

---

# Mise en place du couplage

## IV.1 Préambule

Cette étude a débuté par une formation théorique et pratique de trois mois au sein de l'équipe LCABIE. Après habilitation sur la méthode d'analyse en spéciation du Hg par dilution isotopique et GC-ICP-MS à l'aide de MRCs biologiques et sédimentaires, des échantillons réels d'anguilles et civelles ont été analysés. La majorité des travaux effectués au cours de cette formation ont fait l'objet de plusieurs communications par affiches lors de colloques internationaux (Cf. « Communication ») et par écrit avec un article soumis au journal « International Journal of Environmental Analytical Chemistry » (article I). Par la suite, le couplage GC-ICP-MS a été installé au sein du laboratoire CIME de l'ANSES-LSA.

## IV.2 Le couplage GC-ICP-MS

### IV.2.1 Séparation par GC

#### Principe :

Une fois les espèces mercurielles dérivées afin qu'elles soient plus stables thermiquement, l'échantillon est introduit sous forme liquide en tête de colonne par une micro-seringue qui va traverser le septum pour déposer l'échantillon dans l'injecteur. Cet injecteur est constitué d'un liner situé en amont de la colonne. Le laboratoire LCABIE utilise un injecteur *splitless* (sur un GC Thermo Fisher). L'échantillon est vaporisé et mélangé dans le gaz porteur durant quelques secondes dans le liner avant d'être transféré à 95% dans la colonne. Les 5% restant sont évacués par l'ouverture de la vanne de fuite. Le laboratoire CIME utilise quant à lui un injecteur *on-column* (sur un GC Agilent), il n'y a donc pas d'étape de vaporisation. L'échantillon est directement mélangé au gaz vecteur et injecté à froid sur la colonne. Une fois volatilisés, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le gaz porteur (ou gaz vecteur) à travers la colonne et se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. La colonne capillaire utilisée par les deux équipes est une colonne apolaire *MXT-1* (Restek) en acier inoxydable de 30 m de longueur, 0,53 mm de diamètre interne et recouverte d'un film inerte *Crossbond 100% diméthylpolysiloxane* de 1 µm d'épaisseur. Plus un composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne et donc plus son temps de rétention sera important. Dans le cas des espèces mercurielles, le MeHg éthylé ou propylé (MeEtHg, MePrHg) est moins

lourd et moins volumineux que le iHg éthylé ou propylé ( $\text{Et}_2\text{Hg}$ ,  $\text{Pr}_2\text{Hg}$ ), il sortira donc avec un temps de rétention plus court.

### Points critiques et optimisation :

Le principal point critique de la GC est le système d'injection. Lors de l'utilisation d'un injecteur « *on column* », l'ensemble de l'échantillon est introduit à froid dans la colonne. Une injection à froid permet de limiter les pics « traînants » et améliore la répétabilité et la reproductibilité de l'injection. Pour cela, la température dans l'injecteur, au moment de l'injection, doit être inférieure à la température d'ébullition du solvant afin de concentrer la goutte de solvant en entrée de colonne. Le volume injecté est ensuite libéré en augmentant rapidement la température de l'injecteur, en utilisant une grande vitesse d'injection et une seringue de 10  $\mu\text{L}$  pour injecter un volume de 1  $\mu\text{L}$  afin d'augmenter l'ampleur du mouvement. Une injection rapide de l'échantillon dans la colonne permet d'éviter qu'il s'étale le long de la colonne.

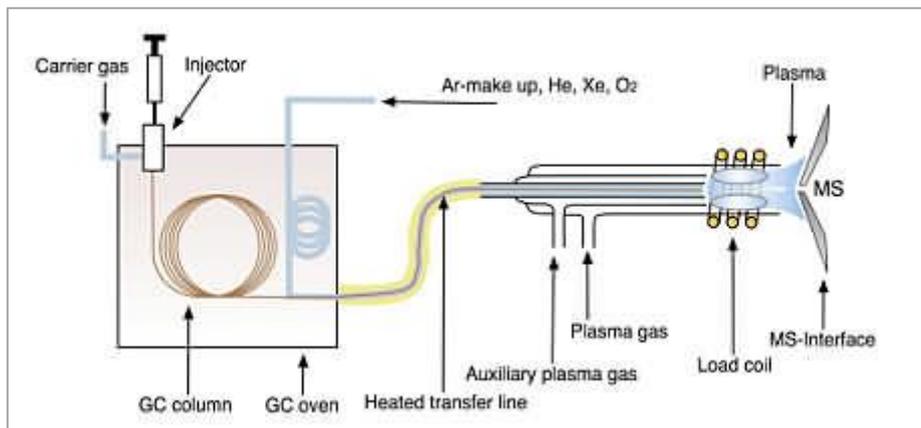
Le programme de montée en température du four utilisé au laboratoire LCABIE a été appliqué, soit un pallier de 60  $^{\circ}\text{C}$  pendant 1 min, suivi d'une montée en température de 60  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  jusqu'à atteindre 280  $^{\circ}\text{C}$  maintenus pendant 1 min. Par contre, la température initiale de l'injecteur a été fixée à 75  $^{\circ}\text{C}$  afin que cette température soit inférieure à la température d'ébullition du solvant (isooctane,  $T_{\text{éb}} = 99$   $^{\circ}\text{C}$ ), puis un programme de montée en température est lancé avec une rampe de 120  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (rampe maximale acceptée par l'injecteur) jusqu'à atteindre 280  $^{\circ}\text{C}$ , température finale de chauffe du four.

### **IV.2.2 Interface entre le GC et l'ICP-MS.**

Les premiers travaux d'analyse en spéciation par le couplage GC-ICP-MS ont été publiés au milieu des années 80 (Van Loon et al., 1986). Les applications dans ce domaine et à partir de ce couplage connaissent depuis une popularité croissante et exponentielle. De nombreuses interfaces ont été développées qui connectent la sortie de la colonne du GC à l'entrée de la torche de l'ICP-MS. La condition de base que doit absolument respecter une interface est que les analytes soient maintenus sous forme gazeuse pendant le transport de la colonne du GC à l'ICP, afin qu'il n'y ait pas de condensation dans l'interface. Ceci est le plus souvent réalisé par chauffage permanent de la ligne de transfert afin d'éviter la formation de points froids. Néanmoins, il est à noter que certaines interfaces ont été conçues avec un transporteur d'aérosol comme l'explique Bouyssiere et al. (2002) dans une revue consacrée au couplage GC-ICP-MS et ses applications en spéciation.

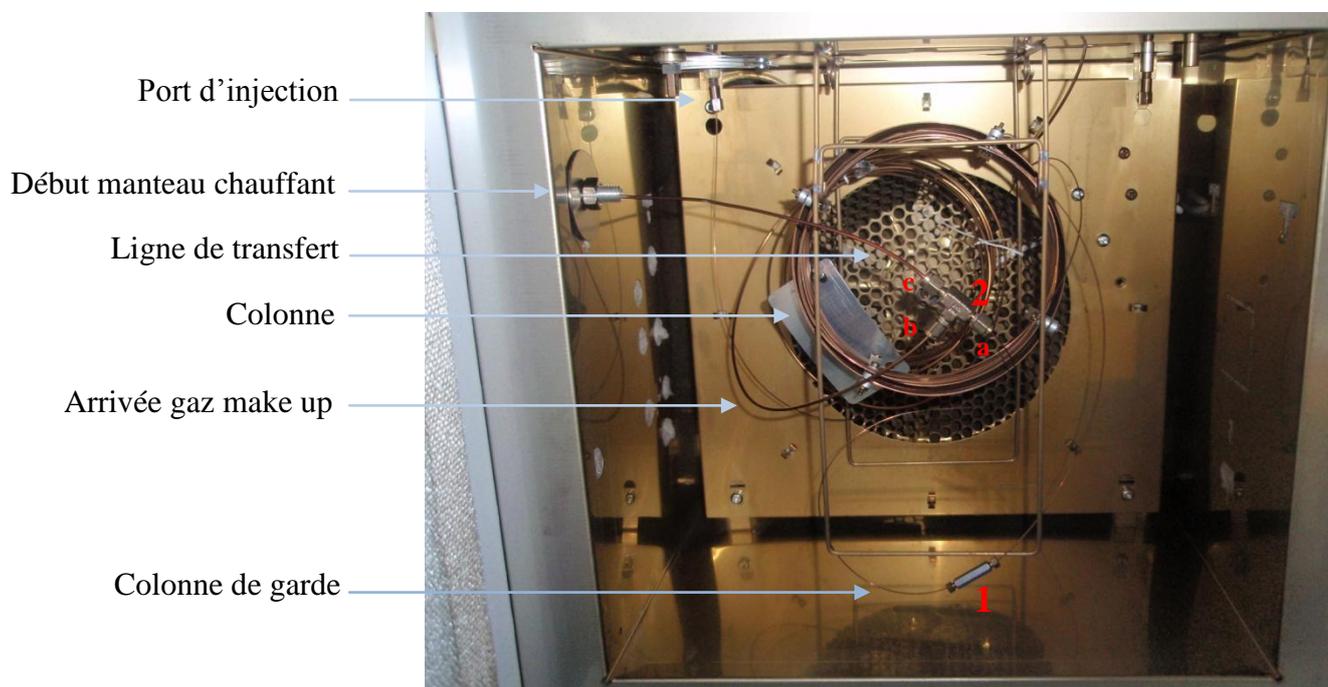
Principe :

Le couplage GC-ICP-MS se divise en trois parties comme le montre la figure 6, soit le GC, l'interface et l'ICP-MS.



**Figure 6:** Schéma du couplage GC-ICP-MS (<http://www.speciation.net/Public/Document/2007/08/11/2930.html>)

Le GC est relié à la torche de l'ICP-MS par une ligne de transfert en acier inoxydable de longueur pouvant varier de 0,5 m à 1 m (0,85 m pour le couplage GC-ICP-MS de CIME, ligne commerciale, Thermo Fisher). Cette ligne de transfert est enveloppée d'un manteau thermostaté maintenu par un bloc chauffant à une température égale à la température la plus haute du programme de chauffe du four du GC. Un débit de gaz d'appoint dit gaz « make up » (argon (Ar), 300-350 ml min<sup>-1</sup>) est introduit en sortie de colonne afin de s'ajouter au débit de gaz porteur (hélium (He), 25 ml min<sup>-1</sup>) pour assurer le transport des analytes gazeux du GC vers la torche. La figure 7 illustre ce montage.



**Figure 7 :** Photographie du four du GC en couplage GC-ICP-MS

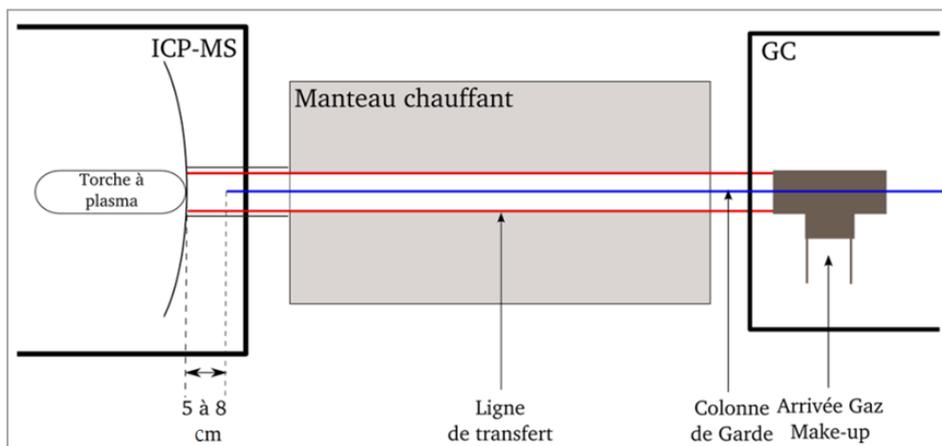
Les consommables en acier inoxydable utilisés pour le couplage sont passivés et traités *silcosteel* ou *sulfinert* (restek) afin de limiter les sites actifs. Les analytes sont injectés dans la colonne, vaporisés puis transportés par l'He le long de la colonne à des vitesses variables selon l'espèce. Ils traversent une première connexion (notée **1** sur la figure 7) qui relie la colonne à une colonne de garde *MXT* (restek) en acier inoxydable, de longueur variable selon la longueur de la ligne de transfert, de 0,28 mm de diamètre interne et 0,53 mm de diamètre externe. Cette colonne de garde est située après la colonne de séparation pour deux raisons. Premièrement, il n'existe pas à ce jour de pièce « T » (connexion **2** de la figure 7) proposant deux entrées de diamètre 1/16" (connexion avec la ligne de transfert (point **2c**) et l'arrivée du gaz make up (point **2b**)) et une entrée de diamètre suffisant pour connecter la colonne *MXT-1*. Par contre, Restek propose un « T » avec deux entrées de 1/16" et une entrée de 0,53 mm (point **2a**). Deuxièmement, la colonne s'encrasse rapidement au niveau de la ligne de transfert. La colonne de garde traverse la connexion « T » et se termine un peu avant la fin du manteau chauffant. A cet endroit, l'He et le gaz make up s'additionnent et les analytes sont poussés dans la torche à plasma.

Points critiques et optimisation :

La formation de points froids dans la ligne de transfert peut provoquer la condensation des analytes à cet endroit. L'interface entre le GC et la torche doit donc être constamment et suffisamment chauffée, sans dégrader les analytes par action thermique. La colonne de garde est connectée à la sortie de la colonne et traverse la ligne de transfert. Elle s'arrête à quelques centimètres avant la fin du manteau chauffant afin que le gaz porteur, suppléé par le gaz make up, transporte les analytes jusqu'au plasma. Une représentation schématique de l'interface entre le GC et l'ICP-MS est présentée en figures 8 et 9.



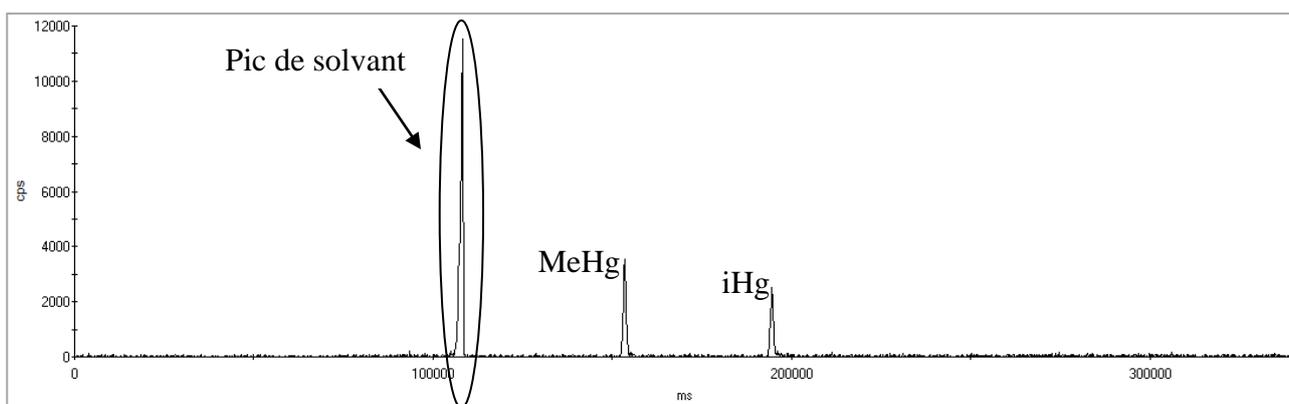
**Figure 8 :** couplage GC-ICP-MS



**Figure 9 :** Interface du couplage GC-ICP-MS

La distance entre la fin de la colonne de garde et la fin de la ligne de transfert peut être optimisée afin d'améliorer la sensibilité de la détection et la forme des pics. Plus cet espace est grand, plus le mélange perd en puissance en raison des pertes de charges et plus la sensibilité du couplage baisse. Pour conserver des conditions correctes d'analyse, la colonne de garde doit s'arrêter entre 5 à 8 cm avant la fin du manteau.

Le débit du gaz make up est également un facteur influençant la sensibilité de l'analyse. Plusieurs débits allant de 25 à 300 ml min<sup>-1</sup> (25, 100, 200, 250, 300 ml min<sup>-1</sup>) ont été testés. Pour des débits inférieurs à 200 ml min<sup>-1</sup>, la sensibilité du couplage est insuffisante pour détecter les espèces Hg. Les chromatogrammes obtenus pour une solution standard naturellement enrichie en MeHg et iHg de 2 µg kg<sup>-1</sup> pour des débits de gaz make up de 200, 250 et 300 ml min<sup>-1</sup> sont présentés en figures 10 à 12.



