

# Détermination du méthyle mercure dans le poisson de mer par chromatographie en phase gazeuse = Quantification of methyl mercury in fish using gas chromatography

Autor(en): **Dafflon, O. / Gobet, H. / Koch, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **84 (1993)**

Heft 5

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982148>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Détermination du méthyle mercure dans le poisson de mer par chromatographie en phase gazeuse

Quantification of Methyl Mercury in Fish Using Gas Chromatography

O. Dafflon, H. Gobet et H. Koch  
Office vétérinaire fédéral, Liebefeld-Berne

### Introduction

La toxicité du mercure dépend de sa structure chimique. Les composés organo-mercuriels sont hautement toxiques. Le législateur se propose de maintenir à un niveau aussi bas que possible la charge de la population en substances potentiellement dangereuses pour la santé. Au cours des dernières années, divers Etats ont réglementé les teneurs en métaux lourds des denrées alimentaires. Afin d'éviter que ne soient importées en Suisse des denrées alimentaires refusées par d'autres pays étant donné leurs teneurs trop élevées en métaux lourds, l'Office fédéral de la santé publique a fixé, en tant qu'instructions provisoires, les concentrations maximales de mercure à 0,5 et 1,0 mg/kg (1) suivant la sorte de poisson.

Dans le poisson, le mercure est métabolisé en grande partie sous forme de méthyle mercure (-HgMe) (2), lequel est lié préférentiellement aux fonctions thiol (-SH) des chaînes latérales des peptides ou aux ponts disulfure (-S-S-) des chaînes polypeptidiques.

La détermination du -HgMe dans les matrices biologiques a été décrite par de nombreux auteurs. Les techniques les plus récentes citées dans la littérature sont la chromatographie en phase gazeuse (GC) avec colonnes à remplissage et détecteurs, à capture d'électrons (ECD) (3-4), à plasma induit par micro-ondes (MIP) (5) ou par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) (6). Les méthodes GC-ECD et GC-AAS ont été testées. La méthode par GC-AAS n'a pas donné satisfaction. En effet, avec un GC équipé d'une colonne capillaire OV-17, d'un détecteur AAS à flamme et d'une cuvette à quartz, la limite de détection d'une solution standard de chlorure de méthyle mercure (ClHgMe) était de 200 ng Hg/ml ou 1 ng Hg en quantité absolue (volume injectée: 5,0 µl de ClHgMe). La limite de détection par rapport à la matrice se situait à 0,5 mg/kg. Cette limite ne nous permettait pas de doser le Hg de façon sûre dans le domaine de la valeur limite (0,5 et 1,0 mg/kg). La méthode par GC-ECD a été retenue et modifiée pour le dosage de routine.

## Partie expérimentale

### Réactifs

Acide chlorhydrique fumant, 37% p.a. (Merck 317). A diluer avec H<sub>2</sub>O à une concentration finale de 1:1 (v/v).

Toluène p.a. (Merck 8325).

Carbonate de sodium p.a. (Merck 6392).

Chlorure de méthyle mercure (ClHgMe) à 1000 mg/l Hg (Alfa Products 88036).

Hexachlorobenzène (HCB) à 1000 mg/l (Dr. Ehrenstorfer E141600, Augsburg/Allemagne).

Solution standard de ClHgMe à 10 mg/l Hg. Diluer 1,0 ml de ClHgMe à 1000 mg/l Hg, dans 100 ml de toluène.

Solution standard interne à 10 mg/l HCB. Diluer 1,0 ml d'HCB à 1000 ml, dans 100 ml de toluène.

Solutions de calibration à 100 µg/l Hg et 100 mg/l HCB.

Mélanger 1,0 ml de solution standard (10 mg/l Hg) avec 1,0 ml de solution standard interne (10 mg/l HCB). Diluer à 100 ml avec du toluène.

### Appareillage

Gaz chromatographe, HRGC 5160, Carlo-Erba

Détecteur à capture d'électrons (ECD), source radioactive au Ni<sup>63</sup>, Carlo-Erba  
Intégrateur, Chromatocorder «SIC», System Instruments Co. Ltd.

Centrifuge, Heraeus, type Zeta 17, tête de centrifuge diam. 12 cm. Mixeur, Polytron, Kinematica

Mélangeur mécanique Heidolph, Promax 2020.

