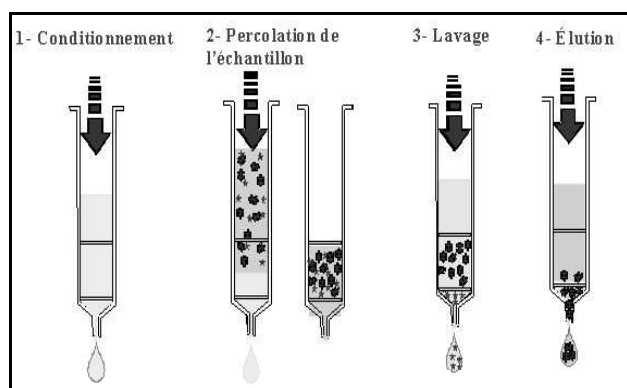


Fig. 4. – Etapes de la SPE.

4.2. Optimisation de la méthode d'analyse

Les différents paramètres influents du chromatographe et du spectromètre de masse ont été optimisés. Les conditions retenues sont décrites ci-dessous :

- température de l'injecteur : 250 °C ;
- volume d'injection : 1 µL ;
- débit de gaz : 0,9 mL/min ;
- injection en mode *splitless* ;
- programmation du four : 80 °C pendant 2 min, 20 °C/min jusqu'à 200 °C, 4°C/min jusqu'à 300 °C pendant 1 min ;
- ligne de transfert : 270 °C ;
- température de la source : 250 °C.

Pour l'identification des composés et la détermination de leur temps de rétention, trois solutions indépendantes contenant chacune un pyréthroïde à une concentration de 2 000 ng/g (bifenthrine, cyperméthrine, cis-permethrine) ont été analysées. Pour chaque composé, deux ions caractéristiques ont été définis pour la quantification par suivi des masses sélectionnées, avec une molécule marquée associée, comme présenté dans le tableau 1.

Tableau 1

Composés	Molécules non marquées	
	Ion de quantification	Ion de vérification
Bifenthrine	166	181
Cis-permethrine	181	209
Cyperméthrine	183	115
Molécules marquées C ¹³		
	Ion de quantification	Ion de vérification
Bifenthrine	–	–
Cis-permethrine	187	215
Cyperméthrine	189	174

Remarque : comme la molécule marquée associée à la bifenthrine n'est pas commercialisée, la cis perméthrine marquée au ¹³C a été choisi comme étalon interne pour ce composé. Les temps de rétention de ces deux composés sont proches et leur comportement est comparable.

4.3. Optimisation de l'extraction

Afin d'optimiser l'étape d'extraction des pyréthroïdes, l'influence de la matrice et du pH ont été étudiées et le solvant d'élution sélectionné. Par ailleurs, il a été montré que l'étape d'évaporation à sec n'entraîne pas la perte de composé.

La méthode a été testée sur du jus de pomme et de l'eau distillée dopée par un mélange de trois pyréthroïdes dans l'acétone. D'un point de vue qualitatif, l'extrait de jus de pomme ne présente pas des composés pouvant interférer dans la détection des composés recherchés.

L'extraction est plus efficace en milieu acide, des essais complémentaires ont été donc réalisés en ajustant le pH de l'eau dopée à celui du jus de pomme (de l'ordre de 3,5).

L'extraction SPE d'échantillons d'eau dopée a été réalisée à des concentrations comprises entre 0,5 µg/g et 3 µg/g et les résultats obtenus ont été comparés à des solutions de référence dans l'iso-octane aux concentrations égales à celles des échantillons dopés. Les résultats obtenus ont permis de montrer que, pour le domaine de concentration prévu pour l'échantillon du CCQM-P91, la phase adsorbante n'est pas saturée, le volume de fin de fixation n'est pas atteint.