**Figure 10 :** Débit de gaz make up de 200 ml min<sup>-1</sup>

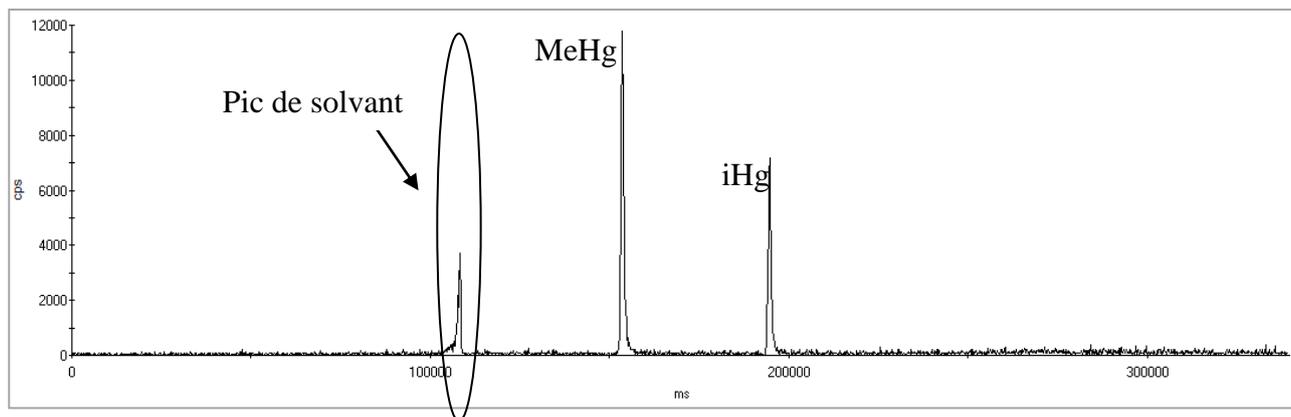


Figure 11 : Débit de gaz make up de  $250 \text{ ml min}^{-1}$

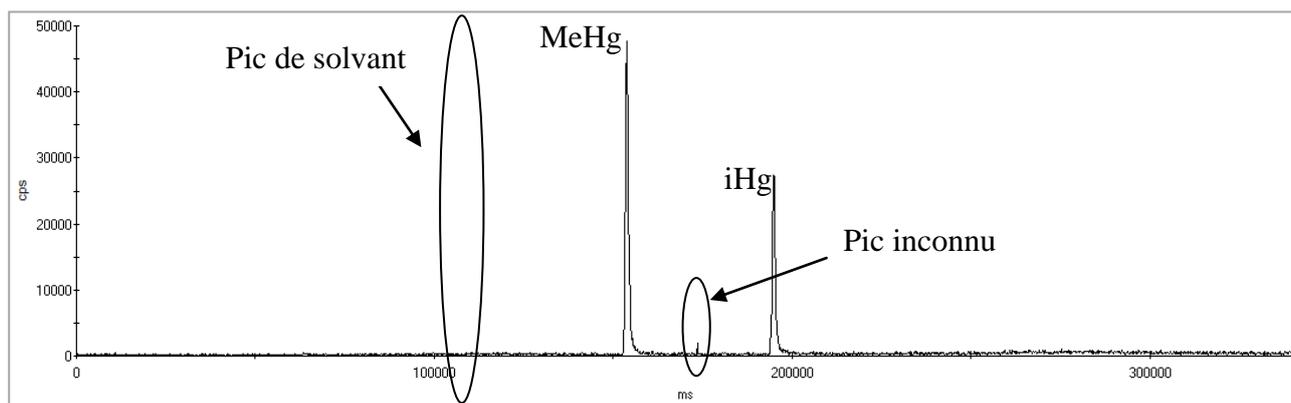


Figure 12 : Débit de gaz make up de  $300 \text{ ml min}^{-1}$

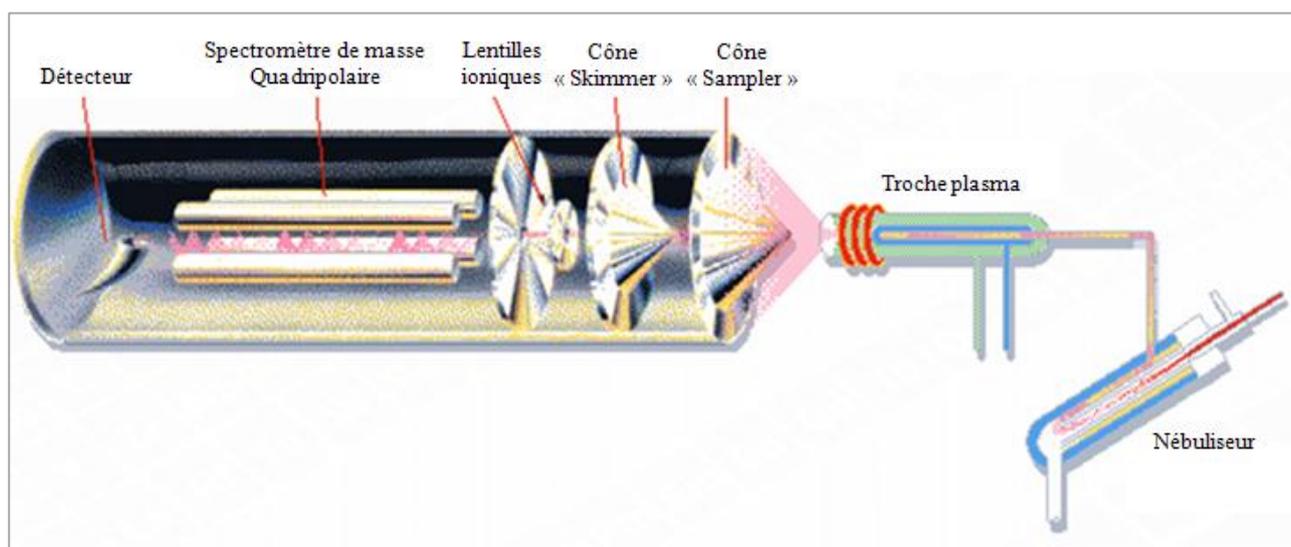
Lorsque le débit de gaz make up augmente, une disparition de la fluctuation de la ligne de base sous l'action de la perturbation du plasma lors de la combustion du solvant (notée « pic de solvant » sur les figures) est observée. De plus, une importante augmentation des hauteurs de pics est observée car le couplage devient plus sensible. Sur la figure 12 est constatée avec l'augmentation de la sensibilité du couplage, l'apparition d'un pic inconnu de faible intensité entre le MeHg et le iHg. Son temps de rétention étant différent des temps de rétention des espèces étudiées, il ne perturbe pas l'intégration des pics. Il s'agit probablement d'un résidu évacué de la colonne ou d'un artefact d'éthylmercure dans la solution standard ou le réactif de dérivation. La sensibilité atteinte avec un débit de gaz make up de  $300 \text{ ml min}^{-1}$  est satisfaisante pour une bonne intégration des pics de Hg, toutefois des débits plus élevés n'ont donc pas été testés. Néanmoins, nous avons constaté par la suite que des débits pouvant atteindre jusqu'à  $400 \text{ ml min}^{-1}$  peuvent être utilisés pour l'analyse d'échantillons possédant de très faibles concentrations en Hg.

### IV.2.3 Détection par ICP-MS

Les appareils de détection optique (AES) ont été les premiers à utiliser un plasma de gaz rares induits par haute fréquence (Inductively Coupled Plasma ou ICP), comme source d'atomisation. Quelques années après (1984), un couplage entre l'ICP, utilisé pour dissocier les molécules et ioniser les atomes et un spectromètre de masse, a été élaboré puis commercialisé. Plusieurs revues récentes ont répertorié les études fondamentales et développements pour ce type d'appareils (Bacon et al., 2008, Beauchemin, 2010), ainsi que les travaux réalisés pour la détermination d'éléments d'intérêt et de leur spéciation dans diverses matrices biologiques, alimentaires ou environnementales (Moldovan et al., 2004, Waddell et al., 2005, Lobinski et al., 2006, Taylor et al., 2008 et 2010)

#### Principe :

L'ICP-MS est le couplage d'une source à plasma et d'un spectromètre de masse. Il peut se décomposer en quatre parties distinctes : la torche à plasma, l'interface et les lentilles ioniques, le spectromètre de masse et le système de détection, comme le montre la figure 13.



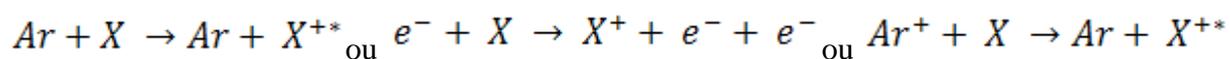
**Figure 13 :** Représentation schématique d'un ICP-MS

- La torche à plasma

La torche à plasma sert à créer et à confiner la décharge à l'intérieur de l'inducteur. Elle doit assurer le transport et la pénétration de l'échantillon dans le plasma. Elle est généralement constituée de trois tubes concentriques en quartz.

Le plasma est obtenu en générant un champ magnétique par passage d'un courant électrique de haute fréquence à travers une bobine refroidie entourant la torche. Une étincelle est produite dans l'argon au sein de la torche, entraînant l'arrachement de certains électrons aux atomes de ce gaz rare. Ces électrons sont accélérés dans le champ magnétique où ils provoquent de nombreuses collisions avec de nouveaux atomes d'argon, engendrant de nouvelles ionisations. Par ces collisions en chaîne, l'argon est transformé en plasma (constitué d'atomes d'argon, d'électrons et d'ions d'argon), appelé plasma à couplage inductif ou ICP.

L'ionisation de la plupart des éléments de l'échantillon dans le plasma peut se résumer par les équations chimiques suivantes :



avec : Ar = atome d'argon, X = atome d'analyte, \* = état excité, + = état ionisé, e<sup>-</sup> = électron

- L'interface et les lentilles ioniques

Située entre le plasma et le spectromètre de masse, l'interface est constituée de deux cônes successifs, généralement en nickel ou en platine, percés d'un orifice en leur centre, afin de permettre le passage sélectif des espèces. Un premier cône, appelé échantillonneur (ou « sampler ») pénètre dans la décharge et permet d'extraire les ions du plasma. Derrière cette première ouverture, un vide de l'ordre de 10<sup>-2</sup> Pa est établi par une pompe primaire, produisant un jet supersonique qui refroidit rapidement le gaz suite à sa grande expansion. Un second cône, dit écorceur (ou « skimmer »), ayant un orifice de diamètre inférieur au précédent, prélève la partie centrale du jet supersonique. L'optique ionique, qui est constituée d'une ou plusieurs lentilles électrostatiques, permet de re-focaliser le jet et de le rendre concentrique à l'axe du filtre quadripolaire.

La portion de plasma ainsi prélevée (soit globalement 1% des ions formés par le plasma) est passée d'un milieu à température très élevées et à pression atmosphérique, à un milieu à température ambiante et sous vide, compatible avec le fonctionnement du spectromètre de masse.

- Le spectromètre de masse

Le spectromètre de masse est un système séquentiel qui permet le passage des ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z), déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle. Chaque m/z sélectionné est séquentiellement envoyé vers le système de détection. Ce

passage des masses les unes après les autres est tellement rapide que l'on parle de détection simultanée des éléments étudiés, mais son mode de fonctionnement reste séquentiel.

- Le système de détection

Les ions sélectionnés par le quadripôle, sont ensuite détectés. Dans les systèmes multipolaires, des multiplicateurs d'électrons, qui consistent en un ensemble de plaques qui lorsqu'elles sont frappées par un ion, libèrent un électron tout en renvoyant cet ion sur une autre plaque qui libérera également un électron, entraînant une réaction en chaîne. L'intensité mesurée (en coups/seconde (cps)) correspond au plus au nombre d'ions frappant le détecteur, car chaque ion n'engendre pas nécessairement des électrons secondaires.

#### Points critiques et optimisation :

La ID permet de corriger la majorité des biais analytiques (effets de mémoire, dérive du signal ou autres instabilité instrumentale), mais pas le biais en masse et le temps mort du détecteur (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005, Monperrus et al., 2008).

Le temps mort d'un système de détection ( $\tau$ ) est le temps pendant lequel le système est inactif après l'arrivée d'une première particule. Si une deuxième particule arrive pendant ce temps, elle ne sera pas détectée et risquera même de biaiser la mesure de la première particule. Le facteur  $\tau$  dépend du détecteur et de l'électronique associée. Il est calculé d'après la formule 3 :

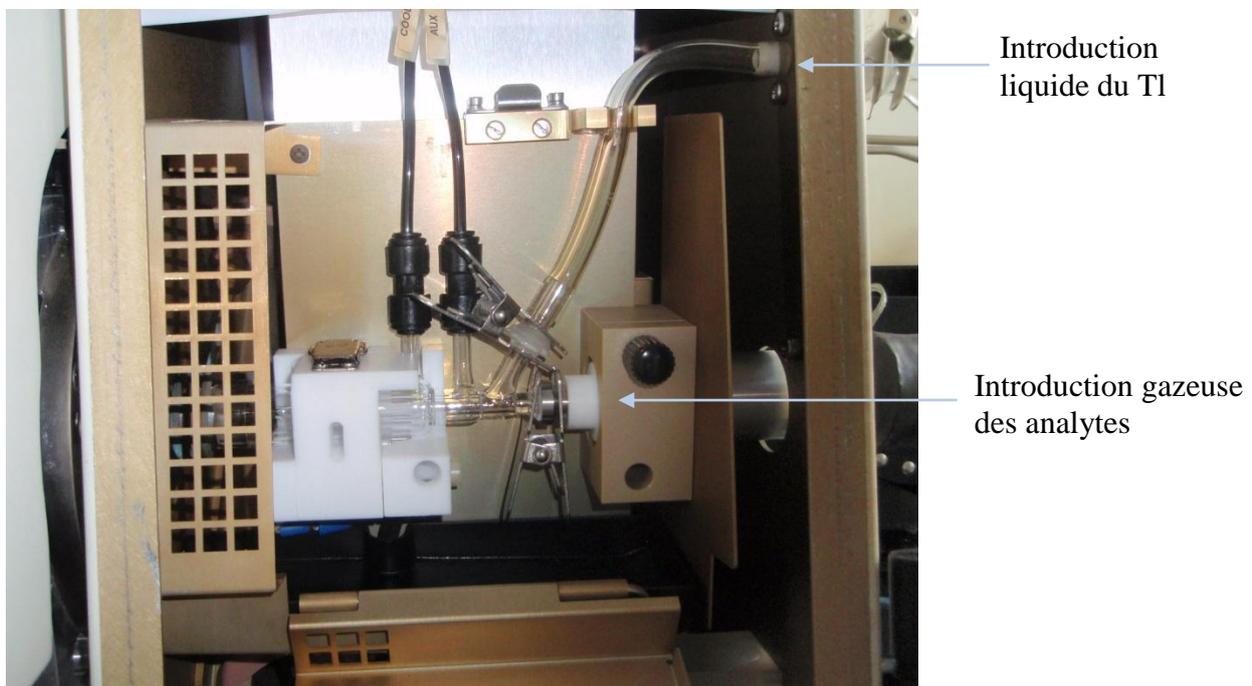
$$I_{corr} (cps) = \frac{I_{mes} (cps)}{1 - I_{mes} (cps) \times \tau (s)} \quad (3)$$

Avec  $I_{corr}$  l'intensité du pic corrigée de  $\tau$ , et  $I_{mes}$  l'intensité mesurée.

Le facteur  $\tau$  est déterminé expérimentalement par mesure des rapports isotopiques  $R_{Hg}^{202/201}$  et  $R_{Hg}^{202/199}$  à différentes concentrations et en appliquant la formule 3, en faisant varier la valeur du facteur  $\tau$  (de 0 à 100 ms par exemple). Le facteur  $\tau$  réel est celui pour lequel aucune variation du rapport isotopique en fonction de la concentration est observé (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005). Ce facteur doit être évalué après chaque changement de détecteur.

Le biais en masse ( $a$ ) est caractérisé par la différence entre le rapport isotopique mesuré et le rapport isotopique théorique. Lors de la formation du plasma, les ions les plus légers subissent une discrimination par rapports aux plus lourds. Cette discrimination instrumentale est due au procédé d'ionisation ou à une différence de détection par le spectromètre de masse et est issue d'une séparation par « nozzle separation effect » ou d'une séparation par effet de charge (Heumann et al 1998). Les ions les plus légers sont envoyés à la périphérie du plasma et sont donc plus facilement exclus lors du passage à travers l'interface de l'ICP-MS (Hill et al 2000).

Ce phénomène est dépendant du temps et donc le facteur correctif  $a$  doit être évalué régulièrement. Il existe deux méthodes pour le déterminer : l'analyse d'un échantillon de composition isotopique connue ou certifiée, entre chaque mesure de l'échantillon (Ruiz Encinar et al., 2000) ou l'analyse en continu (analyse simultanée avec l'échantillon) d'un étalon interne de composition isotopique certifiée (Martin-Doimeadios et al., 2002, Monperrus et al., 2008). Nous avons choisi d'ajouter en continu une solution liquide de Tl, par l'entrée haute de la torche, parallèlement à l'introduction sous forme de gaz des analytes (figure 14).



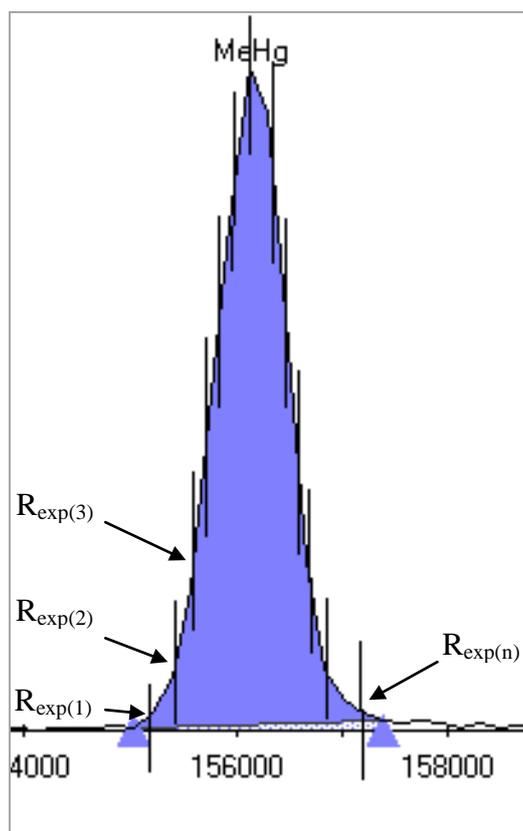
**Figure 14 :** Photographie de la torche en couplage GC-ICP-MS

Le biais en masse est calculé à partir de la formule 4.

$$a = \left( R_{th} | R_{exp} \right)^{1/M(205) - M(203)} \quad (4)$$

avec  $R_{th}$  = rapport théorique 205/203 du Tl figurant sur le certificat du fabricant,  $R_{exp}$  = rapport expérimental 205/203 mesuré au niveau de la fenêtre de temps de sortie du pic,  $M(205)$  et  $M(203)$  = masse moléculaire du Tl pour les isotopes 205 et 203

Pour le MeHg et le iHg, plusieurs valeurs de biais en masse ( $a_1, a_2, a_3, a_4, \dots, a_n$ ) sont calculées dans les plages d'intégration des pics correspondants, soit pour différentes mesures de rapports  $R_{th}/R_{exp}$  comme le montre la figure 15.



**Figure 15 :** Evaluation du biais en masse du MeHg dans le BCR-464, à différentes valeurs  $R_{exp}$  dans la plage d'intégration du pic

Le biais en masse conservé est égal à la moyenne des valeurs  $a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$  et est jugé acceptable si l'écart-type de mesure est inférieure à 5% de sa valeur, critère défini par notre laboratoire.

Par exemple :

$$\text{si } a = -0,0169 \pm 0,0662$$

$$\text{alors } 5\% \text{ de } -0,0169 = -0,000845$$

$$\text{donc } 0,0662 > 5\% \text{ de } a$$

**Non acceptable**

Si l'estimation faite est jugée inacceptable, le biais en masse est de nouveau déterminé en prenant en compte une plus grande plage d'intégration.

Le biais en masse peut également être déterminé par IPD. La prise en considération de plus d'isotope que les trois strictement requis offre la possibilité de corriger le résultat final des erreurs systématiques telles que les discriminations de masse (Rodriguez-Gonzalez et al., 2010). Dans cette détermination, les écarts entre les rapports mesurés et les rapports théoriques sont considérés comme étant uniquement liés au biais de masse.

Après détermination du biais en masse, les rapports isotopiques mesurés sont corrigés de la discrimination de masse par la formule 5.

$$R_{corr} = \frac{R_{mes}}{1+a \Delta m} \quad (5)$$

avec  $R_{corr}$  = rapport isotopique corrigé,  $R_{mes}$  = rapport isotopique mesuré,  $a$  = biais en masse,  $\Delta m$  = différence entre les deux masses isotopiques étudiés (ex : 202-201 ou 202-199)

Un parfait contrôle de ces deux paramètres assure une mesure correcte des rapports isotopiques modifiés.

## V. Conditions expérimentales

L'objectif de cette étude a été d'optimiser la méthode de préparation d'échantillon afin qu'elle soit efficace, simple et rapide en engendrant peu ou pas de transformations inter-espèces (méthylation, déméthylation). Ce chapitre traite du marquage de l'échantillon par les solutions standards enrichies en un isotope, de l'extraction et de la dérivation. Une partie des travaux a été menée au sein du laboratoire LCABIE à Pau.

Les réactifs et matériels utilisés dans cette étude sont détaillés dans les articles I et II.

### V.1 Instrumentation

#### Laboratoire LCABIE :

Le système micro-ondes semi-ouvert utilisé dans cette étude est le système Discover fabriqué et commercialisé par la société *CEM* (Saclay, France). Ce système est équipé d'un passeur automatique d'échantillon à 24 positions et de récipients de digestion en verre de 22 mL. Une centrifugeuse Rotofix 32A fabriquée et commercialisée par la société *HettichLab* (Chasse Sur Rhone, France) a été utilisée pour la séparation des phases aqueuse et organique. Un pH-mètre WTW series pH 720 fabriqué et commercialisé par la société *Inolab* (Froges, France) a été utilisé pour ajuster le pH des solutions avant dérivation.

### Laboratoire CIME :

Deux systèmes d'extraction ont été utilisés :

- Un système micro-onde fermé Multiwave fabriqué et commercialisé par la société Anton Paar (Courtaboeuf, France) et équipé d'un rotor à six récipients de digestion en quartz de 50 mL.
- Un système de digestion *digiPREP* fabriqué et commercialisé par la société *SCP Science* (Courtaboeuf, France) et pouvant recevoir 48 *digiTUBES*.

