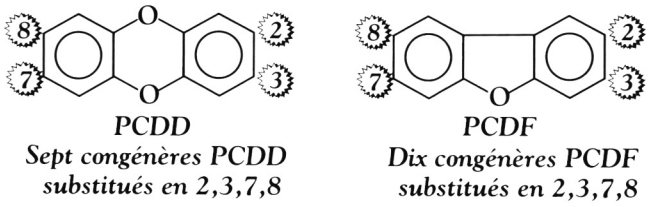
Analyse des PCDD et PCDF par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse haute résolution (GC/MS)

Bien que la réelle toxicité des polychlorodibenzo-*para*-dioxines (PCDD) et des polychlorodibenzofuranes (PCDF) pour l'homme ne soit pas précisément bien établie, leur caractère rémanent les classe parmi les contaminants à surveiller et donc à mesurer afin que l'exposition à ces composés reste minimale.

L'exposition tolérable à ces composés est fixée par l'organisation mondiale de la Santé (OMS) à 1 pg/kg de poids corporel/jour exprimé en équivalent toxique du congénère 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (I-TEQ = *International total equivalent quantity*). Pour l'homme, la majeure contribution au I-TEQ se fait au travers de la chaîne alimentaire. Son évaluation dépend donc de la mesure des PCDD et PCDF dans les denrées alimentaires dont l'origine de la contamination se trouve dans les émissions des sources à combustion tels les incinérateurs et les fours d'aciéries... Parmi les 210 structures possibles, seuls les dix-sept congénères (7 PCDD et 10 PCDF) possédant au moins 4 atomes de chlore en position 2,3,7,8 (figure 1) sont toxiques et sont pris en considération dans le calcul du I-TEQ. Pour effectuer le calcul, les toxicologues ont affecté un coefficient de pondération I-TEF à chacun des 17 congénères.



PCDD
Sept congénères PCDD substitués en 2,3,7,8

PCDF
Dix congénères PCDF substitués en 2,3,7,8

Figure 1 : Noyaux des molécules PCDD et PCDF

La toxicité d'un échantillon est par convention exprimée par le I-TEQ dont la mesure est l'objectif de l'analyste. Compte tenu des très faibles concentrations à mesurer et de l'importance des résultats qui peuvent être utilisés à des fins réglementaires, il est nécessaire d'utiliser les méthodes d'analyse les plus

performantes. A l'heure actuelle, la méthode d'analyse associant la chromatographie gazeuse haute résolution à la spectrométrie de masse haute résolution est celle qui procure le maximum de garantie dans les résultats, à condition qu'elles soient mises en œuvre par des personnes qualifiées, ayant non seulement l'expérience de l'analyse mais également celle de l'analyse de très faibles quantités, en présence d'autres contaminants présents en grandes quantités.

La spectrométrie de masse haute résolution seule ne peut pas résoudre tous les problèmes inhérents à l'analyse des PCDD et PCDF dans des matrices complexes si l'extrait purifié ne le permet pas.

Dans ce chapitre, les paramètres les plus importants pour l'analyse des PCDD et PCDF seront examinés, avec l'objectif de présenter la méthode la plus performante pour l'analyse des PCDD et PCDF en agroalimentaire et dans l'environnement.

Propriétés physiques des PCDD et PCDF

Comme pour n'importe quel composé, il est important de connaître les propriétés physico-chimiques des PCDD et PCDF qui peuvent influencer leur analyse. Les PCDD et PCDF sont des composés lipophiles peu ou non polaires. Pour exprimer la solubilité d'un composé dans les graisses, le coefficient de partage octanol-eau symbolisé par Kow est le plus fréquemment utilisé. Les Kow des PCDD et PCDF sont parmi les plus élevés observés pour les contaminants trouvés dans l'environnement. Le caractère lipophile des PCDD et PCDF explique que ces composés s'accumulent dans les graisses animales et végétales.

