Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE,
DE L'ALIMENTATION, DE LA PECHE ET DES AFFAIRES RURALES

Direction générale de l'alimentation **Sous-direction de la réglementation, de la recherche et de la coordination des contrôles** **Bureau de la recherche et des laboratoires d'analyse** **Adresse :** 251, rue de Vaugirard 75 732 Paris Cedex 15 **Suivi par :** Alexandre BLANC-GONNET **Tél :** 01 49 55 81 49 **Fax :** 01 49 55 49 61 **Réf. Interne : NS chlordecone 101104 ABG** **Réf. Classement :** SDRRCC/BRLA/ABG	**NOTE DE SERVICE** **DGAL/SDSPA/MCSI/SDRRCC/N2004-8276** **Date: 29 novembre 2004**

Date de mise en application : immédiate
Annule et remplace : néant
Date limite de réponse : -

Nombre d'annexe: 1

Objet : Méthode de dosage des résidus de chlordécone dans les produits alimentaires d'origine animale

Bases juridiques :

- **REGLEMENT (CE) N° 882/2004 DU PARLEMENT EUROPEEN ET DU CONSEIL du 29 avril 2004** relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux.

- **DIRECTIVE 96/23/CE DU CONSEIL, du 29 avril 1996**, relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits

Résumé : La présente note de service référence la méthode de dosage des résidus de chlordécone dans les produits alimentaires d'origine animale.

MOTS-CLES : Méthode officielle d'analyse – résidus – chlordécone – pesticide – produit alimentaire

Destinataires	
Pour exécution : - Directeurs départementaux des services vétérinaires - Vétérinaires responsables des postes d'inspection frontaliers - AFSSA LERQAP - Laboratoires vétérinaires départementaux	Pour information : - Préfets - Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires - Directeur de l'Ecole nationale des services vétérinaires - Directeur de l'INFOMA - DGCCRF - Directeur Général de l'AFSSA - Laboratoire vétérinaire de Rungis - COFRAC

J'ai l'honneur de vous faire parvenir la référence et le protocole (en annexe) de la nouvelle méthode d'analyse officielle de :

- dosage des résidus de chlordécone dans les produits alimentaires d'origine animale.

Méthode	Référence	Remplace
Méthode de dosage des résidus de chlordécone dans les produits alimentaires d'origine animale	AFSSA/LERQAP/TOPPOP/04	-

Cette méthode a été développée par le laboratoire national de référence pour la recherche et le dosage des pesticides (Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédures agroalimentaires - LERQAP – AFSSA, site de Maisons-Alfort).

La Directrice Générale
de l'Alimentation

Sophie VILLERS

METHODE INTERNE

Méthode de dosage des résidus de chlordecone dans les produits alimentaires d'origine animale

Rédacteur : Jacques Mallet	Approbateur : François Bordet

1- AVERTISSEMENT ET PRECAUTION DE SECURITE

Les vapeurs de certains solvants sont très toxiques. Elles peuvent pénétrer par la peau. Manipuler les solvants sous un dispositif d'aspiration des vapeurs efficace pour les éliminer dés leur dégagement.
Les acides sont très irritants. L'acide sulfurique 60% utilisé dans cette méthode ne doit absolument pas entrer en contact avec la peau sous peine de brûlure. Protéger les yeux par des lunettes de protection.

2- INTRODUCTION

La méthode décrite est destinée à doser la chlordécone dans les produits alimentaires d'origine animale contenant une certaine proportion de matière grasse.

3- OBJET et DOMAINE d'APPLICATION

La méthode est caractérisée pour le dosage des résidus du pesticide chlordécone dans les matrices d'origine animale : viande, poisson, œuf, lait, graisse.

4- REFERENCES

Analysis of chlordecone (Kepone) in biological specimens. R.V. Blanke et al.. Journal of Analytical Toxicology VOL. 1. 03-04/1977. p : 57-62

5- PRINCIPE

La chlordécone est extraite de l'échantillon par un solvant organique (hexane/acétone) puis transformée en chlordécone-hydrate en présence de soude. Ce composé est soluble dans la phase aqueuse qui est rincée à l'hexane pour en éliminer la matière grasse. La chlordécone est reformée en milieu acide, extraite par l'hexane/acétone et dosée par chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD).

6- REACTIFS ET PRODUITS

- solution de soude 0,5 M dans l'eau
- solution d'acide sulfurique 60 % dans l'eau
- mélange hexane/acétone, 85/15, v/v
- n-hexane
- solutions de chlordécone à 1 et 10 ng/g dans le cyclohexane

7- APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et en particulier pour le dosage par chromatographie en phase gazeuse :

Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un injecteur approprié (avec éventuellement un système d'injection automatique), d'un four et d'un détecteur à capture d'électrons (ECD). Les caractéristiques de pré-colonne et de colonne sont présentées à titre d'exemple dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques de pré-colonne et de colonne de chromatographie.

	Pré-colonne	Colonne analytique
Longueur en m	2	50
Diamètre interne en mm	0,32	0,32
Colonne	Silice fondue désactivée	silice
Composition du film		5% phényl, 95% diméthyl
Epaisseur du film en µm		0,25
polarité		apolaire

Type de colonne : CP SIL 8 CB
Exemple de programmation de la chromatographie, tableau 3.