Une centrifugeuse Universal 320 fabriquée et commercialisée par la société *Hettich* (Tuttlingen, Germany) a été utilisée pour la séparation des phases aqueuse et organique. Un pH-mètre Seven Easy fabriqué et commercialisé par la société *Mettler Toledo* (Viroflay, France) a été utilisé pour ajuster le pH des solutions avant dérivation.

## **V.2 Echantillons et matériaux de référence certifiés**

Les Matériaux de Référence Certifiés (MRC) utilisés dans cette étude, TORT-2 (Hépatopancréas de homard), BCR-464 (Thon) et DOLT-4 (foie d'aiguillat), sont commercialisés par la société *LGC Standard* (Molsheim, France). Le TORT-2 a de faibles concentrations en MeHg et iHg ( $152 \mu\text{g kg}^{-1}$  et  $118 \mu\text{g kg}^{-1}$  respectivement) alors que le DOLT-4 présente de plus fortes teneurs ( $1330 \mu\text{g MeHg kg}^{-1}$  et  $1250 \mu\text{g iHg kg}^{-1}$ ). Le BCR-464 est certifié avec une faible teneur en iHg ( $120 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) et une forte teneur en MeHg ( $5120 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Les solutions de référence certifiées enrichies en un isotope, IES-Hg199 et IES-MMHg201, sont commercialisées par la société *ISC Science* (Oviedo, Espagne).

## **V.3 Préparation des échantillons avant analyse**

### **V.3.1 Préparation physique des échantillons**

Pendant toutes les étapes de préparation des échantillons pour analyse, les consignes pour éviter une éventuelle contamination ont été respectées. Le matériel utilisé a été nettoyé suivant la procédure de nettoyage de la vaisselle de laboratoire en vigueur dans le laboratoire LCABIE : rinçage à l'eau MilliQ, décontamination dans un bac d'acide  $\text{HNO}_3$  à 10% pendant 1 h dans un bain à ultrasons, rinçage à l'eau MilliQ, décontamination dans un second bac d'acide  $\text{HNO}_3$  à 10%

pendant 1 h dans un bain à ultrasons, rinçage à l'eau MilliQ, décontamination dans un bac d'acide HCl à 10% pendant 1 h dans un bain à ultrasons, rinçage à l'eau MilliQ et séchage en étuve à 40°C.

### V.3.2 Préparation chimique des échantillons

#### Laboratoire LCABIE :

a) *Marquage des échantillons avant extraction* : une prise d'essai de 0,25 g (échantillon sec) ou 0,5 g (échantillon frais) est introduite dans les récipients en verre du système à micro-ondes. Le TMAH (5 ml), le spike  $^{199}\text{iHg}$  et le spike  $^{201}\text{MeHg}$  (volumes et concentrations calculés selon la teneur en HgT de l'échantillon) y sont ajoutés et pesés. Les récipients sont scellés et placés dans le passeur automatique du système de digestion par micro-ondes. Un programme en température de 75 °C pendant 4 minutes est appliqué. Les récipients sont introduits un par un dans le four et le système est équipé d'une sonde de température et de pression afin de contrôler ces deux paramètres pendant le chauffage.

b) *Marquage des échantillons après extraction* : la préparation est identique à la préparation d'échantillon a), à l'exception que les deux spikes sont ajoutés à l'échantillon après l'étape d'extraction et à des volumes différents, prenant en compte la dilution de l'échantillon dans le solvant d'extraction.

c) *Traitement des échantillons après extraction* : les échantillons sont refroidis à la température ambiante puis une prise aliquote (volume calculé selon la concentration en HgT de l'échantillon) est prélevée dans un tube en verre de 22 ml (*Interchim*, France) contenant 5 ml d'une solution tampon acétate à pH 4. Le pH est contrôlé et ajusté à 4 avec du HCl. Des volumes d'isooctane (dépendant de la concentration en HgT de l'échantillon) et de réactif de dérivation ( $\text{NaBEt}_4$  1% ou  $\text{NaBPr}_4$  1%, 0,5 ml) y sont ajoutés. Les tubes sont vigoureusement agités manuellement pendant 5 minutes puis centrifugés à 3500 tours par minute et à température ambiante pendant 5 minutes. La phase supérieure (organique) est prélevée et placée dans un vial d'injection (*Agilent*, France) pour analyse par GC-ICP-MS. Il est conservé dans le noir à 4 °C si l'analyse ne se fait pas immédiatement.

#### Laboratoire CIME :

Les préparations chimiques des échantillons utilisées pour cette partie sont détaillées dans l'article II.

Laboratoires LCABIE et CIME :

Les concentrations et abondances isotopiques des deux solutions de spikes sont mesurées respectivement par dilution isotopique inversée et par analyse en abondance isotopique :

*d) Analyse par dilution isotopique inversée* : le spike  $^{201}\text{MeHg}$  est quantifié à partir d'une solution standard naturelle de  $\text{MeHgCl}$  et le spike  $^{199}\text{iHg}$  est quantifié à partir d'une solution standard naturelle de  $\text{HgCl}_2$ . Des volumes (5 ml) de solution tampon acétate de pH 4 sont introduits dans deux tubes en verre de 22 ml (*Interchim*, France). Dans le premier tube sont pesées les solutions  $^{201}\text{MeHg}$  et  $\text{MeHgCl}$  et dans le second les solutions  $^{199}\text{iHg}$  et  $\text{HgCl}_2$ , en volumes et concentrations dépendant des concentrations théoriques des spikes. Les deux tubes sont ensuite traités comme décrits au paragraphe V.3.2 .c) *Traitement des échantillons après extraction*), sans subir d'extraction préalable.

*e) Analyse en abondance isotopique* : des volumes (5 ml) de solution tampon acétate de pH 4 sont introduits dans deux tubes en verre de 22 ml (*Interchim*, France). Dans le premier tube est ajouté le spike  $^{201}\text{MeHg}$  et dans le second le spike  $^{199}\text{iHg}$  en volumes dépendant des concentrations théoriques des spikes. Les deux tubes sont ensuite traités comme décrits au paragraphe V.3.2.c) *Traitement des échantillons après extraction*), sans subir d'extraction préalable.

## V.4 Quantification des espèces mercurielles

Laboratoire LCABIE :

L'ICP-MS est un X-SERIES 2 (Thermo Scientific) équipé d'une torche double entrée et d'un cône Xs. Le système chromatographique utilisé est un chromatographe gazeux Trace GC Ultra (Thermo Scientific) équipé d'un passeur automatique d'échantillon. Le GC est relié à la torche de l'ICP-MS par une ligne de transfert fabriquée au laboratoire. Le GC et l'ICP-MS sont reliés électroniquement par une carte dite « Trigger » permettant de synchroniser le temps mort avec l'injection de l'échantillon dans la colonne. Les conditions opératoires utilisées sont présentées dans le tableau 14.

L'acquisition des données a été réalisée en mode « temps résolu » (Time-Resolved-Analysis ou TRA). Le logiciel de traitement des données « TST » créé au sein du laboratoire LCABIE a été utilisé pour l'intégration des aires de pics. Les données sont traitées par D-IDMS et IPD à partir d'une feuille de calcul développée conjointement par le laboratoire LCABIE et l'Université d'Oviedo.

**Tableau 14** : Mode opératoire utilisé au LCABIE

Paramètres GC	
Mode d'injection	Splitless
Température d'injection	250°C
Volume d'injection	2 µl
Colonne	MXT-1 Silcosteel, 30m x i.d. 0,53 mm x df 1,0 µm
Gaz porteur	He, 25 ml min <sup>-1</sup>
Gaz make up	Ar, 300 ml min <sup>-1</sup>
Programme de température	60 °C (1 min) - 60°C min <sup>-1</sup> - 280°C (1 min)
Ligne de transfert	
Longueur du manteau	0,5 m
Colonne de garde	Silcosteel, i.d. 0,28 mm, o.d. 0,53 mm
Ligne de transfert	Silcosteel, i.d. 1,0 mm, o.d. 1/16 in
Paramètres ICP- MS	
Puissance rf	1250 W
Débits des gaz :	
Plasma	15 l min <sup>-1</sup>
Auxiliaire	0,9 l min <sup>-1</sup>
Nébuliseur	0,6 l min <sup>-1</sup>
Isotopes, "dwell time"	Hg (202, 201, 200, 199, 198), 30 ms Tl (203, 205), 5 ms

Laboratoire CIME :

L'ICP-MS utilisé pour cette étude est un X-SERIES 2 (Thermo Scientific) équipé d'une torche double entrée et d'un cône Xs. Le système chromatographique utilisé est un GC 6890N, (Agilent) équipé d'un passeur automatique d'échantillon 7683 CN, (Agilent). Le GC est relié à la torche par une ligne de transfert commerciale (Restek).

Les conditions opératoires utilisées sont identiques à celles présentées dans le tableau 14, à l'exception de l'injection. Un volume d'injection de 1 µl est introduit dans un injecteur « *on-column* » à 75 °C puis une rampe de montée en température de 120 °C min<sup>-1</sup> est appliquée jusqu'à atteindre 280 °C. L'acquisition des données a été réalisée en mode « temps résolu » (Time-Resolved-Analysis ou TRA). Le logiciel chromatographique de l'ICP-MS (*Plasmalab*) a été utilisé pour l'intégration des aires de pics. Les données sont traitées par S-IDMS et IDP avec la même feuille de calcul que le laboratoire LCABIE. Certaines données ont également été traitées par D-SS-IDMS à partir d'une feuille de calcul développées au sein du laboratoire LCABIE.

---

Commun aux deux laboratoires :

Entre chaque solution analysée, un rinçage de la seringue est effectué avec de l'isooctane. La colonne et la colonne de garde sont régulièrement nettoyées en injectant une dizaine de fois de l'isopropanol. Elles sont également régulièrement régénérées par application d'un mode opératoire préconisé par le constructeur ; un débit d'He de  $2,5 \text{ ml min}^{-1}$  va circuler pendant 15 à 20 minutes dans la colonne afin d'évacuer toutes traces d'air puis la colonne va être chauffée selon le programme suivant :  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  jusqu'à  $320^\circ\text{C}$ , maintenue pendant 2 à 3h.

## **VI. Résultats et discussion**

Les travaux présentés en VI.1 ont été menés au sein du laboratoire LCABIE à Pau et ont fait l'objet d'un article soumis au journal « International Journal of Environmental Analytical Chemistry » (Article I). Le reste des travaux a été mené au sein du laboratoire CIME à Maisons-Alfort et a également fait l'objet d'un article accepté par « Analytical and Bioanalytical Chemistry » (Article II).

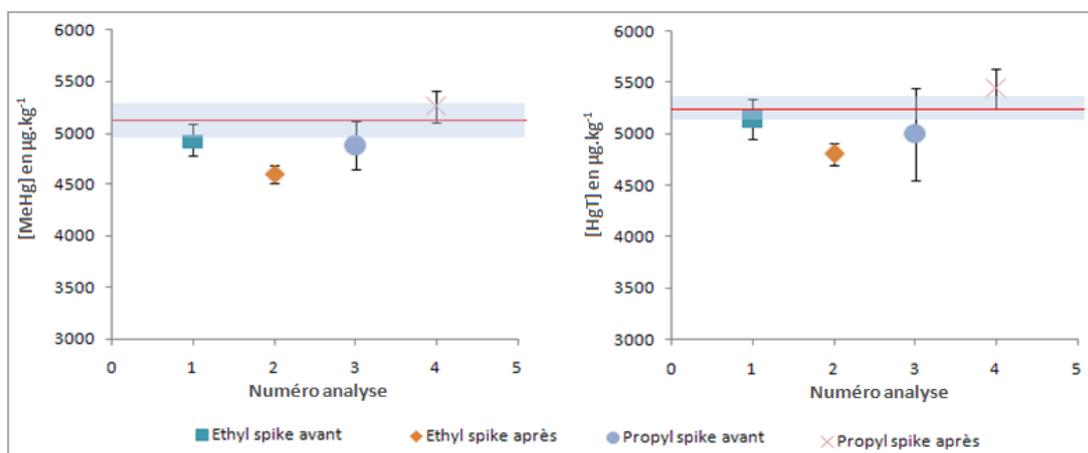
### **VI.1 Optimisation de l'étape de marquage isotopique**

L'objectif de cette étude a été de déterminer l'efficacité du marquage isotopique des espèces mercurielles sur la quantification des taux de transformation. Les analyses ont été menées sur 3 prises d'essai analysées en triplicat de deux matériaux de référence certifiés (DOLT-4 et BCR-464). Lors de cette étude, les pourcentages de méthylation (M) et déméthylation (D) induits par les étapes d'extraction et de dérivation ont également été évalués.

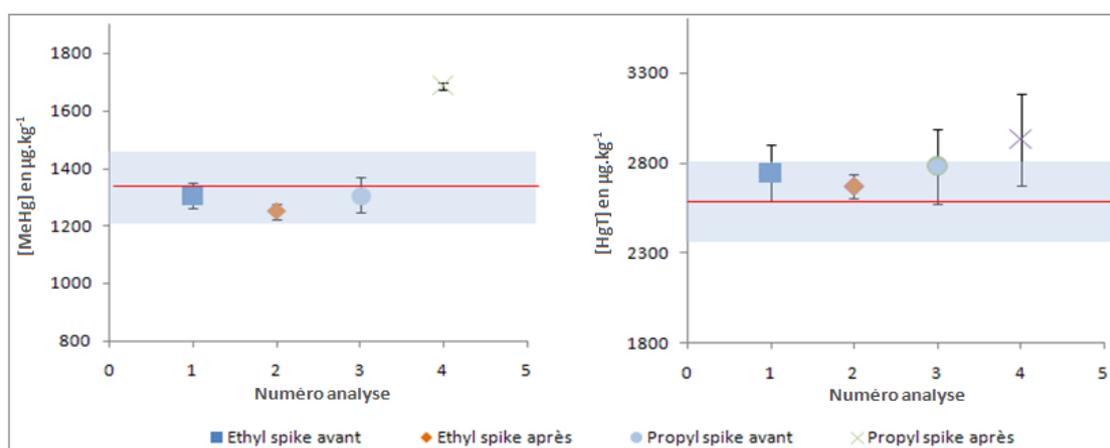
Quatre méthodes de préparation d'échantillon ont été utilisées :

- (1) Marquage isotopique des espèces mercurielles avant extraction MAE et dérivation par propylation.
- (2) Marquage isotopique des espèces mercurielles avant extraction MAE et dérivation par éthylation.
- (3) Marquage isotopique des espèces mercurielles après extraction MAE et dérivation par propylation.
- (4) Marquage isotopique des espèces mercurielles après extraction MAE et dérivation par éthylation.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article I et reportés sous forme graphique dans les figures 16 et 17. Les valeurs de référence certifiées sont représentées par un trait rouge et les intervalles de tolérance définis par les fabricants par des plages bleues. Les concentrations en HgT sont obtenues en sommant le MeHg et le iHg. Ces teneurs en HgT sont utilisées plutôt que les teneurs en iHg car elles sont certifiées et fournies avec un écart-type.



**Figure 16** : Analyses du BCR-464 (en  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Comparaison entre 2 techniques de marquage et de dérivation



**Figure 17** : Analyses du DOLT-4 (en  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Comparaison entre 2 techniques de marquage et de dérivation

Les concentrations obtenues en marquant l'échantillon avant l'étape d'extraction sont généralement en meilleur accord avec les teneurs certifiées que les concentrations obtenues en marquant l'échantillon après extraction. De plus, il n'y a pas de différence notable entre les teneurs obtenues par spike avant et propylation et celles obtenues par spike avant et éthylation.

Les taux de méthylation (M) et de déméthylation (D), présentés dans l'article I, permettent de constater la formation d'artéfacts durant l'étape d'extraction. En effet, particulièrement pour le

DOLT-4, les taux de M augmentent lorsque l'échantillon est spiké avant extraction (8% en éthylation et en propylation), par rapport aux taux calculés en marquant l'échantillon après extraction (0,9% en éthylation et 2% en propylation).

En conclusion, un marquage de l'échantillon avant l'étape d'extraction est préférable. Cette technique sera donc conservée pour le restant de l'étude. Par contre, cette étude ne permet pas de choisir entre le tétrapropylborate de sodium ( $\text{NaBPr}_4$ ) et le tétraéthylborate de sodium ( $\text{NaBEt}_4$ ). Néanmoins, le  $\text{NaBEt}_4$  manque de spécificité. En effet, il peut être utilisé que pour la détermination du MeHg car les formes éthylées du iHg et de l'EtHg ne sont pas distinguables, les espèces dérivées étant toutes deux l' $\text{Et}_2\text{Hg}$ . De plus, la pureté de ce réactif de dérivation a été remise en question par Garcia-Fernandez et al (2000) et par Leermarkers et al (2005) qui ont noté la présence d'impuretés métalliques dans certains lots commercialisés. Par conséquent, le  $\text{NaBPr}_4$  sera retenu comme réactif de dérivation pour les travaux à venir.

## VI.2 Optimisation de l'étape d'extraction

L'objectif de cette étude a été d'évaluer trois techniques communes d'extraction en comparant leur efficacité, vitesse et aptitude à conserver l'intégrité des échantillons.

Les caractéristiques de ces techniques sont :

- (1) Extraction assistée par micro-ondes (MAE) : rapide (quelques min), efficace mais violente. Peut provoquer la destruction totale ou partielle de certains analytes (Tseng et al., 1997). Peut recevoir 6 échantillons avec le système Multiwave utilisant des matras en quartz.
- (2) L'extraction solide-liquide par *digi*PREP (SLE) : relativement lente (2 h) mais moins agressive que la MAE. Peut recevoir 48 échantillons.
- (3) L'extraction solide-liquide à température ambiante (ERT) : très lente (24 h) mais non agressive. Pas de limitation en nombre d'échantillon.

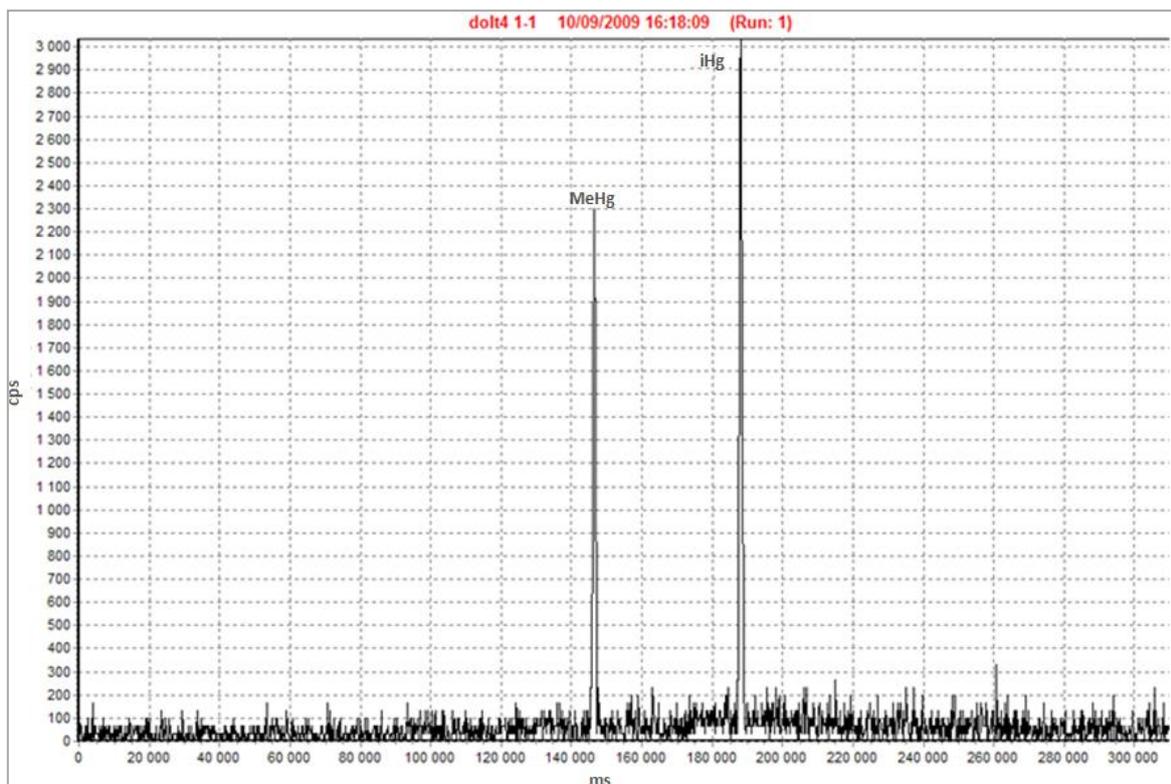
Les extractions solide/liquide sont reconnues pour être fortes consommatrices de solvants mais dans ces travaux, les volumes de TMAH sont inchangés, quelque soit la technique d'extraction utilisée.