### Mode opératoire

#### Traitement de l'échantillon

Dans un verre à centrifuger de 100 ml, peser 5,0 g de matrice homogénéisée, 20 g d'acide chlorhydrique 1:1. Mixer pendant 3 min avec polytron, jusqu'à l'obtention d'une fine suspension. Peser immédiatement dans un tube à centrifuger en teflon 5,0 g de suspension. Centrifuger à 12000 tours/min pendant 10 min à 5 °C. Décanter la phase surnageante dans un verre à centrifuger de 100 ml avec rodage. Ajouter 20 ml de toluène et 200 µl de standard interne (10 mg/l HCB). Agiter vigoureusement avec le mélangeur mécanique à l'abri de la lumière pendant 15 min. Centrifuger pendant 3 min à 4000 tours/min. Pipeter 1,0 ml d'extrait dans un flacon d'injection «Vial». Ajouter une pointe de spatule de carbonate de sodium et injecter immédiatement.

### *Conditions chromatographiques*

Température de l'injecteur:	260 °C
Température du détecteur:	315 °C
Programme de température:	100 °C (7 min) – 290 °C (49,9 °C/min)
Gaz porteur:	H <sub>2</sub> , 2,0 ml/min
Bottom-Split-flow:	30,0 ml/min
Septum-purge:	8,0 ml/min
Make up:	N <sub>2</sub> , 150 KPa
Technique d'injection:	Splitless (10 s)
Colonne de séparation:	Silice fondue, colonne capillaire DB-5 60 m · 0,25 mm, épaisseur du film 25 µm, J & W
Volume injecté:	1,0 µl

## Résultats et discussion

### *Dosage du mercure organique*

La méthode proposée a nécessité la modification de 2 facteurs essentiels par rapport à ceux citée dans la littérature: le «Clean-up» et la colonne capillaire.

#### *Clean-up*

Le méthyle mercure (-HgMe) lié à la matrice est hydrolysé en milieu chlorhydrique et libéré avec formation de chlorure de méthyle mercure. Ce sel soluble en milieu aqueux est séparé de la matrice par centrifugation à froid. La phase aqueuse est ensuite extraite avec du toluène. L'extrait ainsi obtenu ne nécessite pas de nettoyage supplémentaire et peut être directement injecté. Cette technique de «Clean-up» très simple permet d'éliminer la plupart des protéines et des graisses. Après plus d'une centaine d'injections d'extraits, cette technique de «Clean-up» n'a pas occasionné de perte de sensibilité du détecteur.

#### *Choix de la colonne*

Contrairement à la colonne remplie, la colonne capillaire (DB-5) facilite la mise en oeuvre de la méthode de dosage, car elle ne nécessite pas une activation de la colonne par le chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>). Elle permet aussi une bonne résolution du pic de ce composé et une bonne séparation de celui du solvant.

La figure 1 présente le chromatogramme d'un échantillon positif. Dans les conditions chromatographiques utilisées, on identifie:

- le chlorure de méthyle mercure (pic no 1): temps de rétention ( $t_R$ ) = 6,1 min
- le standard interne (HCB) (pic no 2): ( $t_R$ ) = 14,4 min.

## Calibrage

La calibration de l'intégrateur s'effectue au moyen d'une solution de calibration contenant 100 µg/l de chlorure de méthyle mercure et 100 µg/l d'une solution standard interne de HCB (fig. 2).

Le contrôle de la linéarité de la réponse du détecteur a été effectué pour des concentrations usuelles de travail de 10 à 100 µg/l.