4.4. Protocole final

Les cartouches utilisées sont les cartouches OASIS HLB-6cc, 200 mg. Le pH de l'échantillon doit être de l'ordre de 3 à 4 (acidification avec de l'acide acétique). Le protocole d'extraction retenu est le suivant :

- conditionnement : 4 mL CH₂Cl₂, 4 mL CH₃OH et 5 mL eau ;
- percolation : 9 mL d'échantillon (jus de pomme + eau milliQ) ;
- rinçage : 2,5 mL eau ;
- séchage : 30 min sous vide ;
- élution : 5 mL CH₂Cl₂ ;
- évaporation à sec sous azote ;
- reprise dans 2 mL iso-octane ;

Ce protocole a été vérifié en analysant du jus de pomme dépourvu de pyréthroïdes fourni pour les essais CCQM (blanc), qui a été dopé avec un mélange des trois composés et contenant 2 400 ng de chaque composé. Les résultats indiqués dans le tableau 2 montrent que le protocole est adapté.

Tableau 2

Composés	Ecart entre la valeur théorique et expérimentale (%)
Bifenthrine	1,1
Cis-permethrine	2,5
Cyperméthrine	1,4

4.5. Préparation des étalons

Deux types de préparations des étalons ont été comparés : étalons préparés directement dans un solvant et étalons préparés dans le jus de pomme extraits ensuite par SPE. Il n'y a pas de différence significative entre la droite d'étalonnage réalisée dans le jus de pomme et celle dans le solvant. Le choix final est de préparer les solutions étalons dans le solvant.

4.6. Participation à la comparaison CCQM-P91

Cette campagne a été organisée par le LNM chinois et a porté sur le dosage de trois pyréthroïdes dans un jus de pomme concentré : la bifenthrine, la cis-permethrine et la cyperméthrine. Les échantillons ont été envoyés sous la forme de sept ampoules scellées : deux ampoules contenant chacune 10 g de jus de pomme concentré, cinq ampoules contenant chacune 10 g de jus de pomme concentré dopé avec cinq pyréthroïdes (trois composés à doser et deux composés supplémentaires).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3 ; ils sont satisfaisants.

Tableau 3

Composés	Concentration (en ng/g)	Incertitude élargie ($k = 2$) (en ng/g)
Bifenthrine	546,0	3,2
Cis-permethrine	719,4	5,3
Cyperméthrine	787,6	6

Dix laboratoires ont participé à la campagne CCQM P91, seuls deux laboratoires ont utilisé un détecteur à capture d'électrons, tous les autres, dont le LNE, ont réalisé l'analyse avec un spectromètre de masse.

Concernant la préparation de l'échantillon, la majorité des participants a utilisé l'extraction liquide-liquide et le LNE est seul à avoir réalisé l'extraction par SPE.

La figure 5 présente les résultats pour la bifenthrine.

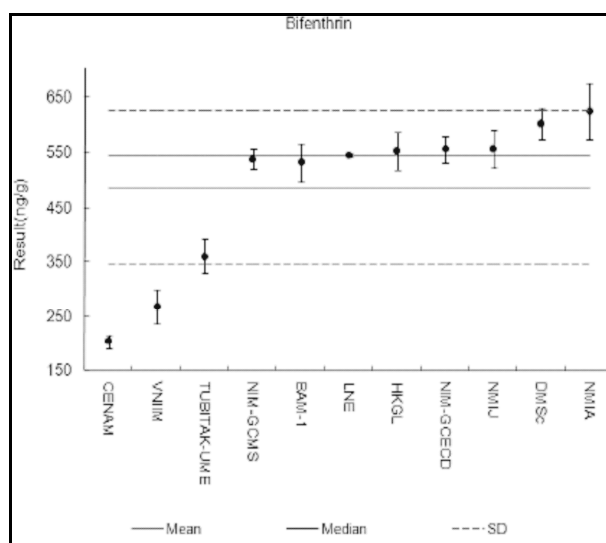


Fig. 5. – Résultats de l'essai CCQM-P91.

Pour l'évaluation des résultats, la médiane s'est révélée être la meilleure méthode, car la plupart des laboratoires se placent autour de cette valeur.

Les valeurs obtenues par le LNE, pour chaque composé, en tenant compte des incertitudes, ne sont pas statistiquement différentes de la médiane. Il est important de rappeler que le LNE est le seul laboratoire à avoir utilisé la méthode d'extraction SPE pour l'analyse des trois pyréthroïdes. Cette méthode d'extraction est donc validée grâce aux résultats de la comparaison CCQM.