Le mode opératoire appliqué au sein du laboratoire CIME pour des analyses en HgT pour la SLE a été conservé, avec néanmoins une légère augmentation de la température d'extraction pour

## Partie II

une meilleure efficacité (85°C pendant 2 h au lieu de 80 °C pendant 2 h). Après recherche bibliographique, la durée de la ERT a été fixée à une nuit (Clough et al., 2005, Yang et Sturgeon, 2005, Li et al., 2008, Yin et al., 2008). Pour plus de rigueur, la mise en contact des analytes avec la matrice se fait systématiquement à 17 h et la poursuite de la préparation des échantillons à 9 h le lendemain.

Trois programmes MAE ont été sélectionnés d'après l'article de Abranko et al. (2005) et comparés : 160 W (4 min), 120 W (8 min) et 60 W (3 min). Les figures 18 à 20 présentent les chromatogrammes obtenus pour la détermination du MeHg et du iHg du DOLT-4 par MAE et en utilisant les conditions opératoires énoncées.



**Figure 18** : MAE 160W (4 min)

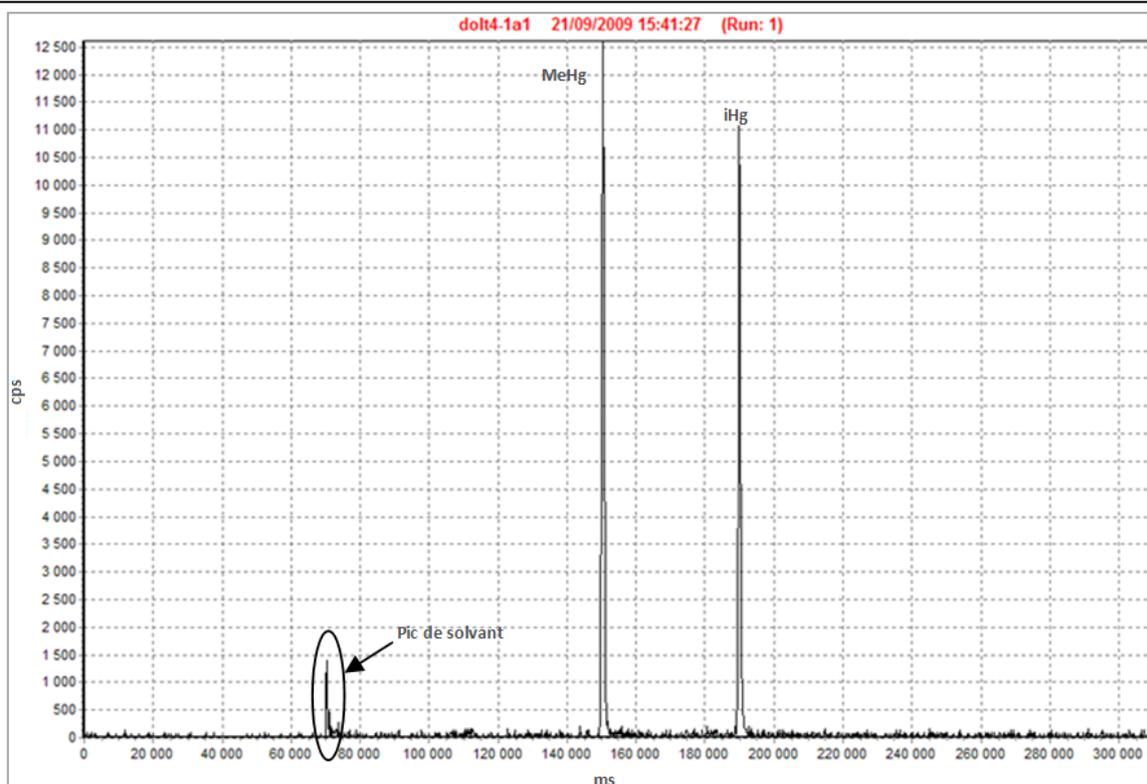


Figure 19 : MAE 120W (8 min)

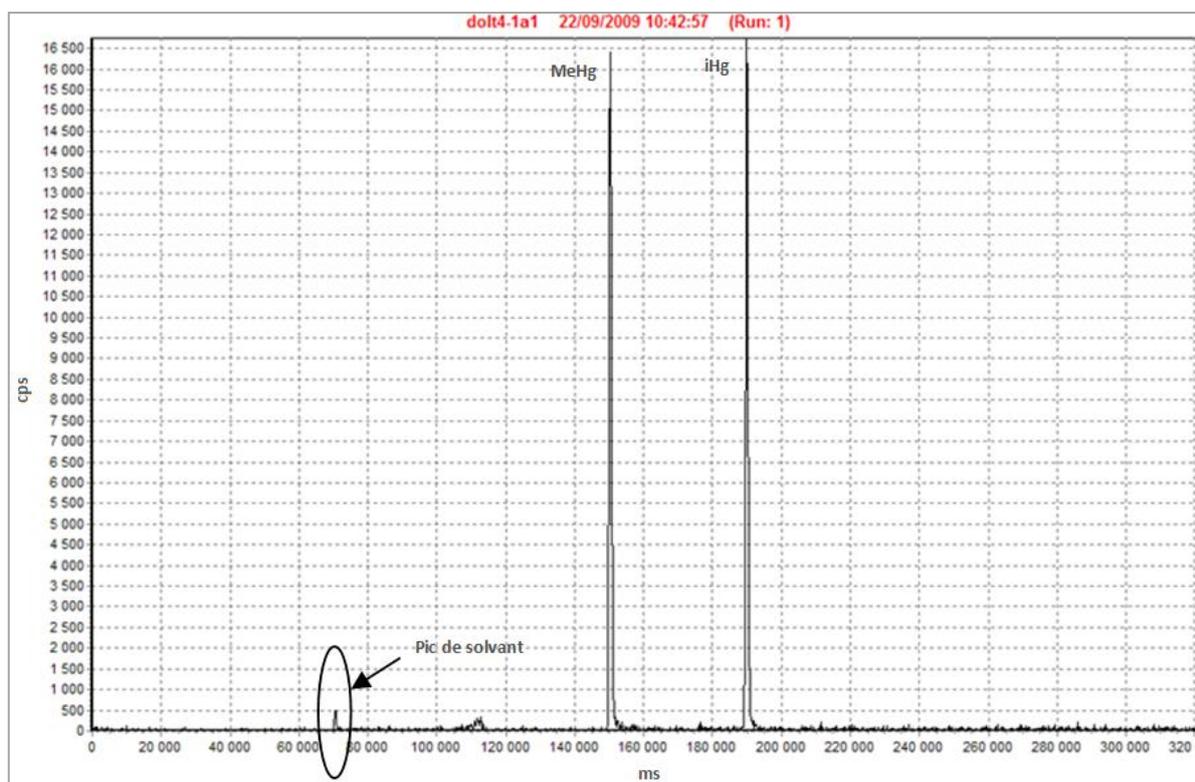
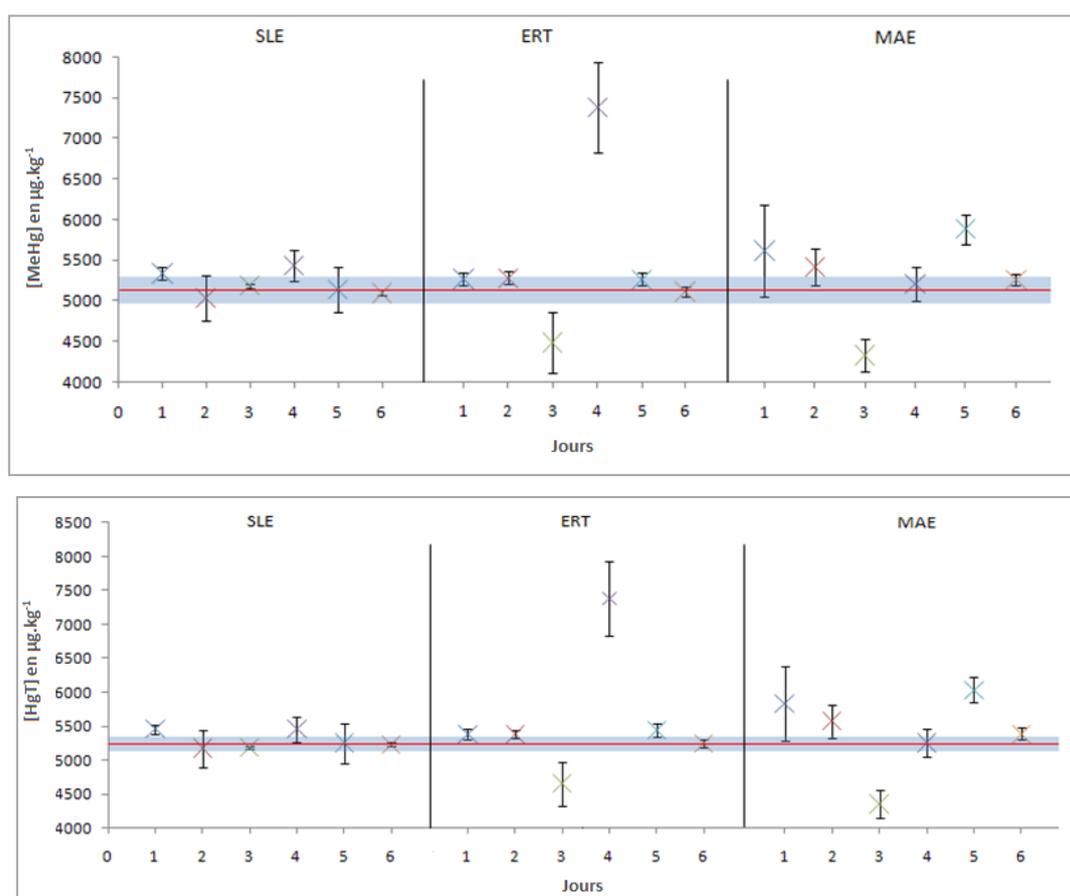


Figure 20: MAE 60W (3 min)

Les chromatogrammes indiquent que les plus hautes intensités de pic sont observées avec une extraction MAE à 60W pendant 3 minutes qui semble être le mode opératoire le plus efficace pour l'extraction du MeHg et du iHg dans le BCR-464. En effet une diminution de l'intensité des pics est constatée avec l'augmentation de la puissance de l'irradiation. L'extractions MAE à 60 W durant 3 minutes est donc retenue.

Après définition des modes opératoires à utiliser, les trois méthodes d'extraction ont été évaluées en analysant trois MRCs (BCR-464, DOLT-4, TORT-2) en double et à des jours différents (n = 6). Les résultats obtenus pour le MeHg et le HgT par D-IDMS sont présentés graphiquement dans les figures 21 à 23.



**Figure 21** : Analyse du BCR-464 (en  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Comparaison entre 3 techniques d'extraction

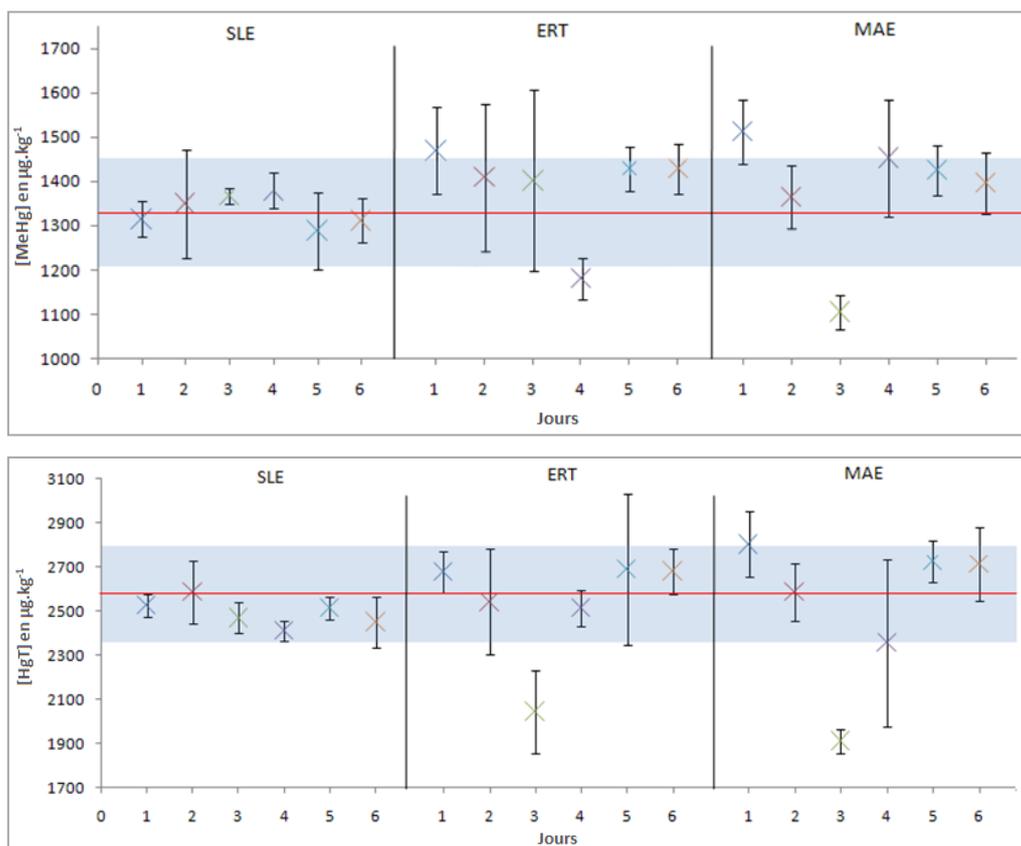


Figure 22 : Analyse du DOLT-4 (en  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Comparaison entre 3 techniques d'extraction

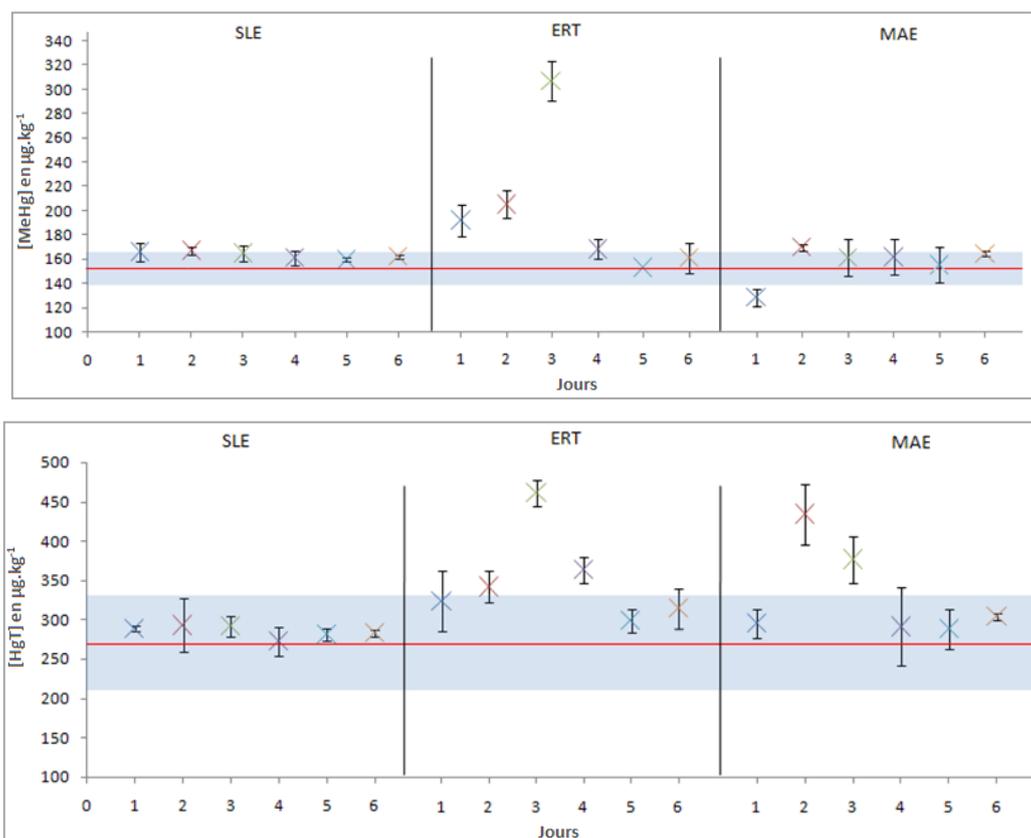
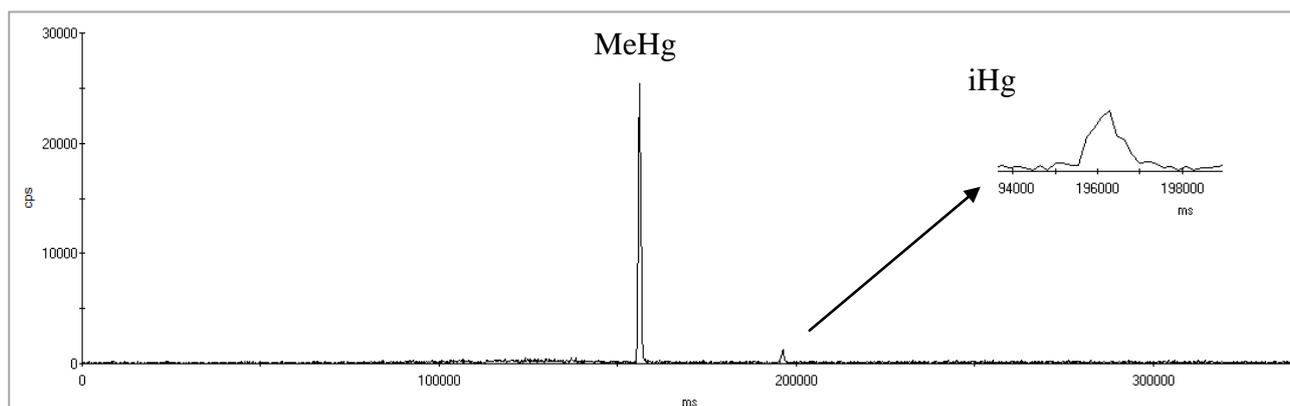


Figure 23 : Analyse du TORT-2 (en  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Comparaison entre 3 techniques d'extraction

La MAE et l'ERT présentent de nombreuses teneurs en Hg en désaccord avec les teneurs certifiées, ce qui démontre leur manque de justesse et fidélité. De plus, les écart-types calculés sont relativement grands, avec des écart-types obtenus par MAE globalement supérieurs aux écart-types obtenus par ERT. Par contre, la SLE est juste pour les trois MRCs et les écart-types relativement faibles traduisent une répétabilité acceptable de la méthode. Toutefois, la littérature a reporté des analyses avec extraction par MAE pour ces 3 MRCs qui fournissent d'excellents résultats (Ramalhosa et al., 2001, Rodil et al., 2002, Clough et al., 2003, Berzas-Nevado et al., 2005, Vidler et al., 2007, Reyes et al., 2009). Il serait par conséquent intéressant de refaire cette comparaison à partir d'un système micro-ondes plus récent.