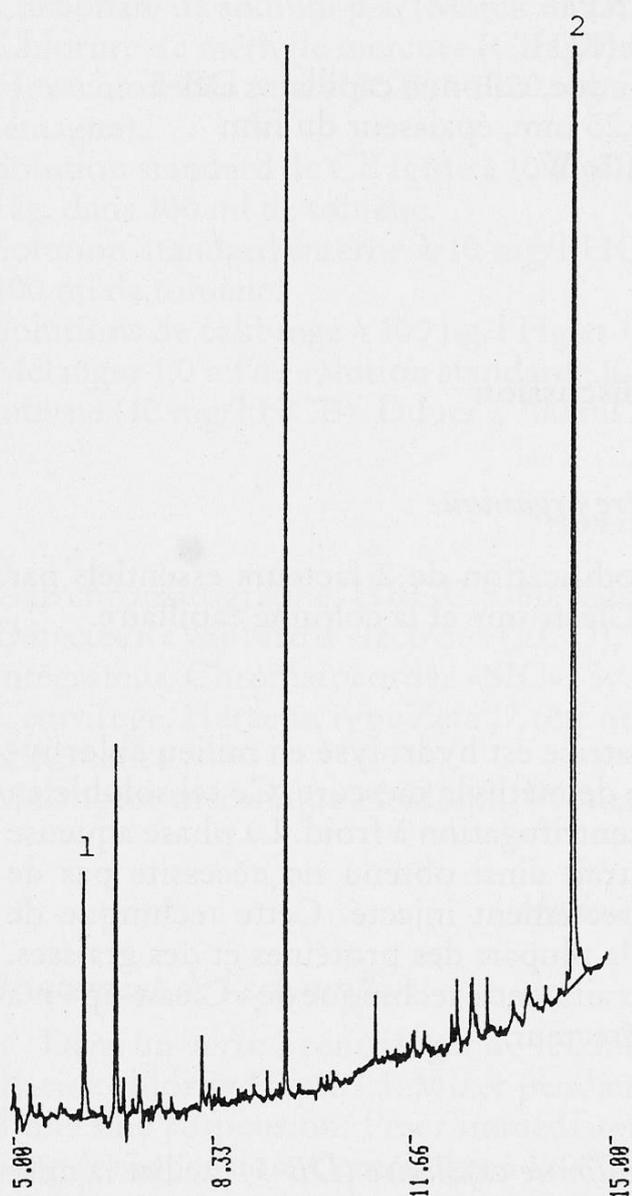


Fig. 1. Chromatogramme d'un échantillon positif (0,35 µg/kg).  
(Conditions chromatographiques voir partie expérimentale)  
Pic 1 = chlorure de méthyle mercure  
Pic 2 = hexachlorobenzène (standard interne)