Nous savons également que la solubilité des PCDD et PCDF dans les graisses n'est pas la même pour tous les congénères. Elle augmente avec le nombre d'atomes de chlore (Mackay et coll., 1992 ; Shiu et coll., 1988). En conclusion, les PCDD et PCDF sont peu ou pas solubles dans l'eau et se fixent facilement dans les sols, les sédiments et les boues avec une grande affinité pour les graisses.

Une autre caractéristique importante pour l'analyse est leur grande stabilité en milieu acide et à hautes températures. Leur volatilité décroît lorsque le nombre d'atomes de chlore croît. Les propriétés citées sont à considérer pour l'analyse des PCDD et PCDF dans l'agroalimentaire et dans les matrices de l'environnement lors des étapes de prélèvement, d'extraction et de purification. La stabilité des PCDD et PCDF se manifeste également dans leur spectre de masse en ionisation par impact d'électrons (EI). La figure 2 présente le spectre de masse en impact d'électrons de la 2,3,7,8-TCDD. La stabilité de cette molécule se traduit par le fait que le massif moléculaire dominé par l'ion m/z 322, $(M + 2)^{+\circ}$ est le pic de base du spectre (100 %), ce qui montre que même en impact d'électrons il y a peu de fragmentation. Les ions fragments les

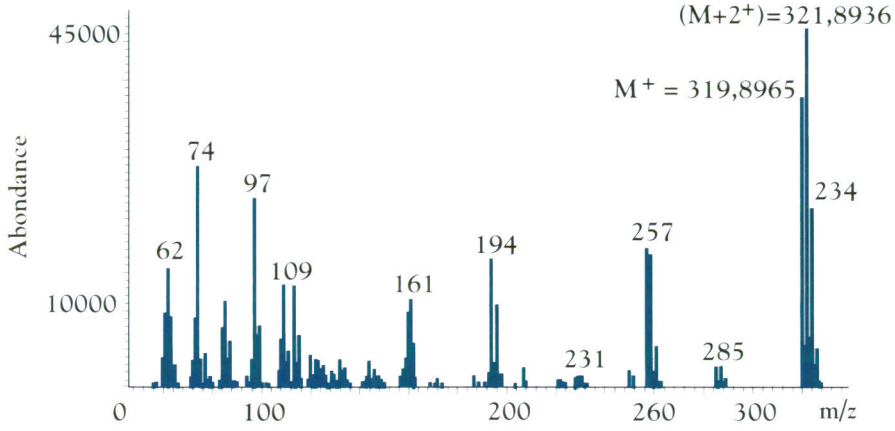


Figure 2 : Spectre de masse en impact d'électrons de la 2,3,7,8-TCDD

plus caractéristiques correspondent à une puis deux pertes de COCl à m/z 257 et 194. Les spectres en impact d'électrons ont été étudiés (Buser, 1975). Cette stabilité est favorable à la mesure des PCDD et PCDF par spectrométrie de masse haute résolution car les ions moléculaires sont les plus intenses et se situent dans un domaine de masse relativement élevé, à l'abri des ions fragments résiduels, couramment rencontrés en dessous de la masse 150.

Procédure analytique

Quelle que soit la matrice dans laquelle les PCDD et PCDF doivent être analysés, la procédure analytique comporte plusieurs étapes indispensables qui sont la collecte de l'échantillon, sa préparation à l'étape d'extraction, la purification de l'extrait et enfin la mesure des PCDD et PCDF dans l'extrait purifié.

Bien sûr, chacune de ces étapes est étroitement liée à la matrice de l'échantillon et aux propriétés physico-chimiques des PCDD et PCDF, mais il est possible de représenter en un seul schéma le déroulement d'une analyse (figure 3).

Extraction

En général, cette étape est précédée d'une préparation adaptée à la matrice de l'échantillon. Les produits alimentaires seront traités pour s'assurer de l'homogénéité et donc de la représentativité de l'échantillon.