Les trois techniques d'extractions ont également été comparées en prenant en considération les transformations inter-espèces engendrées. Les taux de méthylation (M) et déméthylation (D) calculés pour chaque extraction et MRCs sont présentés dans le tableau 2 de l'article II. Les résultats indiquent des taux de M et D globalement similaires entre les trois techniques d'extraction avec toutefois des taux légèrement plus faibles en SLE.

Quelque soit l'extraction considérée, les taux de M dans le BCR-464 semblent aberrants (-191% pour la SLE, -248% pour la ERT et -27% pour la MAE). Ce phénomène peut s'expliquer par l'importante différence de concentration entre le MeHg et le iHg. Si le rapport entre ces deux espèces est supérieur à 0,05 ( $\text{MeHg} \geq 95\%$ ), la quantification de M est biaisée (Monperrus et al., 2008). Dans le cas du BCR-464, 98% du Hg est méthylié. Par conséquent, le pic de iHg est relativement faible, rendant la quantification difficile en augmentant les erreurs d'intégration, comme le montre la figure 24. Pour ce type de matrice, une juste quantification des taux de M est faite en quantifiant séparément les deux espèces mercurielles, soit en extrayant le MeHg de l'échantillon et en concentrant le iHg.



**Figure 24** : Exemple de chromatogramme obtenu sur le BCR-464 après extraction SLE (m/z 202).

En conclusion, trois techniques d'extraction ont été comparées en termes d'efficacité, rapidité et transformations engendrées à l'aide de trois MRCs. Ces trois MRCs ont été choisis en fonction de leurs concentrations en MeHg et en iHg et de leurs pourcentages en MeHg de façon à représenter au mieux les variations possibles de ces paramètres dans les échantillons réels. L'extraction solide-liquide par *digi*PREP (SLE) à 85°C pendant 2 h a été conservée pour le restant de l'étude car elle est la plus juste et fidèle. De plus, elle engendre moins de transformations inter-espèces que les deux autres techniques d'extraction.

### VI.3 Optimisation de l'étape de dérivation

Une première étude a déjà été menée sur l'étape de dérivation et discutée dans le paragraphe VI.1. Il a alors été choisi que la dérivation des espèces Hg serait réalisée par le tétrapropylborate de sodium (NaBPr<sub>4</sub>). Cette seconde étude a pour but d'améliorer les conditions de dérivation en optimisant l'étape d'agitation de l'échantillon afin de la rendre plus applicable en routine. Il est à noter que cette étude n'influence en rien la quantification par IDMS ni l'exactitude des résultats car les spikes sont ajoutés avant extraction.

La majorité des applications présentées dans la littérature utilise une agitation manuelle rigoureuse (RMA) pour favoriser la mise en contact entre les espèces mercurielles et l'agent de dérivation ainsi que le transfert de phase (Gomez-Ariza et al., 2005, Monperrus et al., 2008, Castillo et al., 2010). Il paraît néanmoins légitime de s'interroger quant à la répétabilité et la reproductibilité de cette technique. De plus, à moins de mettre en place un dispositif précaire consistant à mettre plusieurs échantillons dans un sac, une main ne peut pas agiter plus de 3 tubes à la fois. C'est pour ces raisons que deux autres dispositifs d'agitation ont été étudiés :

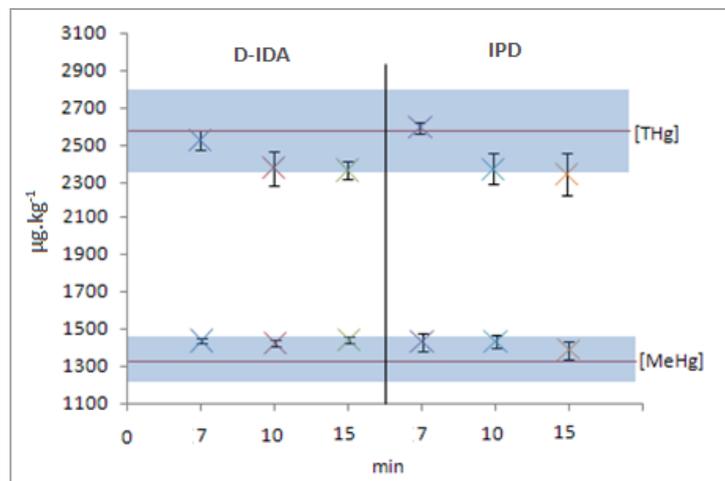
- (1) Agitation à l'aide d'un vortex (VA) : agitation mécanisée mais l'utilisateur doit être présent et la capacité du plateau est faible (10 échantillons maximum).
- (2) Agitation à l'aide d'un plateau rotatif (RA) : totalement automatisée et pouvant recevoir 46 tubes. La figure 25 présente cet appareil pour une meilleure représentation de son fonctionnement.



**Figure 25** : Système d'agitation rotative (RA)

En RMA, le temps d'agitation de 5 minutes reporté dans la littérature est conservé. Certains laboratoires utilisent une agitation VA mais aucun temps d'agitation n'est communiqué (Davis et al., 2007, Point et al., 2007). Un temps de 5 minutes sera donc également appliqué.

Pour la RA, trois temps de dérivation (7, 10 et 15 min) ont été testés chacun trois fois, sur le DOLT-4. Les résultats obtenus pour le MeHg et le HgT par D-IDMS et IPD lors de ces agitations RA sont présentés en figure 26.

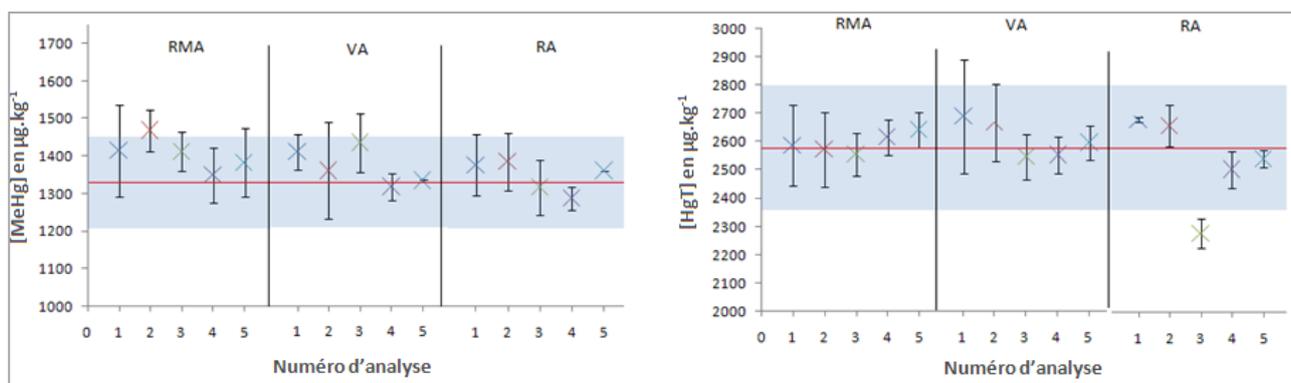


**Figure 26** : Analyse du DOLT-4 par RA (en  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), D-IDMS et IPD

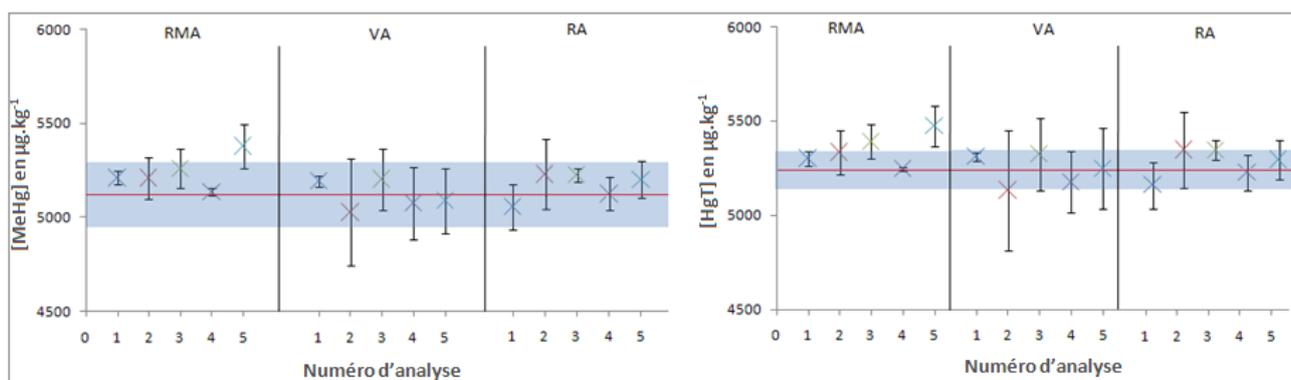
Les teneurs en MeHg et HgT sont en accord avec les teneurs certifiées. La teneur en MeHg est constante dans le temps tandis que la teneur en HgT diminue. Il peut donc être conclu que la

teneur en iHg dans la phase organique diminue avec l'augmentation du temps d'extraction. Un temps d'extraction de 7 min est conservé en RA.

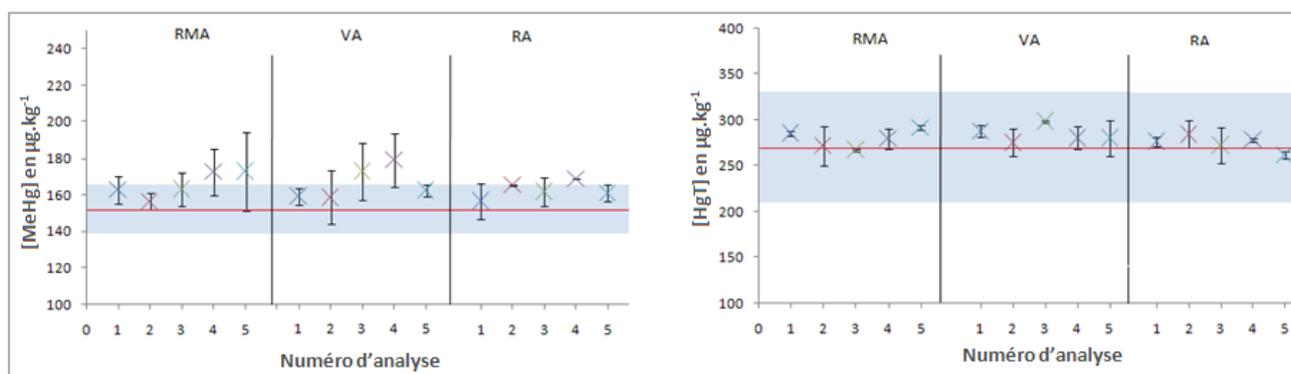
Afin d'étudier uniquement les variations dues aux modes d'agitation testés, chaque MRC (DOLT-4, BCR-464 et TORT-2) a été extrait une seule fois puis l'extrait a été aliquoté 5 fois par mode d'agitation. Chaque aliquot a ensuite été analysé 3 fois et les figures 27 à 29 présentent les résultats obtenus en MeHg et HgT sur chaque aliquot avec leur écart-type respectif.



**Figure 27 :** Analyse du DOLT-4 (en  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), comparaison entre 3 techniques d'agitation



**Figure 28 :** Analyse du BCR-4, comparaison entre 3 techniques d'agitation



**Figure 29 :** Analyse du TORT-2, comparaison entre 3 techniques d'agitation

Les résultats issus des trois techniques d'agitation sont globalement proches. Néanmoins, la RMA montre plusieurs teneurs en désaccord avec les teneurs certifiées. Les écart-types en VA sont plus grands qu'en RA, traduisant une répétabilité et reproductibilité plus faibles. Les trois techniques d'agitation sont dans l'ensemble fidèles mais la RA semble plus précise. Il faut toutefois noter une teneur en HgT trop faible pour le DOLT-4 (figure 27). A la vue des autres résultats, cette valeur peut être supposée aberrante. La concentration en MeHg est en accord avec la teneur certifiée donc l'erreur porte sur le iHg qui a probablement été mal dérivé.

En conclusion, la précision de trois techniques d'agitation pour favoriser le transfert de phase des analytes de la phase aqueuse vers la phase organique a été comparée. L'agitation à l'aide d'un plateau rotatif (RA pendant 7 min) semble la méthode d'agitation la plus performante.

#### **VI.4. Evaluation des différentes techniques de calcul par dilution isotopique**

Comme expliqué dans la revue I, trois techniques de calcul par dilution isotopique (ID) peuvent être appliquées :

- (1) La double dilution isotopique (D-IDMS) corrige les résultats finaux des extractions non-quantitatives et des pertes d'analytes.
- (2) La double dilution isotopique spécifique à l'espèce (D-SS-IDMS) corrige les résultats finaux des extractions non-quantitatives et des pertes d'analytes. Elle quantifie les réactions inter-espèces pouvant intervenir entre les isotopes 199, 201 et 202.
- (3) La déconvolution isotopique (IPD) corrige les résultats finaux des extractions non-quantitatives et des pertes d'analytes. elle quantifie les réactions inter-espèces pouvant intervenir entre l'ensemble des isotopes du mélange et permet d'estimer le biais en masse de l'appareil.

Ces trois techniques ont été appliquées sur les données brutes de 3 MRCs (DOLT-4, BCR-464 et TORT-2). Chaque MRC a été analysé trois fois et en triplicata. Ces MRCs ont été préparés selon la préparation d'échantillon optimisée (marquage isotopique, SLE avec TMAH, propylation avec RA). Les résultats de cette étude sont présentés dans l'Article II. Pour plus de commodité, le tableau 4 de l'article a été reporté ici (tableau 15).

**Tableau 15** : Concentrations en MeHg et HgT ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) pour les trois MRCs ( $n = 3$ ).

		MeHg	HgT	M (%)	D (%)
TORT-2	<b>Valeur certifiée</b>	<b>0,152 ± 0,13</b>	<b>0,270 ± 0,060</b>	-	-
	D-IDMS	0,165 ± 0,007	0,292 ± 0,013	-	-
	IPD	0,160 ± 0,002	0,272 ± 0,004	4	3
	D-SS-IDMS	0,164 ± 0,017	0,288 ± 0,023	0	2
DOLT-4	<b>Valeur certifiée</b>	<b>1,33 ± 0,12</b>	<b>2,58 ± 0,22</b>	-	-
	D-IDMS	1,29 ± 0,09	2,51 ± 0,05	-	-
	IPD	1,28 ± 0,12	2,39 ± 0,10	3	4
	D-SS-IDMS	1,29 ± 0,15	2,47 ± 0,29	-1	3
BCR-464	<b>Valeur certifiée</b>	<b>5,12 ± 0,17</b>	<b>5,24 ± 0,10</b>	-	-
	D-IDMS	5,10 ± 0,30	5,24 ± 0,35	-	-
	IPD	5,18 ± 0,35	5,28 ± 0,35	-196	3
	D-SS-IDMS	5,27 ± 0,33	5,33 ± 0,33	-65	1

Les concentrations en MeHg et HgT calculées par D-SS-IDMS et IPD sont en accord avec les teneurs certifiées. Les trois MRCs présentent de faibles taux de transformation, la quantification par D-IDMS permet donc également une détermination juste des espèces mercurielles. Comme vu précédemment au chapitre IV.2.3, les taux M obtenus pour le BCR-464 sont aberrants en raison de la trop grande différence de concentration entre le MeHg et le iHg dans ce MRC.

Plusieurs études présentées dans la littérature ont montré que la M et la D sont des réactions dépendantes de la matrice étudiée (Point et al., 2007 et 2008, Skip Kinston et al., 2008, Castillo et al., 2010). Par conséquent, les observations faites sur les 3 MRCs ne peuvent pas être étendues à toutes les matrices. Néanmoins, cette comparaison permet de conclure que la D-IDMS peut être appliquée aux matrices connues pour ne pas engendrer de transformations inter-espèces, comme par exemple ces trois MRCs, afin d'alléger la procédure analytique. Pour les autres matrices, une quantification par IPD ou D-SS-IDMS est préférable.

#### VI.4.1 Quantification des taux de méthylation et déméthylation

L'efficacité de la D-SS-IDMS et de l'IPD à quantifier les transformations a été évaluée à partir des mêmes données brutes. Les taux de M et de D calculés par triplicata d'injection (un même vial injecté trois fois) et pour les trois MRCs sont très variables. Un exemple de ces fluctuations est présenté dans le tableau 16.

**Tableau 16** : M et D calculés pour chaque MRCs pour un triplicata d'injection

	DOLT-4		TORT-2		BCR-464	
	D-SS-IDMS	IPD	D-SS-IDMS	IPD	D-SS-IDMS	IPD
M (%)	1,1	1,3	4,3	6,7	-340	-34
	1,6	2,3	-0,36	4,9	-12	-96
	4,2	4,0	-7,3	-2,9	192	-99
<b>Moyenne</b>	<b>2,3</b>	<b>2,5</b>	<b>-1,1</b>	<b>2,9</b>	<b>-53</b>	<b>-77</b>
<b>Ecart-type</b>	1,7	1,3	5,8	5,1	269	37
<b>CV (%)</b>	<b>74%</b>	<b>52%</b>	<b>527%</b>	<b>176%</b>	<b>508%</b>	<b>48%</b>
D (%)	9,4	9,9	1,1	0,80	0,95	1,3
	6,3	6,3	1,0	2,9	0,53	8,3
	3,0	3,8	7,4	7,9	-1,1	2,6
<b>Moyenne</b>	<b>6,2</b>	<b>6,7</b>	<b>3,2</b>	<b>3,9</b>	<b>0,13</b>	<b>4,1</b>
<b>Ecart-type</b>	3,2	3,1	3,7	3,7	1,1	3,7
<b>CV (%)</b>	<b>52%</b>	<b>46%</b>	<b>116%</b>	<b>95%</b>	<b>846%</b>	<b>90%</b>

Ces résultats montrent que les coefficients de variation peuvent varier jusqu'à plus de 800%. Ces variations des taux de M et D pour un même triplicata d'injection, ont également été observées au sein du laboratoire LCABIE à Pau (cf. Article I). Elles semblent toutefois plus accentuées au laboratoire CIME, probablement en raison de la vétusté du GC, et plus particulièrement d'une probable défaillance du port d'injection. En effet, des problèmes de répétabilité, plus marqués dans le cas d'une calibration par droite d'étalonnage, ont été constatés, ainsi que de fortes contaminations du port d'injection par le Hg et des difficultés d'alignement entre l'aiguille du GC, l'insert d'injection et la colonne de séparation.

Afin de déterminer la source de ces fluctuations, la première action menée a été de s'assurer de la fiabilité des feuilles de calculs. L'IPD permettant d'obtenir plus d'information que la D-SS-IDMS (concentrations, taux de M et de D, biais en masse), les investigations se sont portées uniquement sur cette technique de calcul.