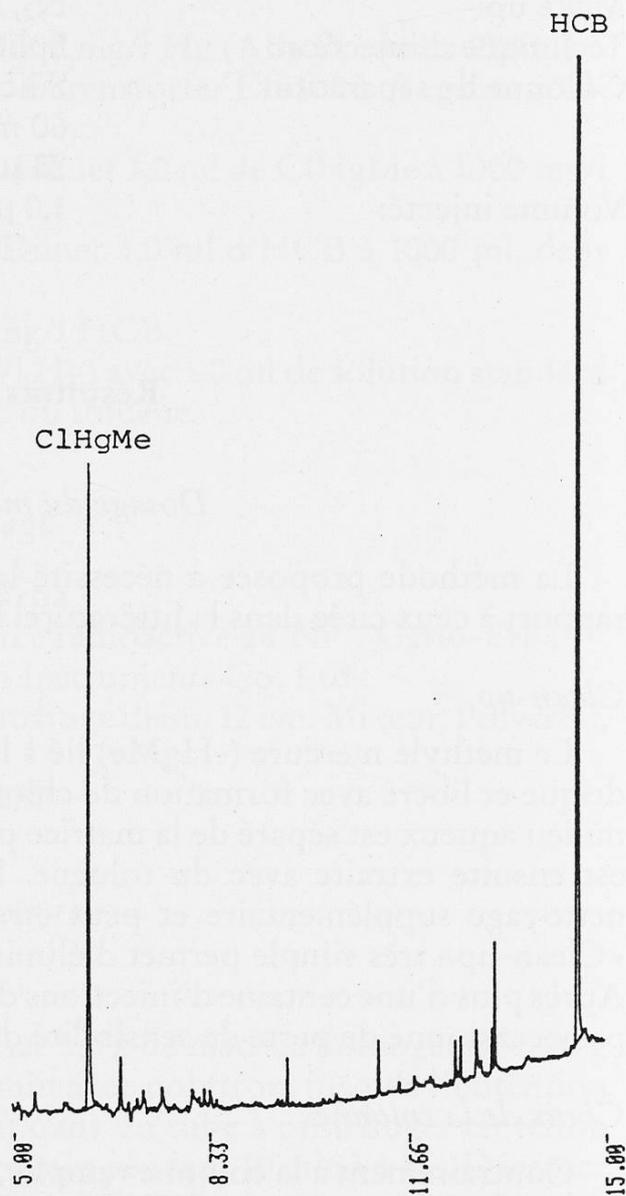


Fig. 2. Chromatogramme d'une solution de calibration de chlorure de méthyle mercure contenant: 100 µg/l Hg et 100 µg/l HCB (standard interne).  
(Conditions chromatographiques voir partie expérimentale)

### Limite de détection

La limite de détection de la méthode GC-ECD est de 2,0 pg Hg en quantité absolue et de 0,040 mg/kg par rapport à la matrice. La limite de détection a été calculée à l'aide de l'équation suivante:

$$\frac{3 \cdot \text{hauteur du bruit de fonds}}{\text{hauteur de la quantité [X] injectée}} \cdot \text{quantité [X] injectée}$$

Equation 1. Calcul de la limite de détection de la méthode.

*Le rendement de l'extraction* du chlorure de méthyle mercure avec le toluène dépend du rapport volumique acide chlorhydrique/toluène (fig. 3). Dans les conditions expérimentales utilisées (voir mode opératoire) et un coefficient de 0,25 (rapport acide chlorhydrique/toluène), le rendement de l'extraction est  $\geq 95\%$ .

### Taux de récupération

Le taux de récupération a été contrôlé par addition directe de 100  $\mu\text{g/kg}$  de chlorure de méthyle mercure dans un échantillon exempt de ce composé. Les résultats sont résumés dans le tableau 1.

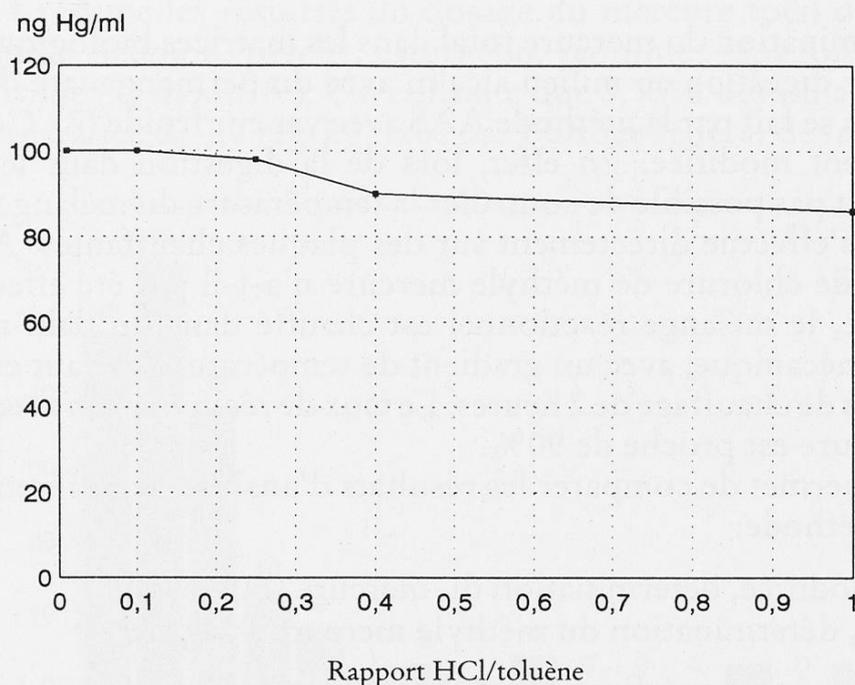


Fig. 3. Effet du rapport de volume acide chlorhydrique/toluène à partir d'une solution standard de chlorure de méthyle mercure (100 ng/ml de Hg) dans acide chlorhydrique fumant/eau 1:1.  
(Conditions chromatographiques voir partie expérimentale)

*Tableau 1.* Taux de récupération du chlorure de méthyle mercure dans le poisson par GC-ECD  
(Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

Chlorure de méthyle mercure ajouté (µg/kg)	Retrouvé $\bar{x}$ (moyenne) ( $n = 5$ ) (µg/kg)	$S_r$ écart type (µg/kg)	$CV_r$ écart type relatif <sup>1</sup>	Taux de récupération en % de l'ajout
100	85,66	5,13	5,98	85,7

<sup>1</sup>  $CV_r$  écart type relatif en pourcent de la moyenne.