Les traitements les plus courants utilisés en agroalimentaire sont le hachage, le broyage et la lyophilisation, par exemple pour les œufs, les végétaux et la

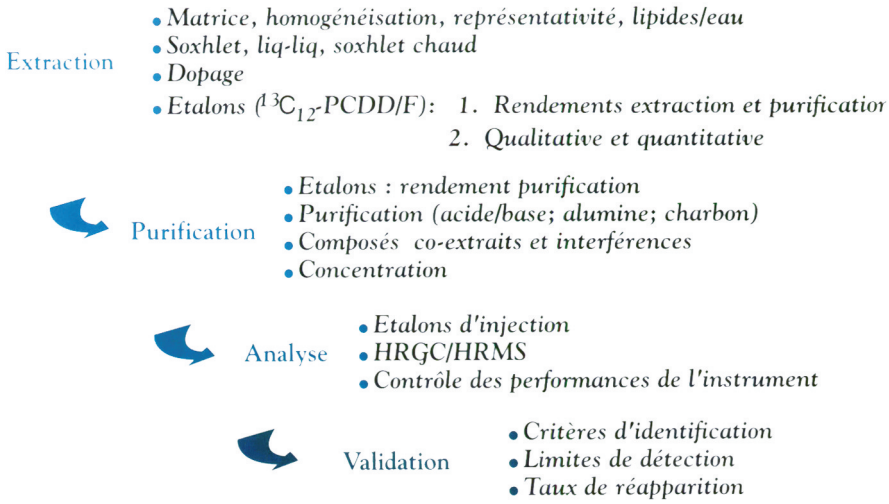


Figure 3 : Schéma d'analyse

viande. L'échantillon ainsi préparé est extrait avec un solvant ou un mélange de solvants avec comme objectif l'extraction quantitative des PCDD et PCDF en solution dans le ou les solvants ou dans la matière grasse.

Les prélèvements solides dans l'environnement peuvent également être très variés et le pré-traitement appliqué à une cendre volante est différent de celui appliqué à un sol, un sédiment ou encore un mâchefer.

Les prélèvements gazeux sont effectués sur support solide telles la résine amberlite XAD-2 ou la mousse de polyuréthane. L'extraction est une extraction liquide-solide en Soxhlet froid ou chaud avec du toluène seul ou en mélange avec des solvants plus polaires.

Les produits laitiers peuvent également être extraits par extraction liquide – liquide avec de l'éther de pétrole.

Le choix du solvant est important et doit être validé pour la matrice soumise à l'extraction.

Purification

A ce stade de l'analyse, les PCDD et PCDF sont soit en solution dans un solvant ou un mélange de solvants, ou encore dissous dans la matière grasse, dans les deux cas en présence d'autres familles de composés. La purification doit permettre l'élimination de la matière grasse et des autres familles de contaminants susceptibles d'interférer avec la mesure des PCDD et PCDF. La littérature est particulièrement abondante sur le sujet, et la chromatographie

d'adsorption solide-liquide avec divers réactifs tels la silice, le florisil, l'alumine, le charbon et la chromatographie de filtration sur gel sont les plus répandues. A l'origine, la méthode décrite par Smith (Smith et coll., 1984) qui associe une série de colonnes de silicates (silice modifiée) est la première approche pour l'automatisation de la préparation des extraits. La séparation des PCDD et PCDF de la matière grasse extraite fait appel à deux techniques actuellement prépondérantes :

- La chromatographie par filtration sur gel ou d'exclusion permet une séparation des lipides de masses moléculaires élevées des contaminants chlorés de plus faibles masses moléculaires. Outre le fait que la méthode est peu sélective, la capacité des résines est limité à 1 à 2 grammes de matières grasses et l'augmentation de la taille des colonnes augmente les quantités de solvants et augmente les risques de contamination.
- Le charbon actif a été largement utilisé et la méthode décrite par Liem (Liem et coll, 1990) présente l'avantage de pouvoir traiter jusqu'à 20 grammes et plus de matières grasses.

Identification et quantification

La méthode actuelle pour la séparation et la détection des PCDD et PCDF fait appel à la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution.

L'objectif est donc la mesure des 17 congénères considérés comme toxiques sur les 210 formules possibles et, notamment pour les prélèvements à l'émission, les sommes des isomères des séries homologues portant un minimum de 4 atomes de chlore.