### VI.4.2 Vérification de la fiabilité des feuilles de calculs par IPD

L'IPD fait intervenir des régressions linéaires multiples et l'élucidation mathématique par calcul matriciel se fait par l'action de la fonction « solveur » du logiciel Excel. La feuille de calcul par IPD peut donc être vue comme une « boîte noire », les possibilités d'action de l'utilisateur étant très limitées. La figure 30 présente une capture d'écran faite sur un calcul IPD pour le BCR-464. Les uniques lieux d'interactions avec cette feuille de calcul sont les plages grises et la case « square sum of residuals » notée **1** sur la figure. Les cases grises sont remplies par l'utilisateur à partir des données brutes obtenues durant l'analyse (aires sous le pic, pesées, abondances isotopiques et concentrations des spikes). La fonction solveur est ensuite appliquée à la case notée **1**. Les concentrations en MeHg et iHg de l'échantillon sont calculées en prenant en considération les taux de M et de D (notées F1 et F2 sur la feuille). Le biais en masse est également calculé et apparaît dans la case **2**.

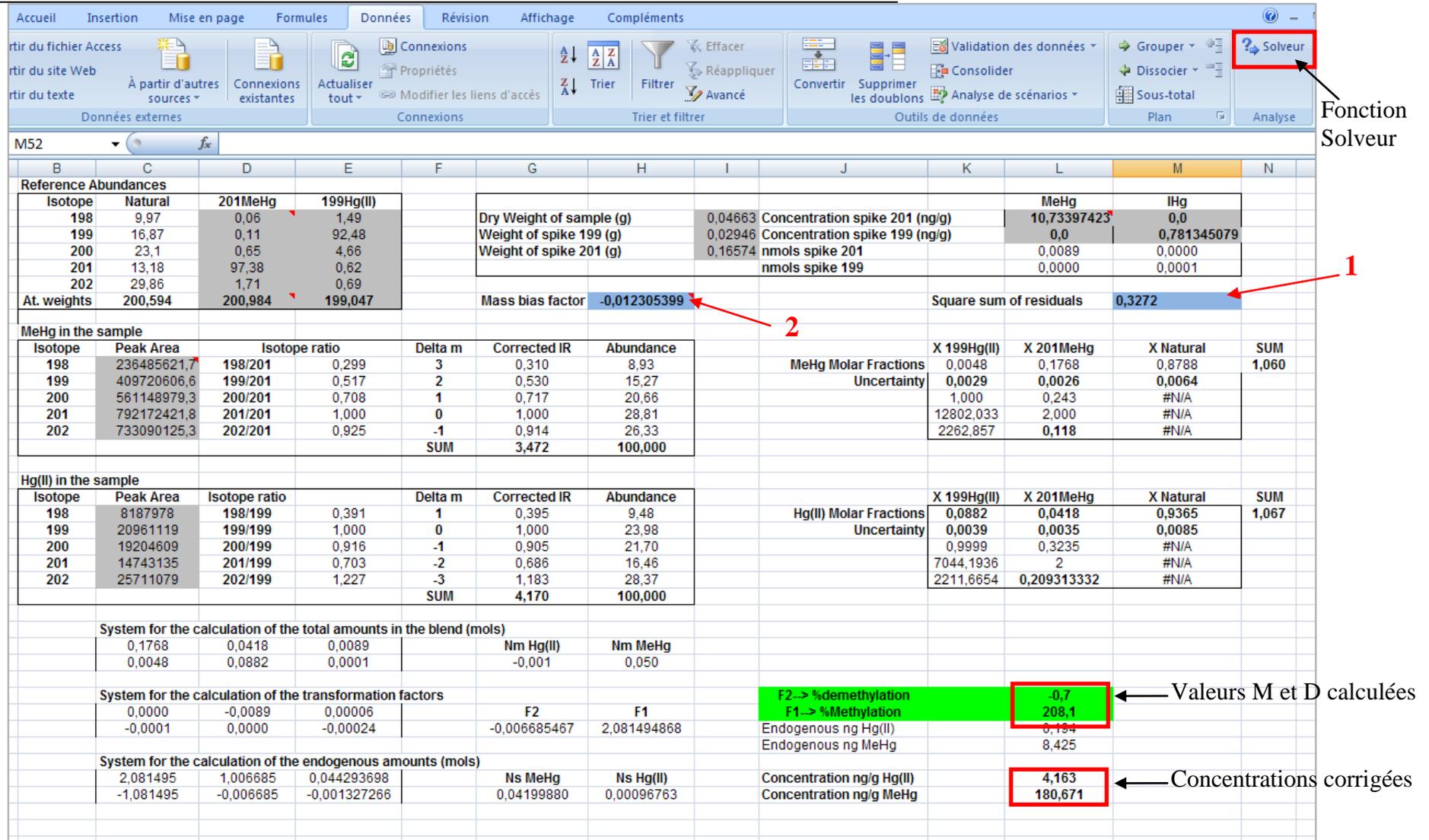


Figure 30 : Capture d'écran sur la feuille de calcul par IPD

Les feuilles de calcul utilisées permettent de calculer sur une même feuille jusqu'à 3 résultats. Si on calcule les 3 résultats sur une même feuille, 6 configurations possibles d'activation de la fonction solveur sont possibles :

- Activation du premier calcul, du second et du troisième
- Activation du second calcul, du premier puis du troisième
- Activation du troisième calcul, du premier puis du second
- Etc.

L'ordre d'activation de la fonction sur une même feuille modifie-t-il les résultats ?

Et obtenons-nous les mêmes résultats si une feuille de calcul distincte est utilisée pour chaque résultat ?

Afin de répondre à ces questions, des tests ont été réalisés sur une série de résultats bruts issus d'une analyse dont les résultats sont présentés dans le tableau 17 avec :

Cas 1 : trois calculs par feuille

Cas 2 : un seul calcul par feuille

**Tableau 17** : Evaluation des feuilles de calculs IPD sur un triplicata d'injection

$\mu\text{g kg}^{-1}$	N° résultat	iHg ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	MeHg ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	HgT ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	M (%)	D (%)
<b>Cas 1 :</b> 1 feuille, 3 calculs	1	0,112	5,63	5,74	-356	10
	2	0,119	5,32	5,44	-311	6
	3	0,083	5,67	5,75	-641	29
<b>Cas 2 :</b> 1 feuille, 1 calcul	1	0,112	5,63	5,74	-356	10
	2	0,171	6,58	6,75	-725	20
	3	0,121	7,12	7,24	-367	78

Dans le cas 1, l'ordre d'activation des fonctions solveur testé selon 3 configurations différentes présentées ci-dessus ne modifie pas les concentrations et taux calculés (résultats non montrés). Par contre, les résultats obtenus sont différents entre le cas 1 et le cas 2, à l'exception du premier résultat. Ces données ont ensuite été envoyées au laboratoire LCABIE afin que l'étude soit reproduite à partir de leurs feuilles de calcul. Ils ont obtenus des résultats identiques aux notres.

En conclusion, une différence de quantification a été mise en évidence entre les cas 1 et 2. Par conséquent, les calculs IPD seront dorénavant faits en appliquant un seul calcul par feuille (cas 2) dans les 2 laboratoires.

### **VI.4.3 Analyse statistiques des sources d'erreur**

Pour la mesure par IPD des teneurs mercurielles et des taux de M et de D, une détermination de divers paramètres, dont la plupart sont entachés d'erreurs influant sur le résultat final, est nécessaire (pesées, concentrations et abondances isotopiques des spikes, aires de pics, etc.). Une évaluation de l'erreur globale de la méthode et les pourcentages d'erreur associés à chaque paramètre a été menée d'après la méthode de calcul de la propagation d'incertitude de Kragten (Eurachem, 2000).

Les figures 31 à 33 présentent les bilans statistiques obtenus pour le DOLT-4, le TORT-2 et le BCR-464.

	Kragten0	Kragten1	Kragten2	Kragten3	Kragten4	Kragten5	Kragten6	Kragten7	Kragten8	
<b>Paramètre</b>		X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	nmols spike 201	nmols spike 199	
X 199Hg(II)	0.017878856	0.0436021	0.01787886	0.01787886	0.017878856	0.01787886	0.01787886	0.017878856	0.017878856	
X 201MeHg	0.158519251	0.15851925	0.18211457	0.15851925	0.158519251	0.15851925	0.15851925	0.158519251	0.158519251	
X Natural	0.900160223	0.90016022	0.90016022	0.95640471	0.900160223	0.90016022	0.90016022	0.900160223	0.900160223	
X 199Hg(II)	0.140600247	0.14060025	0.14060025	0.14060025	0.144257285	0.14060025	0.14060025	0.140600247	0.140600247	
X 201MeHg	-0.004980608	-0.00498061	-0.00498061	-0.00498061	-0.004980608	-0.00162609	-0.00498061	-0.004980608	-0.004980608	
X Natural	0.930402831	0.93040283	0.93040283	0.93040283	0.930402831	0.93040283	0.93839903	0.930402831	0.930402831	
nmols spike 201	0.322564847	0.32256485	0.32256485	0.32256485	0.322564847	0.32256485	0.32256485	0.323004847	0.322564847	
nmols spike 199	0.281249801	0.2812498	0.2812498	0.2812498	0.281249801	0.2812498	0.2812498	0.281249801	0.281255581	
<b>Résultats</b>	<b>Kragten 0</b>	<b>Kragten1</b>	<b>Kragten2</b>	<b>Kragten3</b>	<b>Kragten4</b>	<b>Kragten5</b>	<b>Kragten6</b>	<b>Kragten7</b>	<b>Kragten8</b>	
F2--> %demethylation	-2.7	-2.1	-2.7	-2.7	-2.6	-0.9	-2.7	-2.7	-2.7	
F1--> %Methylation	13.3	32.2	11.6	13.3	13.3	13.0	13.3	13.3	13.3	
Concentration ng/g Hg(II)	1496.7	1488.2	1491.7	1499.4	1458.9	1470.9	1509.2	1496.7	1496.7	
Concentration ng/g MeHg	1241.7	965.8	1081.3	1331.0	1246.6	1245.0	1240.1	1243.4	1241.7	
<b>Erreurs</b>		<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>	
Ecart / Kragten 0		-0.6	0.1	0.0	-0.1	-1.8	0.0	0.0	0.0	
		-18.9	1.7	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	
		8.5	5.0	-2.8	37.8	25.8	-12.5	0.0	0.0	
		275.9	160.3	-89.3	-4.9	-3.3	1.6	-1.7	0.0	
<b>Incertitude</b>	<b>Erreur globale</b>	<b>a<sup>2</sup></b>	<b>b<sup>2</sup></b>	<b>c<sup>2</sup></b>	<b>d<sup>2</sup></b>	<b>e<sup>2</sup></b>	<b>f<sup>2</sup></b>	<b>g<sup>2</sup></b>	<b>h<sup>2</sup></b>	<b>Somme des erreurs</b>
F2--> %demethylation	1.9	0.34	0.00	0.00	0.00	3.25	0.00	0.00	0.00	3.59
F1--> %Methylation	19.0	358.16	2.94	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	361.15
Concentration ng/g Hg(II)	48.5	72.60	24.52	7.61	1428.45	665.45	155.84	0.00	0.00	2354.46
Concentration ng/g MeHg	331.4	76097.77	25701.33	7978.52	23.90	11.13	2.61	2.87	0.00	109818.14
<b>Source d'incertitude (%)</b>										
F2--> %demethylation		10	0	0	0	90	0	0	0	
F1--> %Methylation		99	1	0	0	0	0	0	0	
Concentration ng/g Hg(II)		3	1	0	61	28	7	0	0	
Concentration ng/g MeHg		69	23	7	0	0	0	0	0	

Figure 31 : Bilan de l'étude kragten pour le DOLT-4

	Kragten0	Kragten1	Kragten2	Kragten3	Kragten4	Kragten5	Kragten6	Kragten7	Kragten8	
<b>Paramètre</b>		X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	nmols spike 201	nmols spike 199	
X 199Hg(II)	-0.008068537	0.00537287	-0.00806854	-0.00806854	-0.008068537	-0.00806854	-0.00806854	-0.008068537	-0.008068537	
X 201MeHg	0.151675808	0.15167581	0.16400529	0.15167581	0.151675808	0.15167581	0.15167581	0.151675808	0.151675808	
X Natural	0.912127106	0.91212711	0.91212711	0.94151707	0.912127106	0.91212711	0.91212711	0.912127106	0.912127106	
X 199Hg(II)	0.124369488	0.12436949	0.12436949	0.12436949	0.135664233	0.12436949	0.12436949	0.124369488	0.124369488	
X 201MeHg	0.006659369	0.00665937	0.00665937	0.00665937	0.006659369	0.01701977	0.00665937	0.006659369	0.006659369	
X Natural	0.942442614	0.94244261	0.94244261	0.94244261	0.942442614	0.94244261	0.96713884	0.942442614	0.942442614	
nmols spike 201	0.036880471	0.03688047	0.03688047	0.03688047	0.036880471	0.03688047	0.03688047	0.037320471	0.036880471	
nmols spike 199	0.026628701	0.0266287	0.0266287	0.0266287	0.026628701	0.0266287	0.0266287	0.026628701	0.026634481	
<b>Résultats</b>	<b>Kragten 0</b>	<b>Kragten1</b>	<b>Kragten2</b>	<b>Kragten3</b>	<b>Kragten4</b>	<b>Kragten5</b>	<b>Kragten6</b>	<b>Kragten7</b>	<b>Kragten8</b>	
F2-> %demethylation	4.1	3.7	4.1	4.1	3.8	10.5	4.1	4.1	4.1	
F1-> %Methylation	-7.1	4.7	-6.5	-7.1	-7.1	-6.6	-7.1	-7.2	-7.1	
Concentration ng/g Hg(II)	152.6	153.3	153.1	152.4	139.9	141.4	156.7	152.6	152.6	
Concentration ng/g MeHg	186.9	168.1	172.9	192.5	185.9	186.1	187.2	189.1	186.9	
<b>Erreurs</b>		<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>	
Ecart / Kragten 0	0	0.5	0.0	0.0	0.3	-6.4	0.0	0.0	0.0	
	0	-11.8	-0.5	0.0	0.0	-0.5	0.0	0.1	0.0	
	0	-0.7	-0.5	0.2	12.7	11.2	-4.2	0.0	0.0	
	0	18.8	14.0	-5.6	0.9	0.8	-0.3	-2.2	0.0	
<b>Incertitudes</b>	<b>Erreur globale</b>	<b>a<sup>2</sup></b>	<b>b<sup>2</sup></b>	<b>c<sup>2</sup></b>	<b>d<sup>2</sup></b>	<b>e<sup>2</sup></b>	<b>f<sup>2</sup></b>	<b>g<sup>2</sup></b>	<b>h<sup>2</sup></b>	<b>Somme des erreurs</b>
F2-> %demethylation	6.4	0.21	0.00	0.00	0.12	40.87	0.00	0.00	0.00	41.20
F1-> %Methylation	11.8	138.96	0.28	0.00	0.00	0.22	0.00	0.01	0.00	139.47
Concentration ng/g Hg(II)	17.4	0.53	0.29	0.05	160.52	124.52	17.44	0.00	0.00	303.34
Concentration ng/g MeHg	24.2	352.01	196.34	31.85	0.87	0.68	0.09	4.97	0.00	586.81
<b>Source d'incertitude (%)</b>										
F2-> %demethylation		1	0	0	0	99	0	0	0	
F1-> %Methylation		100	0	0	0	0	0	0	0	
Concentration ng/g Hg(II)		0	0	0	53	41	6	0	0	
Concentration ng/g MeHg		60	33	5	0	0	0	1	0	

Figure 32 : Bilan de l'étude kragten pour le TORT-2

	Kragten0	Kragten1	Kragten2	Kragten3	Kragten4	Kragten5	Kragten6	Kragten7	Kragten8	
<b>Paramètres</b>		X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	nmols spike 201	nmols spike 199	
X 199Hg(II)	-0.084553229	0.007611373	-0.08455323	-0.084553229	-0.084553229	-0.084553229	-0.08455323	-0.084553229	-0.084553229	
X 201MeHg	0.166003328	0.166003328	0.250543725	0.166003328	0.166003328	0.166003328	0.16600333	0.166003328	0.166003328	
X Natural	1.041099305	1.041099305	1.041099305	1.24261939	1.041099305	1.041099305	1.0410993	1.041099305	1.041099305	
X 199Hg(II)	-0.118780377	-0.118780377	-0.11878038	-0.118780377	-0.039424983	-0.118780377	-0.11878038	-0.118780377	-0.118780377	
X 201MeHg	0.1055207	0.1055207	0.1055207	0.1055207	0.1055207	0.178311515	0.1055207	0.1055207	0.1055207	
X Natural	1.140667047	1.140667047	1.140667047	1.140667047	1.140667047	1.140667047	1.3141795	1.140667047	1.140667047	
nmols spike 201	1.230481828	1.230481828	1.230481828	1.230481828	1.230481828	1.230481828	1.23048183	1.230921828	1.230481828	
nmols spike 199	0.026692102	0.026692102	0.026692102	0.026692102	0.026692102	0.026692102	0.0266921	0.026692102	0.026697882	
<b>Resultats</b>	<b>Kragten 0</b>	<b>Kragten1</b>	<b>Kragten2</b>	<b>Kragten3</b>	<b>Kragten4</b>	<b>Kragten5</b>	<b>Kragten6</b>	<b>Kragten7</b>	<b>Kragten8</b>	
F2--> %demethylation	-86.2	2.1	-45.6	-86.2	391.3	-338.7	-86.2	-86.2	-86.2	
F1--> %Methylation	-4371.2	207.0	-2264.7	-4371.2	6839.0	-10300.6	-4371.2	-4372.7	-4370.3	
Concentration ng/g Hg(II)	-154.9	-81.5	-177.6	-113.4	703.2	-16.8	-211.0	-154.9	-154.9	
Concentration ng/g MeHg	2443.9	6252.3	1266.2	4593.5	22591.7	5684.9	1126.5	2444.8	2443.9	
<b>Erreurs</b>		<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>	
		-88.2	-40.6	0.0	-477.4	252.5	0.0	0.0	0.0	
<b>Ecart / Kragten 0</b>		-4578.2	-2106.5	0.0	-11210.2	5929.4	0.0	1.5	-0.9	
		-73.4	22.7	-41.4	-858.1	-138.0	56.1	0.0	0.0	
		-3808.4	1177.7	-2149.5	-20147.8	-3241.0	1317.5	-0.9	0.0	
<b>Incertitude</b>	<b>Erreur globale</b>	<b>a<sup>2</sup></b>	<b>b<sup>2</sup></b>	<b>c<sup>2</sup></b>	<b>d<sup>2</sup></b>	<b>e<sup>2</sup></b>	<b>f<sup>2</sup></b>	<b>g<sup>2</sup></b>	<b>h<sup>2</sup></b>	<b>Somme des erreurs</b>
F2--> %demethylation	548.8	7783.83	1647.89	0.00	227938.95	63768.31	0.00	0.00	0.00	301138.97
F1--> %Methylation	13646.4	20960046.20	4437379.35	0.00	125669586.97	35157383.09	0.00	2.35	0.86	186224398.82
Concentration ng/g Hg(II)	875.3	5386.14	515.11	1715.87	736279.83	19051.67	3148.24	0.00	0.00	766096.87
Concentration ng/g MeHg	20944.8	14503611.51	1387080.30	4620448.56	405933183.92	10503759.60	1735720.29	0.76	0.00	438683804.95
<b>Source d'incertitude (%)</b>										
F2--> %demethylation		3	1	0	76	21	0	0	0	
F1--> %Methylation		11	2	0	67	19	0	0	0	
Concentration ng/g Hg(II)		1	0	0	96	2	0	0	0	
Concentration ng/g MeHg		3	0	1	93	2	0	0	0	

Figure 33 : Bilan de l'étude kragten pour le BCR-464

Dans l'encadré « paramètres » :

Les paramètres étudiés lors de cette étude sont :

- En orange : fractions molaires de MeHg pour les isotopes 199, 201 et 202
- En jaune : fractions molaires de iHg pour les isotopes 199, 201 et 202
- En vert : les nombre de moles de spikes  $^{199}\text{iHg}$  et  $^{201}\text{MeHg}$  ajoutés dans l'échantillon.