### *Stabilité des solutions de chlorure de méthyle mercure*

Les solutions mères et les solutions de calibrage doivent être protégées de la lumière, afin d'éviter la décomposition du chlorure de méthyle mercure par les rayons UV. Ces solutions sont renouvelées tous les 2 jours.

### *Effet de mémoire*

On n'a pas observé d'effet de mémoire avec les conditions chromatographiques présentées dans la partie expérimentale.

### *Dosage du mercure total*

Pour la détermination du mercure total dans les matrices biologiques, on utilise une méthode par digestion en milieu alcalin avec du permanganate de potassium. La quantification se fait par la méthode AAS avec vapeur froide (7). Cette méthode a été partiellement modifiée. En effet, lors de la digestion dans les conditions proposées, il n'est pas possible de contrôler la température du mélange réactionnel, car le chauffage s'effectue directement sur des plaques chauffantes. Aussi, le taux de récupération de chlorure de méthyle mercure n'a-t-il pas été effectué. Avec la méthode actuelle, le mélange réactionnel est chauffé dans un bain-marie équipé d'une agitation mécanique, avec un gradient de température variant entre 20 °C et 95 °C et un temps de chauffage de 2 heures. Le taux de récupération avec du chlorure de méthyle mercure est proche de 90%.

Le tableau 2 permet de comparer les résultats d'analyse de différentes sortes de poisson par la méthode:

- AAS (7) modifiée, détermination du mercure (Hg) total;
- GC-ECD, détermination du méthyle mercure (-HgMe).

Il permet également de confirmer l'existence du méthyle mercure dans le poisson et de quantifier dans quelles proportions ce dernier est présent. On constate que la majeure partie du mercure présent dans ces différentes matrices est métabolisé sous forme de méthyle mercure.

Tableau 2. Comparaisons des résultats d'analyse de différentes sortes de poisson par la méthode:

AAS (7) modifiée, détermination du mercure total (Hg);

GC-ECD, détermination du méthyle mercure (-HgMe)

(Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

Désignation	Hg ( $\mu\text{g/g}$ )	
	Méthyle mercure GC-ECD <sup>a</sup>	Mercure total AAS <sup>b</sup>
Veau de mer	0,66	0,68
	0,54	0,58
Thon	0,40	0,43
Thon rouge	0,50	0,65
	0,09	0,10
Requin	0,43	0,42
	0,35	0,40
	0,49	0,48

<sup>a</sup> Moyenne de 3-5 déterminations.

<sup>b</sup> Moyenne de 2 déterminations.

### Rapport d'examen 1992

La figure 4 résume les résultats du dosage du mercure total dans les poissons suivants: anguille, saumon, perche, esturgeon, requin et espadon (Méthode AAS avec vapeur froide (7) modifiée). On constate que 8,33% des échantillons analysés dépassent la tolérance de 1,0 mg/kg fixée par l'Office fédéral de la santé publique.