Séparation par chromatographie gazeuse

Les propriétés séparatives des différentes phases ont été étudiées (Ryan et coll., 1991 ; Bacher et coll., 1992).

A l'heure actuelle, le constat est simple, il n'existe pas de colonne sur le marché permettant d'atteindre l'objectif fixé et il faudrait au minimum deux colonnes de polarité différente pour parvenir à éliminer les interférences dues aux autres congénères. A l'exception des exercices de certification de matériaux de référence et éventuellement des intercomparaisons entre laboratoires, l'analyse sur deux colonnes différentes n'est pas financièrement acceptable.

Cependant, il convient de pondérer ce constat car toutes les matrices ne présentent pas les mêmes difficultés dans la mesure où les laboratoires maîtrisent l'analyse de très faibles quantités, sans risque de contamination externe. Les échantillons peuvent être classés en deux grandes catégories sur la base des concentrations en PCDD et PCDF :

• la première regroupe toutes les matrices de l'environnement (émissions, air ambiant, sédiments, sols, boues...) ;
• l'agroalimentaire constitue l'essentiel de la deuxième catégorie où l'on distingue les matrices ayant subi une digestion biologique. Lors des dégradations enzymatiques, les congénères toxiques ne sont pas métabolisés et s'accumulent dans les graisses. Toutes les matrices contenant de la matière grasse affichent un profil caractérisé par la seule présence des congénères toxiques. La séparation chromatographique des 17 congénères toxiques n'est plus alors un problème, et les phases apolaires qui donnent une moins bonne séparation (au moins pour les congénères tétra et pentachlorés) que les phases fortement polaires (par ailleurs plus fragiles) peuvent être utilisées pour l'analyse des PCDD et PCDF dans les matrices agroalimentaires sans contamination externe.

Détection et mesure

La spectrométrie de masse est la technique utilisée pour la détection des PCDD et PCDF et la sensibilité maximale est obtenue en impact d'électrons comme méthode d'ionisation et en scrutation d'ions spécifiques comme méthode de détection. Par convention, les deux ions les plus intenses du massif moléculaire sont scrutés, ce qui permet de mesurer leur rapport isotopique $^{35}Cl/^{37}Cl$ et ainsi de confirmer l'identité du congénère. La quantification est réalisée par l'addition d'étalons internes avant l'extraction pour les échantillons de l'environnement et dans l'aliquote de matières grasses pour les produits agroalimentaires. La disponibilité des 17 homologues marqués au carbone-13 des congénères toxiques et leur utilisation comme étalons internes contribuent à faire de cette méthode dite à dilution isotopique la technique de choix pour l'analyse des PCDD et PCDF. L'utilisation des 17 congénères marqués est un critère de qualité important car il compense les pertes spécifiques possibles lors des différentes étapes de purification.

L'addition d'étalons internes, également marqués au carbone-13, à l'extrait purifié permet la mesure des taux de réapparition des étalons introduits avant extraction. Actuellement, seule la norme européenne sur les émissions fixe les critères d'acceptabilité des taux de réapparition, mais des critères identiques sont actuellement proposés pour l'agroalimentaire par la Communauté Européenne.

Les méthodes actuelles d'analyse des PCDD et PCDF font intervenir l'addition d'étalons marqués aux quatre grandes étapes de l'analyse si on inclut l'échantillonnage, ce qui a été fait au niveau de la norme européenne à l'émission, à savoir l'échantillonnage, l'extraction, la purification et la mesure. Ces additions multiples font de la méthode de dilution isotopique la technique de choix pour l'analyse des PCDD et PCDF dans toutes les matrices. Le tableau I précise le rôle des différents étalons marqués.

Tableau I : Utilité des étalons internes

Types d'étalons	Utilité
Etalons de prélèvements	Mesure et vérification du prélèvement
Etalons d'extraction	Rendements d'extraction et de purification Identification et quantification des congénères
Etalons de purification	Mesure des taux de réapparition liés à la purification des extraits
Etalons d'injection	Quantification des taux de réapparition d'extraction et de purification

Critères d'identification des congénères toxiques

La toxicité d'un échantillon étant le résultat de la quantification des 17 congénères toxiques chlorés en position 2,3,7 et 8, il est important qu'ils soient correctement identifiés.