Dans la colonne « kragten 0 » est reportée les paramètres initiaux du calcul IPD. Les différents paramètres étudiés ont été modifiés un par un, en ajoutant à chaque valeur son incertitude maximale. Par exemple, pour un paramètre égale à  $a \pm \Delta a$ , la valeur modifiée sera  $a + \Delta a$ . Les paramètres modifiés sont notés de « Kragten 1 » à « Kragten 8 » et sont inscrits dans les cases rouges.

Dans les encadrés « résultats » :

Dans le premier encadré est reporté en « kragten 0 » les taux de méthylation et déméthylation ainsi que les concentrations iHg et MeHg réellement obtenus. Les « Kragten 1 » à « Kragten 8 » fournissent les résultats obtenus après modification d'un paramètre.

Dans le second encadré, l'écart entre la valeur réelle et la valeur modifiée est calculée (exemple : « Kragten 0 » - « Kragten 1 »).

Dans l'encadré « incertitude » :

Pour chaque paramètre modifié, les incertitudes associées sont définies par le carré de l'écart à la valeur réelle et sont notées de  $a^2$  à  $h^2$ . L'erreur globale est ensuite calculée d'après la formule 6 suivante :

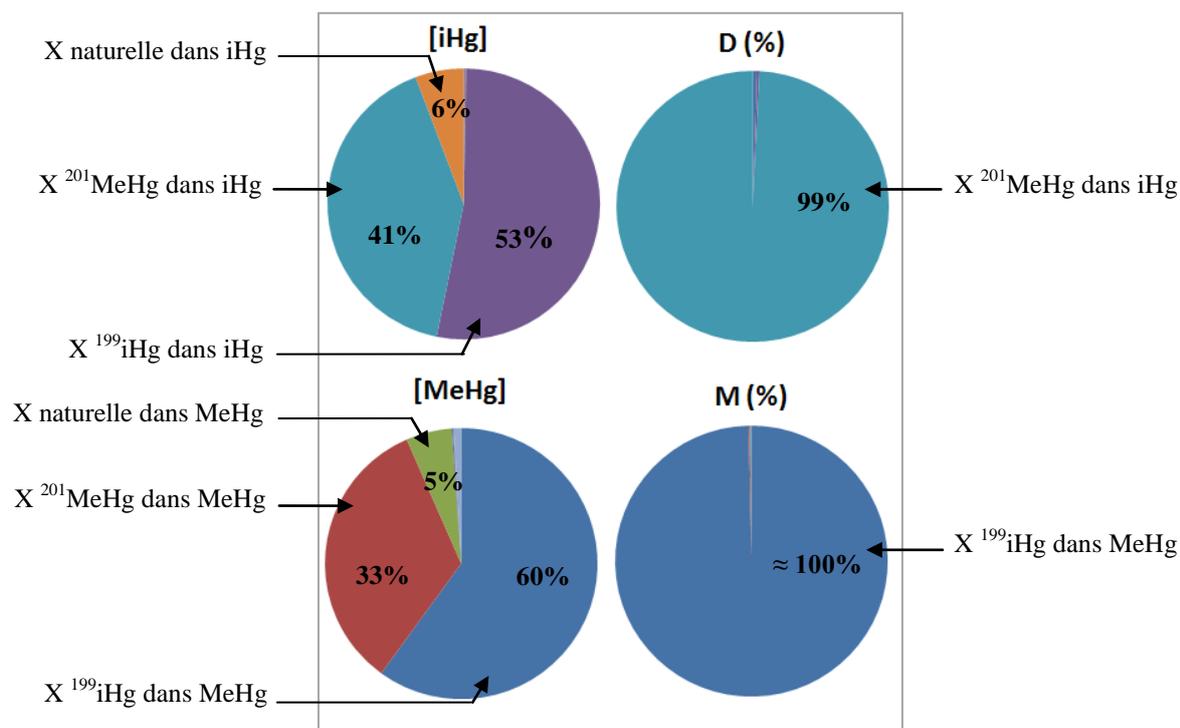
$$\text{Erreur globale} = \sqrt{a^2 + b^2 + c^2 + d^2 + e^2 + f^2 + g^2 + h^2} \quad (6)$$

Dans l'encadré « source d'incertitude (%) » :

La contribution de chaque paramètre dans l'erreur globale est déterminée d'après la formule 7 suivante :

$$\% \text{ incertitude} = \frac{100 \times (a^2, b^2, c^2, \dots, h^2)}{\text{Somme des erreurs}} \quad (7)$$

Une représentation graphique des sources d'incertitude liées aux déterminations des concentrations de MeHg et iHg et des taux M et D du TORT-2 est présentée en figure 34.



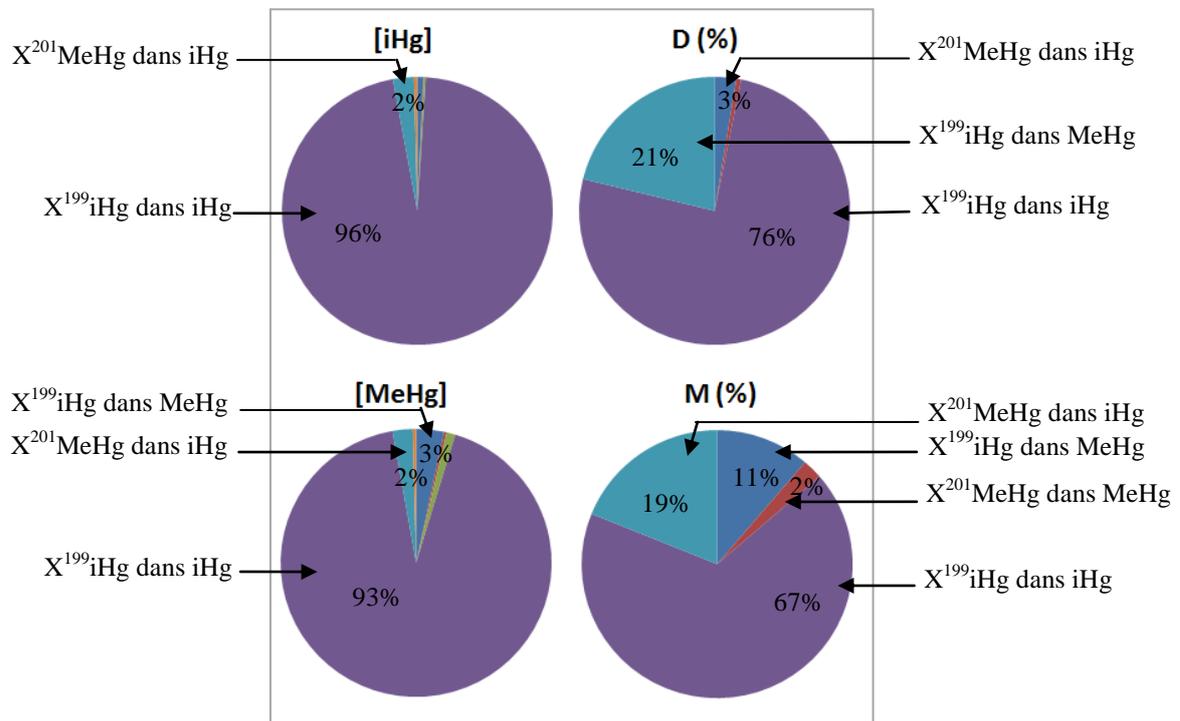
**Figure 34** : Représentation graphique de l'étude kragten sur le TORT-2

L'erreur globale associée à la concentration en iHg du TORT-2 est issue à 53% de la fraction molaire de iHg du spike <sup>199</sup>iHg, à 41% de la fraction molaire de iHg du spike <sup>201</sup>MeHg et à 6% de la fraction molaire de iHg naturellement présent dans l'échantillon. L'erreur globale associée à la concentration en MeHg est à 60% issue de la fraction molaire de MeHg dans le spike <sup>199</sup>iHg, à 33% de la fraction molaire de MeHg du spike <sup>201</sup>MeHg, à 5% de la fraction molaire de MeHg naturel et à 1% de la quantité de <sup>201</sup>MeHg ajoutée dans l'échantillon, les 1% restants sont répartis entre les 4 paramètres restants. Enfin, l'erreur globale associée au facteur de M est à 100% liée à la fraction molaire de MeHg dans le spike <sup>199</sup>iHg donc à la mesure du rapport  $R_{Hg}^{202/199}$  et pour le facteur D, elle est à 99% liée à la fraction molaire de iHg dans le spike <sup>201</sup>MeHg soit à la mesure du rapport  $R_{Hg}^{202/201}$ .

Des résultats similaires ont été obtenus pour le DOLT-4. D'après le calcul IPD, les fractions molaires de iHg sont directement liées aux rapports isotopiques modifiés  $R_{Hg}^{198/199}$ ,  $R_{Hg}^{199/199}$ , ...,  $R_{Hg}^{202/199}$  et les fractions molaires de MeHg aux rapports isotopiques modifiés  $R_{Hg}^{198/201}$ ,  $R_{Hg}^{199/201}$ ,

...,  $R_{Hg}^{202/201}$ . Ces rapports isotopiques sont quant à eux liés aux quantités de spikes ajoutés dans l'échantillon. Ces observations sont en accord avec des travaux précédemment publiés (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005, Monperrus et al., 2008).

Pour le BCR-464, un autre bilan d'incertitude apparaît comme le montre la figure 35.



**Figure 35** : Représentation graphique de l'étude kragten sur le BCR-464.

Les concentrations en Hg et les taux de transformation ont une incertitude majoritairement imputable à la fraction molaire de iHg provenant du spike <sup>199</sup>iHg. Cette singularité par rapport aux deux autres MRCs trouve probablement son origine dans la grande différence de concentration entre le MeHg et le iHg dans ce MRC.

En conclusion, une corrélation entre les fractions molaires des différentes espèces, les rapports isotopiques modifiés et les quantités de spike ajoutées a été mise en évidence. Cela est en accord avec les observations préliminaires faites par Alasonati et al. (2011) (partenaire du projet ANR IDEA, LNE de Paris) par le biais d'une communication par affiche durant la « Winter conference 2011 » à Saragosse. Sur ce poster, l'IPD est défini sous le modèle 2. Les données brutes utilisées sont issues d'analyses menées sur le DOLT-4 par le laboratoire LCABIE. Alasonati et al. (2011) supposent que les incertitudes sur la quantification des concentrations en Hg et des taux M et D sont liées à l'estimation des fractions molaires et que ce fait semble être prédominant lorsque les spikes sont ajoutés à l'échantillon selon un rapport théorique  $R_m$  égale à 1. En effet, l'estimation des

fractions molaires est moins précise lorsque les concentrations des espèces endogènes et celles des spikes sont trop différentes. Il est d'ailleurs montré que pour diminuer l'incertitude totale (ou erreur globale), il est préférable d'ajouter les spikes à concentrations égales aux concentrations des espèces endogènes, ce qui amène à des rapports isotopiques modifiés de l'ordre de 0,3 et non de 1.

A l'heure actuelle, aucun nouveau résultat n'a permis d'étayer les hypothèses émises. Néanmoins, à la vue de ces résultats et observations préliminaires, il semble préférable d'ajouter les spikes à l'échantillon, en concentrations équivalentes aux concentrations des analytes endogènes afin d'obtenir des rapports isotopiques modifiés de l'ordre de 0,3. Cette découverte ayant été faite rétroactivement par rapport à l'ensemble de ce sujet de thèse, des rapports  $R_m$  théoriques de 1 ont été appliqués dans les travaux de la partie III.

## VII Validation interne de la méthode d'analyse

Suite aux résultats précédents, les conditions optimisées d'extraction et de dérivation semblaient adaptées à la spéciation de l'Hg dans les produits de la pêche et ont pu être utilisées pour la validation de la méthode analytique. Cette validation interne a été menée conformément aux normes NFV 03-110 de 1998 et 2010 (AFNOR, 1998 et 2010) et NF EN 13804 (AFNOR, 2002). Les critères d'évaluation définis concernent les limites de détection et de quantification, la spécificité, la justesse, la fidélité (en terme de répétabilité et de reproductibilité intra-laboratoire), ainsi que l'approche récente du profil d'exactitude. Dans le cas des analyses par dilution isotopique, une calibration interne par ajout de standard Hg enrichis isotopiquement est appliquée. Par conséquent, cette technique ne fait pas intervenir de calibration externe par droite d'étalonnage et donc la linéarité n'est pas évaluée. Pour ces mêmes raisons, la spécificité de la méthode n'a pas été étudiée.

Pour rappel, la validation de la méthode GC-ICP-MS a été faite en utilisant une quantification par D-IDMS après marquage isotopique de l'échantillon avant extraction SLE assistée par *digi*PREP avec du TMAH puis dérivation de l'extrait par le NaBPr4 et agitation par agitateur rotatif pendant 7 min.

### VII.1 Mise en place de la procédure de validation de la méthode

La validation d'une méthode d'analyse est définie comme « *la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies* » (Feinberg, 2009).

### **VII.1.1 Espèces analysées et matériaux utilisés**

La méthode a été validée pour le MeHg et pour le iHg (par le biais d'une appréciation des différents critères de la validation à partir des concentrations en HgT car les MRCs utilisés ne possèdent qu'une valeur indicative de iHg). Les concentrations en HgT ont été calculées en faisant la somme des espèces mercurielles ( $HgT = \sum MeHg + iHg$ ).

Les matériaux de référence certifiés (MRC) utilisés dans cette étude sont le BCR-464, le DOLT-4 et TORT-2. Les échantillons réels utilisés sont issus de l'étude EAT 2 et sont des tissus de thon, saumon, lieu-colin, poisson pané, crevette, moule et huître.

### **VII.1.2 Qualification de l'appareil**

L'ICP-MS n'étant pas exclusivement utilisé pour l'analyse en spéciation du Hg, le couplage GC-ICP-MS est régulièrement découplé puis re-couplé. L'opérationnalité du couplage est donc vérifiée après chaque couplage. Premièrement, le bon fonctionnement de l'ICP-MS seul est vérifié par l'analyse d'un MRC selon la méthode d'analyse accréditée ANSES LSA CIME 08. Après validation de l'ensemble des contrôles qualité internes définis pour cette méthode, les deux appareils sont couplés suivant la notice interne d'utilisation NU-CIME 26. Le bon fonctionnement du couplage est alors vérifié par calibration externe et analyse d'un blanc et d'un MRC, sans utilisation de la ID. Linéarité, répétabilité, justesse et effets de mémoire sont alors évalués. Après validation de ces paramètres, le couplage est jugé opérationnel.

### **VII.1.3 Paramètres de mesure**

Deux prises d'essais par échantillon sont traitées systématiquement et chaque échantillon préparé est analysé en double. La vérification de la concentration et de l'abondance isotopique de chaque spike est effectuée quotidiennement. Le contrôle d'un blanc et d'un MRC est systématiquement introduit dans chaque série d'essai.

## **VII.2 Limites de détection et de quantification**

La limite de détection (LD) est la plus petite concentration d'un analyte pouvant être détectée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. La limite de quantification (LQ) est la plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

Les LD sont calculées conformément à la norme NF EN 13804 (AFNOR, 2002). Les limites de détection et de quantification ont été estimées comme, respectivement, 3 et 6 fois l'écart-type de la moyenne des 16 blancs spikés et exprimées en  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pour une prise d'essai de 5 g. Les différentes dilutions intervenant dans la préparation d'échantillon ne sont pas prises en compte car les spikes ont été ajoutés avant extraction. La LQ pour le MeHg est de  $1,2 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$  et de  $1,4 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$  pour le HgT.

Les LQ de cette étude sont relativement proches de celles rapportées par Tu et al. (2000), Hintelmann et Nguyen (2005) et Poperechna et Heumann (2005) et meilleures que celles obtenues dans les travaux de Yang et al. (2003a), Perna et al. (2005) et Castillo et al. (2010). Quelques études ont toutefois estimé des LD inférieures (Monperrus et al., 2008, Point et al., 2008, Taylor et al., 2008). En général, la grande variabilité entre les LD peut être attribuée à des différences méthodologiques, telles que le nombre de blancs analysés, la période de temps sur laquelle l'étude a été faite (le même jour, à court-terme (conditions de répétabilité) ou à long-terme (conditions de reproductibilité) etc.).

### VII.3 Répétabilité

La répétabilité est définie comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus sur des essais indépendants entre eux, dans des conditions aussi stables que possible, à de courts intervalles de temps, effectués dans un même laboratoire, par un même opérateur utilisant le même équipement et la même méthode, sur un matériau identique. Pour tester la répétabilité de la méthode, il faut analyser plusieurs échantillons au moins en double. Les résultats obtenus permettent de définir le coefficient de variation de répétabilité moyen ( $CV_r$ ). La vérification de la stabilité de la répétabilité s'effectue au moyen du test de Cochran (AFNOR, 1998). Dans cette étude, les coefficients de répétabilité ont été évalués selon les critères définis ci-dessus, en analysant deux MRCs (le DOLT-4 et le TORT-2) 10 fois et en double sur 1 journée et en analysant 10 produits de la pêche différents et en double sur 2 jours, tel que :

$$CV_r = 100 \times \sqrt{\frac{S_r^2}{X_f}} \quad (8)$$

avec  $X_f$  : moyenne des valeurs observées, et  $s_r^2$  : variance de répétabilité

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 18.

**Tableau 18** : Evaluation de la répétabilité et test de Cochran

Matrices			MeHg	HgT
DOLT-4	Répétabilité	<b>CV<sub>r</sub> (%)</b>	<b>2,2</b>	<b>2,4</b>
	Test de Cochran	Max (s) ou log max (s) <sup>2</sup>	0,3282	0,5009
		Valeur critique	0,7180	0,7180
TORT-2	Répétabilité	<b>CV<sub>r</sub> (%)</b>	<b>2,6</b>	<b>3,8</b>
	Test de Cochran	Max (s) ou log max (s) <sup>2</sup>	0,3852	0,6474
		Valeur critique	0,7180	0,7180
Echantillons réels	Répétabilité	<b>CV<sub>r</sub> (%)</b>	<b>2,4</b>	<b>2,2</b>
	Test de Cochran	Max (s) ou log max (s) <sup>2</sup>	0,1482	0,6581
		Valeur critique	0,7180	0,7180

Les CV<sub>r</sub> estimés sont compris entre 2,2 et 2,6% pour le MeHg et entre 2,2 et 3,8% pour le HgT. Le test de Cochran montre que les variances pour l'ensemble des matrices étudiées sont homogènes avec max (s)<sup>2</sup> ou log max (s)<sup>2</sup> inférieurs à la valeur critique. La répétabilité des mesures est donc considérée comme acceptable pour le MeHg et le iHg.