Tableau 3 : Conditions chromatographiques possibles

Détecteur	ECD
Gaz vecteur	Hélium
Débit en PSI	24
Colonne	Cf tableau 2
Volume d'injection en µl	1
T °C détecteur	320
Programmation injecteur	
T °C initiale	50
Pente en °C / min	150
T °C seuil	250
Durée en min	19,5
Programmation du four	

T °C initiale	80
Plateau en min	2
Pente en °C / min	220°C en 7 min
Plateau en min	10
Pente en °C / min	260°C en 3 min
T °C seuil	280
Plateau en min	0

Les chromatogrammes sont enregistrés et traités par un logiciel d'acquisition et de traitement des données.

8- ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée.

9- MODE OPERATOIRE

Prise d'essai

La prise d'essai est de 2g pour la viande et le poisson, de 4g pour les œufs et le lait, de 0,5g pour la graisse.

Extraction préliminaire

- Pour les produits très gras comme la graisse, procéder préalablement à une extraction telle que décrite dans la norme NF EN 1528, partie 2, § 6.1.4.2. Utiliser cet extrait pour en extraire la chlordécone en ajoutant directement 15 ml de mélange hexane/acétone 85/15. Continuer la méthode à partir de « Transformation par la soude ».
- Pour les autres matrices, peser la prise d'essai dans un tube à centrifuger. Ajouter 5 ml de mélange hexane/acétone 85/15, agiter au Vortex 15s pour le lait et les œufs, et 1 min pour la viande et le poisson de façon à disperser l'échantillon dans le solvant. Centrifuger environ 3 min entre 3000 et 4000 t/min et récupérer la phase organique dans un autre tube à centrifuger. Répéter l'extraction à l'hexane/acétone encore deux fois avec 5 ml de solvant. Réunir les extraits.

Transformation par la soude

Aux 15 ml environ de l'extrait précédent, ajouter 5 ml de solution aqueuse de soude 0,5 M, agiter 15 s et centrifuger environ 3 min. Répéter encore deux fois l'extraction par 5 ml de solution de soude. Réunir les extraits aqueux dans un autre tube à centrifuger. Rincer la phase aqueuse avec 5 ml d'hexane, agiter 15 s, centrifuger et éliminer la phase organique.

Extraction finale

A l'extrait de soude précédente ajouter 5 ml de solution aqueuse d'acide sulfurique à 60 %. Agiter au Vortex 15 s et refroidir. Extraire trois fois par 5 ml d'hexane/acétone en agitant 15 s et en centrifugeant entre chaque [1]. Laver la phase organique par 2 ml d'eau qui sont jetés après agitation

[1] Pour le lait ajouter 3 ml de mélange hexane/acétone, agiter au Vortex 15 s, compléter avec 2 ml de mélange de solvant, remuer doucement manuellement et centrifuger. Prélever le surnageant, tapoter le tube pour briser l'émulsion et prélever le surnageant. Répéter ce procédé trois fois.

15 s et décantation (ou centrifugation). Evaporer la phase organique et reprendre l'extrait dans un volume approprié d'hexane pour un dosage en chromatographie en phase gazeuse.

9.4- ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Injecter 1 à quelque µl de l'extrait obtenu précédemment en chromatographie en phase gazeuse équipé d'un détecteur spécifique du chlore (ECD), en présence d'un étalon interne (par exemple le transnonachlor).

10- EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats des essais sont calculés par le logiciel qui utilise la formule suivante :

$$Q = \frac{\left[\frac{[Ht.Ech]}{[Ht.SInt.Ech]}\right]}{\left[\frac{[Ht.STr]}{[Ht.SInt.STr]}\right]} x \frac{[C.STr]}{[M.Ech]} xVol(Masse)xFd$$

Ht : hauteur du pic
STr : solution de travail
SInt : standard interne
Ech : échantillon
C : concentration en ng/ml (ou en ng/g)
M : masse en g
Vol : volume final en ml (ou Masse en g)
Fd : facteur de dilution éventuel
Q : quantité de résidu en ng/g

REGLE D'ARRONDISSAGE

Les règles générales d'arrondissage sont décrites dans les normes NF X 02 003 et NF X 02 006.

Les résultats sont donnés au ng/g, sans décimale, ou toute autre unité dans un rapport de $10^{-9.}$

CARACTERISATION DE LA METHODE

La méthode a été validée selon la Norme NF V 03-110, « Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence ».

La méthode est caractérisée par le domaine de linéarité, la limite de détection, la limite de quantification, la spécificité, la fidélité.

Domaine de linéarité en ECD : **de 6,1 à 80,0 pg**
Limite de détection déterminée par la droite de régression : **5,5 pg**
Limite de quantification déterminée par la droite de régression : **18,5 pg** (ou ng/g)

La spécificité de la méthode a été déterminée en réalisant des ajouts de chlordécone dans plusieurs matrices alimentaires n'en contenant pas : lait, poisson, viande, œufs, graisse. La régression est réalisée sur trois niveaux d'ajout : 25, 50, 100 ng/g. Le test t de la loi de Student réalisé sur les résultats d'analyse n'a **pas mis en évidence d'effet matrice** (la droite de régression de pente 1 passe par 0).

L'absence de méthode de référence et de matériau de référence ne permet pas de vérifier la justesse de la méthode. Par contre la fidélité a été évaluée sur les mêmes échantillons que précédemment, ce qui revient à déterminer la fidélité intermédiaire ou reproductibilité interne (espacement des analyses dans le temps et réalisation par deux opérateurs). Le coefficient de variation globale est de 15 %, **l'écart type de répétabilité est de 7,2 ng/g**. Le test de stabilité de la fidélité est satisfaisant au seuil de 1 % (test de Cochran).

.