L'identification est basée sur les paramètres suivants :
- le rapport isotopique des deux ions scrutés doit être égal à ± 15 % du rapport théorique ;
- l'élution de chaque congénère doit correspondre à la fenêtre d'élution de la série de même degré de chloration ;
- les temps de rétention du congénère natif doit être égal à celui de l'homologue marqué dans la fourchette de 0, + 3 sec ;
- les temps de rétention des deux ions scrutés doivent être identiques ;
- le rapport signal sur bruit doit être ≥ 5 ;
- l'absence de signaux pour les familles de composés susceptibles d'interférer (ex : PCDPE).

Spectrométrie de masse haute résolution

La nécessité d'utiliser la spectrométrie de masse haute résolution pour la mesure de la 2,3,7,8-TCDD remonte aux travaux de Baughman et Meselson en 1973 lors de l'étude de la contamination de poissons contaminés en Asie du sud-est. Mais cette technique ne s'est réellement imposée que lorsque la fiabilité, la reproductibilité et la sensibilité des instruments et la convivialité des logiciels ont permis leur utilisation pour l'analyse de grandes séries d'échantillons.

Compte tenu du coût d'un spectromètre de masse haute résolution, il est naturel d'examiner si les avantages de cette technique justifie la différence de prix avec les filtres de masse quadripolaires.

La haute résolution permet l'utilisation des tous les homologues marqués au carbone-13 et contribue à obtenir une meilleure précision de la mesure des PCDD et plus particulièrement des PCDF. Le tableau II montre les résolutions nécessaires à la séparation des PCDD et PCDF natifs de leurs homologues marqués.

Tableau II : Séparation des PCDD natifs et des $^{13}C_{12}$-PCDF

Congénères	Résolution
$^{13}C_{12}$-TCDF et TCDD natifs	8 000
$^{13}C_{12}$-PeCDF et PeCDD natifs	9 000
$^{13}C_{12}$-HxCDF et HxCDD natifs	10 000
$^{13}C_{12}$-HpCDF et HpCDD natifs	11 000
$^{13}C_{12}$-OCDF et OCDD natifs	12 000

Les congénères marqués bien utilisés permettent le contrôle des différentes étapes, prélèvement, extraction et purification, et contribuent à l'identification et à la quantification des PCDD et PCDF.

La haute résolution contribue à la purification des extraits et à améliorer le rapport signal sur bruit et donc la sensibilité et les limites de détection. Certaines familles de composés, par exemple les polychlorobiphényles, les chlorobenzothiophènes sont éliminés par la haute résolution. Ces familles de composés se conduisent comme les PCDD et PCDF lorsque leurs concentrations sont très élevées. Le gain de sensibilité avec la haute résolution permet la mesure des PCDD et PCDF dans les matrices agroalimentaires, les fluides biologiques, les boues de station d'épuration et les eaux, par exemple. Les concentrations mesurées dans ces matrices sont 1 000 fois plus faibles que celles mesurées à l'émission. L'augmentation des prises d'essai d'échantillons, qui s'accompagne de celle des autres familles de contaminants, ne permet pas de résoudre le problème de l'insuffisance de sensibilité des instruments basse résolution. Hayward et coll., 1999 rapportent que la MS/MS est 5 fois moins sensible que la haute résolution, ce qui confirme le résultat rapporté par Fraisse et coll. dès 1989. L'étalonnage de l'instrument de mesure est normalement réalisé à partir de quatre ou cinq solutions dont la moins concentrée, qui fixe la limite de quantification, affiche des concentrations de l'ordre de 100 pg/µl, éventuellement moins. Le critère de qualité exigé est que les concentrations des congénères des échantillons soumis à l'analyse soient comprises dans le domaine défini par l'étalonnage. Les instruments haute résolution sont les seuls à pouvoir mesurer des concentrations aussi faibles avec un rapport signal sur bruit sans ambiguïté, environ 20-30 en routine.