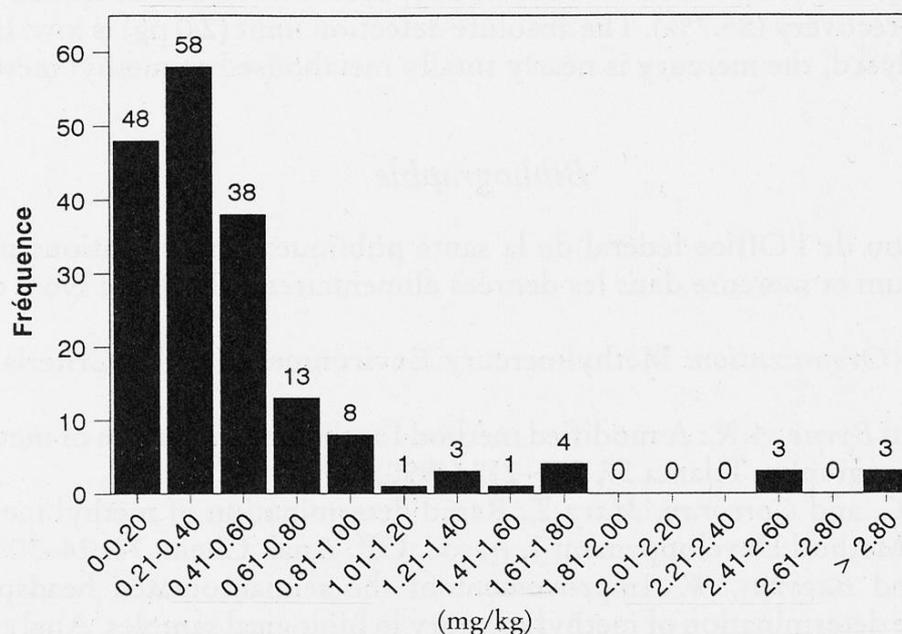


Fig. 4. Rapport d'examen 1992 du Hg total dans 180 échantillons de chair de poisson importé

## Remerciements

Les auteurs remercient Monsieur *U. Weber* pour les calculs de statistiques et les graphes qu'il a effectués.

## Résumé

Une méthode par GC avec détecteur à capture d'électrons et séparation sur colonne capillaire est décrite pour le dosage du méthyle mercure (-HgMe) dans le poisson. Le mode opératoire proposé, simple et rapide, peut être utilisé en analyse de routine. Les ajouts de chlorure de méthyle mercure donne un taux de récupération relativement élevé (85,7%). La limite de détection (2,0 pg) en quantité absolue est bonne. Dans les différentes sortes de poissons analysés, la plupart de mercure est métabolisé sous forme de méthyle mercure.

## Zusammenfassung

Diese Methode beschreibt ein gaschromatographisches Verfahren (ECD, Kapillarsäule) zur quantitativen Bestimmung von Methylquecksilber (-HgMe) in Fisch. Es handelt sich um ein unkompliziertes schnelles Verfahren, welches in der Routineanalytik angewendet werden kann. Die Resultate mit gespikten Proben ergeben eine recht gute Wiederauffindung (85,7%) und eine tiefe analytische Nachweisgrenze (2,0 pg). In den analysierten verschiedenen Fischproben liegt der grösste Teil des Quecksilbers als Methylquecksilber vor.

## Summary

A GC-method with an electron capture detector and separation on capillary column is described for the analysis of methyl mercury (-HgMe) in fish. The proposed procedure is very simple, rapid and can be used for routine purposes. The results of spiked samples give a relatively good recovery (85.7%). The absolute detection limit (2.0 pg) is low. In the various types of fish analysed, the mercury is nearly totally metabolised to methyl mercury.

## Bibliographie

1. Communication de l'Office fédéral de la santé publique: Concentrations maximales de plomb, cadmium et mercure dans les denrées alimentaires. Circulaire No 2 du 20 février 1992.
2. *World Health Organization: Methylmercury Environment Health Criteria 101.* WHO, Geneva 1990.
3. *Horvat, M. and Byrne, A.R.:* A modified method for the determination of methyl mercury by gas chromatography. *Talanta* **37**, 207–212 (1990).
4. *Hight, Susan C. and Corcoran, Mary T.:* Rapid determination of methyl mercury in fish and shellfish: Method Development *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 24–30 (1987).
5. *Lansens, P. and Baeyens, W.:* Improvement of the semiautomated headspace analysis method for the determination of methyl mercury in biological samples. *Analytica Chimica Acta* **228**, 93–99 (1990).

6. *Jiang Gui-bin, Ni Zhe-ming, Wang Shun-rong and Han Heng-bin*: Organic mercury speciation in fish by capillary gaschromatography interfaced with atomic absorption spectrometry. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **334**, 27–30 (1989).
7. *Hauser, E., Holenstein, P. und Nussbaumer, M.*: Ein schnelles Aufschlussverfahren von ölhaltigem Dosenfisch zur Bestimmung von Quecksilberrückständen. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **62**, 415–416 (1971).

O. Dafflon  
Section chimie  
Office vétérinaire fédéral  
CH-3097 Liebefeld-Bern