#### VII.4 Fidélité intermédiaire de reproductibilité

La reproductibilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus sur des essais indépendants entre eux pour une même méthode d'analyse, dans des conditions fortement variables (contrairement à la répétabilité) à des jours différents, dans différents laboratoires, par différents opérateurs utilisant un équipement différent (AFNOR, 1998). La répétabilité et la reproductibilité sont donc deux critères extrêmes, le premier mesurant la variabilité minimale des résultats et le second, la maximale. Le calcul de reproductibilité est identique à celui de la répétabilité, mais la moyenne est calculée sur un plus grand nombre d'essais répartis sur un intervalle de temps plus grand.

Dans cette étude, tous les tests ont été réalisés au laboratoire par la même personne et sur un même appareil. La reproductibilité n'a donc pas pu être établie selon l'ensemble des exigences définis ci-dessus ; on parle dans ce cas de reproductibilité interne. La reproductibilité interne a été évaluée sur 3 MRCs (DOLT-4, TORT-2, BCR-464) analysés 10 fois en double et sur une période de 7 mois. Les résultats sont présentés dans le tableau 19.

**Tableau 19** : Evaluation de la reproductibilité interne

Matrices			MeHg	HgT
DOLT-4	Ecart-type de reproductibilité Reproductibilité	$s_R$	0,037	0,071
		$CV_R(\%)$	<b>2,9</b>	<b>2,8</b>
TORT-2	Ecart-type de reproductibilité Reproductibilité	$s_R$	0,005	0,017
		$CV_R(\%)$	<b>2,8</b>	<b>5,3</b>
BCR-464	Ecart-type de reproductibilité Reproductibilité	$s_R$	0,098	0,099
		$CV_R(\%)$	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>

Les  $CV_R$  estimés sont compris entre 1,7 et 2,9% pour le MeHg et entre 1,7 et 5,3% pour le HgT. Les  $CV_R$  du DOLT-4 et du TORT-2 sont bien supérieurs ou égales aux  $CV_R$  présentés dans le tableau 18. La reproductibilité des mesures est donc considérée comme acceptable pour le MeHg et le iHg.

Le  $CV_R$  moyen calculé à partir des  $CV_R$  estimés ci-dessus (soit 3%) va être utilisé à la fois pour estimer les intervalles de confiance pour l'évaluation des contrôles qualité interne (CQI) et pour le calcul des incertitudes autour d'un résultat. Pour les incertitudes élargies, le calcul se fera selon la formule 9 suivante :

$$Incertainces = \frac{(k \times X_f \times CV_R)}{(100 \times \sqrt{n})} \quad (9)$$

Par exemple, pour un  $CV_R$  de 3% et pour une probabilité  $p = 0,95$  ( $k = 2$ ), l'incertitude sera de 6 % autour du résultat affiché pour une mesure ( $n = 1$ ) et de 4% si les mesures sont faites en double ( $n = 2$ ).

Pour les intervalles de confiance (IC), le calcul se fera selon la formule 10 suivante :

$$IC = M \pm \left( k \times \frac{CV_R \times M}{100 \times \sqrt{n}} \right) \quad (10)$$

avec IC : intervalle de confiance, M : moyenne ou valeur de référence de la teneur en élément, k : facteur d'élargissement choisi égal à 3 pour un niveau de confiance de 99 %,  $CV_R$  : coefficient de variation de reproductibilité intra-laboratoire de la méthode, n : nombre de répétitions de l'analyse du matériau de référence.

## VII.5 Justesse

La justesse correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée (AFNOR, 1998). Les critères de justesse ont été établis à l'aide de matériaux de référence certifiés (MRC) dont l'utilisation est décrite dans la norme FD V 03-115 (AFNOR, 1996).

Les tests de justesse ont donc été établis en réalisant 5 essais différents de plusieurs MRC. L'objectif est de s'assurer que les teneurs mesurées par GC-ICP-MS ne sont pas significativement différentes des valeurs définies dans le MRC. Les résultats sont présentés dans le tableau 20.

**Tableau 20** : Evaluation de la justesse pour le MeHg et HgT

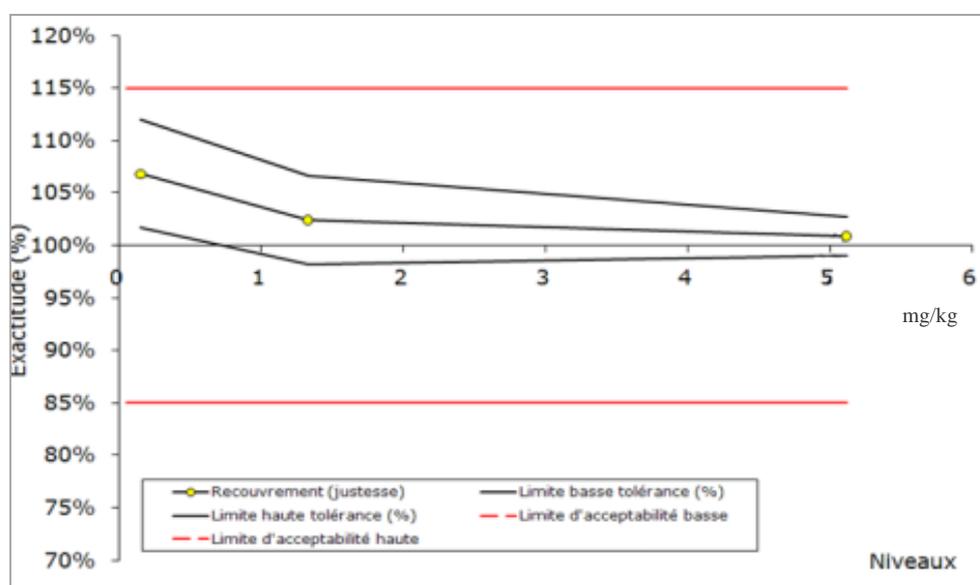
MRC		MeHg	Moy	sd	CV (%)	IC	
DOLT-4	MeHg	valeur obtenue	<b>1,35</b>	0,01	<b>0,9</b>		
		valeur de référence	1,33	0,04	3,0	1,21	1,45
		comparaison plan D	1,33	0,04	2,9	1,22	1,44
	HgT	valeur obtenue	<b>2,58</b>	0,07	<b>2,5</b>		
		valeur de référence	2,58	0,07	2,8	2,36	2,8
		comparaison plan D	2,58	0,07	2,8	2,36	2,8
TORT-2	MeHg	valeur obtenue	<b>0,156</b>	0,003	<b>2,0</b>		
		valeur de référence	0,152	0,004	2,9	0,139	0,165
		comparaison plan D	0,152	0,005	2,8	0,137	0,167
	HgT	valeur obtenue	<b>0,293</b>	0,017	<b>5,2</b>		
		valeur de référence	0,270	0,020	7,4	0,210	0,330
		comparaison plan D	0,270	0,017	5,3	0,222	0,318

Que ce soit pour le MeHg ou pour HgT, les moyennes obtenues sont comprises dans les intervalles de confiance (IC) calculés avec le  $CV_R$  de la méthode (intervalle de la ligne comparaison plan D) autour de la valeur de référence pour les deux MRCs. Ces valeurs sont également incluses dans les intervalles de confiance des 2 MRCs qui sont équivalents aux nôtres. Enfin, les coefficients de variation obtenus sont inférieurs à ceux spécifiés dans la reproductibilité de la méthode. Selon la norme V03-110, la justesse des mesures est donc considérée comme acceptable pour le MeHg, le iHg et par conséquent pour le HgT (AFNOR, 1998).

## VII.6 Profil d'exactitude

Une nouvelle stratégie de validation de méthode décrite dans la nouvelle norme NF V03-110 permet d'évaluer son profil d'exactitude (AFNOR, 2010). L'exactitude est la somme de la justesse (biais en statistique) et de la fidélité (erreur systématique). Le profil d'exactitude utilise les critères de performances qui découlent de ces deux paramètres pour définir l'erreur totale de la méthode analytique. Ainsi s'ajoute à l'intervalle défini par les critères de performances, un intervalle d'acceptation en adéquation avec l'objectif de la méthode. Le profil d'exactitude permet de définir les critères de performances de la méthode à différents niveaux de concentrations.

Lors de cette étude, 3 MRCs (TORT-2, DOLT-4 et BCR-464) ont été analysés 6 fois en double, et sur une période de 3 mois. Les profils d'exactitude pour le MeHg et le HgT sont présentés dans l'article II et reportés en figures 36 et 37. Les limites d'acceptabilité de la méthode ont été fixées à 15% pour l'ensemble des espèces mercurielles avec une probabilité fixée à 95%.



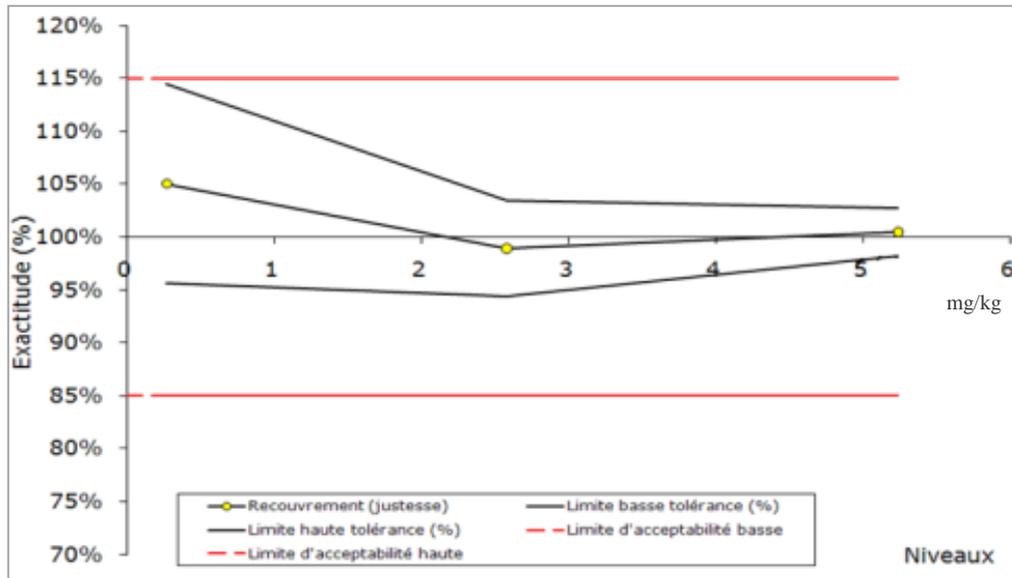
**Figure 36** : Profil d'exactitude du MeHg

Pour le MeHg, les limites de tolérance à 95% sont comprises entre les limites d'acceptabilité dans un domaine de validité qui s'étend approximativement de 0,15 mg kg<sup>-1</sup> à 5,12 mg kg<sup>-1</sup>. La méthode est donc considérée validée dans ce domaine.

Par ailleurs, la fidélité varie en fonction de la concentration puisque son coefficient de variation passe de 0,8% (pour la concentration la plus forte) à 1,85% (pour la concentration la plus faible). La justesse est également dépendante de la concentration car le biais de justesse varie de 0,9% à 6,8%, le biais le plus élevé étant obtenu pour la plus faible concentration de MeHg. Ces observations soulignent l'intérêt de procéder aux calculs niveau par niveau. Néanmoins, comme le

montre le profil d'exactitude, ces deux constatations n'ont pas d'influence importante sur la validité de la méthode car les limites de tolérance restent comprises dans les limites d'acceptabilité.

Les  $CV_r$  et  $CV_R$  moyens obtenus par cette nouvelle approche sont estimés respectivement de 1,3% et de 1,5% pour le MeHg.



**Figure 37** : profil d'exactitude du HgT

Concernant HgT, les limites de tolérance à 95% sont comprises entre les limites d'acceptabilité dans un domaine de validité qui s'étend approximativement de  $0,27 \text{ mg kg}^{-1}$  à  $5,24 \text{ mg kg}^{-1}$ . La méthode est donc validée dans ce domaine.

La fidélité varie en fonction de la concentration de 0,9% (pour la concentration la plus forte) à 3,5% (pour la concentration la plus faible). Par ailleurs, le biais de justesse varie de manière acceptable en fonction de la concentration de 0,5% pour la concentration la plus forte à 5% pour la plus faible.

Les  $CV_r$  et  $CV_R$  moyens obtenus par cette nouvelle approche sont estimés respectivement de 1,7% et de 2,2% pour le MeHg.

## VII.7 Conclusion sur la validation de méthode

Le tableau 21 récapitule l'ensemble des paramètres de validation réalisés à partir des deux normes NF V03-110.

**Tableau 21** : Bilan de la validation de méthode

		MeHg	HgT
LOQ	( $\mu\text{g Hg kg}^{-1}$ )	1,2	1,4
Répétabilité (NFV 03-110 : 1998)	$\text{CV}_r$ (%) ( $n \geq 10$ )	2,4	2,8
Reproductibilité (NFV 03-110: 1998)	$\text{CV}_R$ (%) ( $n \geq 10$ )	2,5	3,3
Profil d'exactitude (NFV 03-110: 2009)	$\text{CV}_r$ (%) ( $n \geq 5$ )	1,3	1,7
	$\text{CV}_R$ (%) ( $n \geq 5$ )	1,5	2,2
	U (%) ( $k = 2$ )	1,6	2,3

Les  $\text{CV}_R$  moyens calculés selon l'ancienne norme NF V03-110 (AFNOR, 1998) sont plus élevés que ceux calculés à partir de la nouvelle norme. Ces écarts étaient attendus et s'expliquent probablement par les différences des durées d'évaluation. En effet, pour l'ancienne norme, les analyses ont été menées sur une période de 7 mois alors que pour la nouvelle, les analyses ont été étalées sur une durée de 3 mois seulement.

Des  $\text{CV}_r$  moyens plus grands sont également obtenus selon l'ancienne norme NF V03-110. Cette différence, moins marquée, est probablement imputable au nombre d'analyses menées pour l'évaluation de ce critère (10 analyses pour l'ancienne norme contre 6 pour la nouvelle).

La méthode d'analyse en spéciation du mercure par ID et GC-ICP-MS présentée est validée en termes de fidélité intermédiaire et de justesse pour le MeHg, le iHg et le HgT. On peut donc conclure à la capacité de la méthode à quantifier exactement ces espèces dans les produits de la pêche sur le domaine de validité allant de 0,152 à 5,12  $\text{mg kg}^{-1}$  pour le MeHg et de 0,270 à 5,24  $\text{mg kg}^{-1}$  pour le HgT. La comparaison des 2 normes NF V03-110 nous a permis de constater qu'elles indiquent des conclusions similaires, malgré des approches très différentes.

## VIII. Conclusions et perspectives

Les espèces Hg peuvent être modifiées lors des différentes étapes constituant la préparation d'échantillon. Notre choix s'est donc porté sur une analyse par dilution isotopique. L'influence de ce marquage isotopique sur la procédure analytique a donc été étudiée dans un premier temps en ajoutant les spikes à des moments différents de la préparation d'échantillon. Ces travaux ont montré que des modifications de la distribution naturelle de l'échantillon pouvaient survenir dès l'étape d'extraction. Les spikes ont donc été par la suite ajoutés avant celle-ci.

La mise en solution des espèces Hg dans les matrices biologiques a ensuite été étudiée. Après étude bibliographique, le choix tendait à porter sur une méthode d'extraction assistée par micro-ondes (MAE) car elle offre une extraction satisfaisante des espèces Hg avec peu de modification des composés initialement présents dans les matrices. Néanmoins, des limitations liées à l'ancienneté de l'appareil micro-ondes disponible au sein du laboratoire CIME mena à une étude de comparaison entre trois techniques d'extraction que sont la MAE, l'extraction solide-liquide à température ambiante (ERT) et l'extraction solide-liquide assistée par un *digi*PREP (SLE). Cette dernière approche est apparue comme simple, robuste et relativement rapide car elle permet l'extraction simultanée de 46 échantillons. La SLE par *digi*PREP avec du TMAH a donc été choisie comme technique d'extraction.

Suivie une étude de la dérivation des espèces Hg. Après étude bibliographique, le choix porta sur une dérivation par alkylation, technique définie comme permettant d'obtenir des composés possédant une excellente stabilité thermique et ce avec des transferts des espèces Hg de la phase aqueuse vers la phase organique satisfaisants, sans modification des composés initialement présents dans les matrices. Dans un premier temps, le tétrapropylborate de sodium ( $\text{NaBPr}_4$ ) a été comparé au tétraéthylborate de sodium ( $\text{NaBEt}_4$ ). Les deux réactifs se sont avérés d'une efficacité similaire mais le  $\text{NaBPr}_4$  a été conservé plutôt que le  $\text{NaBEt}_4$  car il est moins limitant. L'étape d'agitation des échantillons a également été optimisée en testant 3 techniques différentes (agitation manuelle rigoureuse, agitation à l'aide d'un vortex, agitation à l'aide d'un plateau rotatif). Une agitation mécanique rotative a été sélectionnée car c'est la méthode qui s'est avérée la plus juste et reproductible et qu'elle peut s'appliquer en routine, contrairement à l'agitation manuelle.

Enfin, les différentes techniques de traitement des données par ID ont été appliquées à un ensemble de données provenant de l'analyse de MRCs. Une quantification juste des concentrations

par la D-IDMS est systématique, pour les trois matrices étudiées. Des problèmes de répétabilité de mesure et parfois de cohérence des résultats ont été soulevés avec les deux autres techniques (D-SS-IDMS et IPD). Une étude statistique selon Kragten a permis de déterminer que l'origine de ces difficultés réside dans la mesure des fractions molaires. Une seconde étude statistique, récemment menée par le LNE et encore à l'état d'ébauche, laisse supposer que les difficultés rencontrées peuvent être diminuées en modifiant la technique de marquage des échantillons par les spikes. En effet, il semblerait plus probant d'ajouter les espèces enrichies en un isotope en concentrations égales aux espèces naturelles, ce qui amènerait à des rapports isotopiques altérés de l'ordre de 0,3 plutôt que de 1. Il serait intéressant, par la suite, de pousser plus en avant cette hypothèse afin de déterminer si la modification de ces rapports isotopiques permettra de résoudre les difficultés de quantification des taux de méthylation et de déméthylation rencontrées notamment dans le cas d'échantillons où les 2 espèces sont en proportions très différentes.

La méthode d'analyse par GC-ICP-MS optimisée (marquage isotopique avant extraction, extraction solide-liquide par *digiPREP* avec du TMAH, propylation avec agitation rotative, quantification par dilution isotopique double) a été validée dans les produits de la pêche selon les normes françaises NF V03-110 de 1998 et de 2010 (AFNOR, 1998 et 2010), dans un domaine de concentrations allant de 0,152 à 5,12 mg kg<sup>-1</sup> de MeHg et de 0,118 à 1,25 mg kg<sup>-1</sup> de iHg, soit un domaine en HgT allant de 0,270 à 5,24 mg kg<sup>-1</sup>. L'évaluation des performances analytiques de la méthode a permis de démontrer que les conditions de préparation d'échantillons optimales déterminées étaient satisfaisantes. Cette évaluation confirme également qu'une quantification par D-IDMS est parfaitement capable de fournir une quantification juste et fidèle des teneurs en Hg dans les produits de la pêche.

A ce jour, la quantification par IDMS utilisant l'IPD n'a toutefois pas permis l'évaluation précise des taux de transformation des essais menés au sein du laboratoire CIME. Néanmoins, cette étude a permis d'entrevoir deux axes d'amélioration qui seront à étudier à l'avenir pour tenter d'améliorer la quantification par IDMS utilisant l'IPD : la première serait d'utiliser des rapports isotopiques théoriques de 0,3 plutôt que de 1 et la deuxième serait d'acheter un nouveau chromatographe gazeux afin d'évaluer la part d'erreur apportée par la vétusté du port d'injection sur les taux de transformation mesurés.