La figure 4 donne quelques exemples des concentrations mesurées dans des aliments faiblement contaminés. Les deux échantillons présentent le même profil où dominent les dioxines fortement chlorées.

Si on représente les mêmes analyses exprimées en TEQ, les congénères prépondérants sont la 2,3,7,8-TCDD, la 1,2,3,7,8-PeCDD et le 2,3,4,7,8-PeCDF comme illustré dans la figure 5. La mesure des concentrations observées dans ce type d'échantillon est relativement facile avec environ 5 grammes de matières grasses avec une bonne méthode de préparation et la spectrométrie de masse haute résolution.

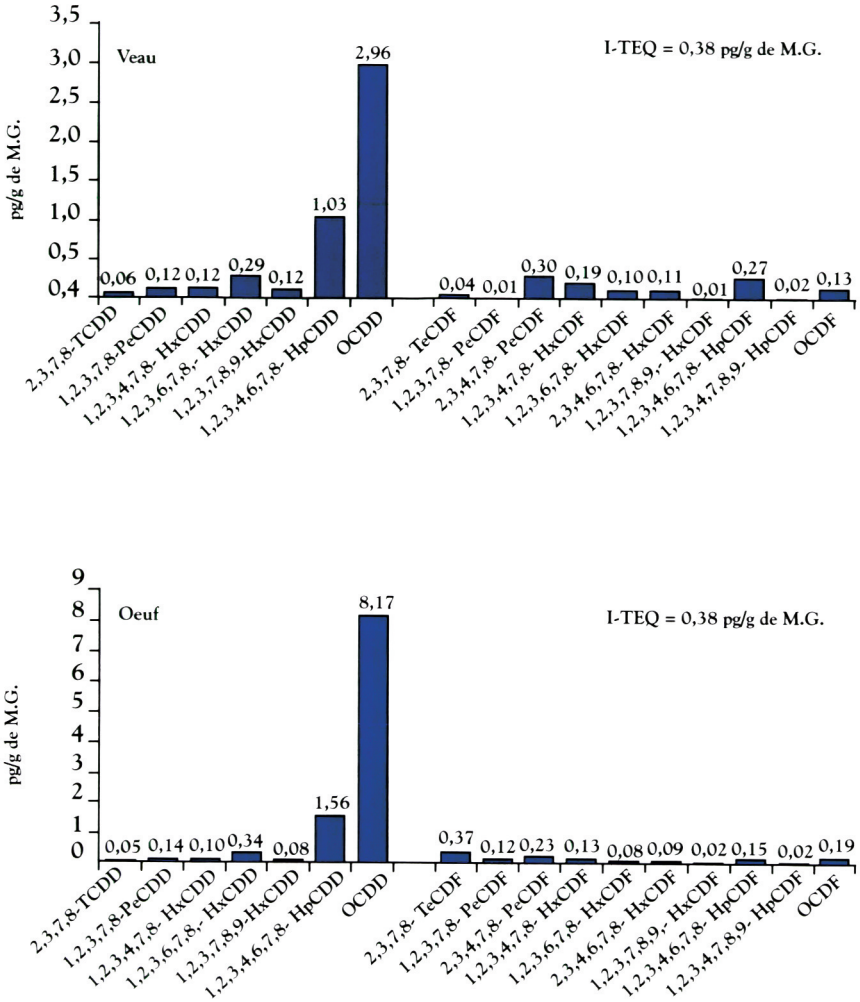


Figure 4 : Analyse (pg/g de matières grasses) des 17 congénères toxiques PCDD/PCDF dans un échantillon de viande de veau et d'œufs (M.G. : matières grasses)

D'autres exemples d'échantillons plus contaminés permettent l'analyse avec 1, 2 ou 3 grammes de matières grasses comme le montre la figure 6 pour deux échantillons de lait maternel et de tissu adipeux.

La figure 7 montre que les profils des deux échantillons sont très ressemblants et que 4 congénères sont responsables de la toxicité exprimée en TEQ.

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution nécessite la présence permanente d'un produit de référence (par exemple le PFK = perfluorokérosène), dont l'ionisation donne des ions d'intensité constante, utilisés pour

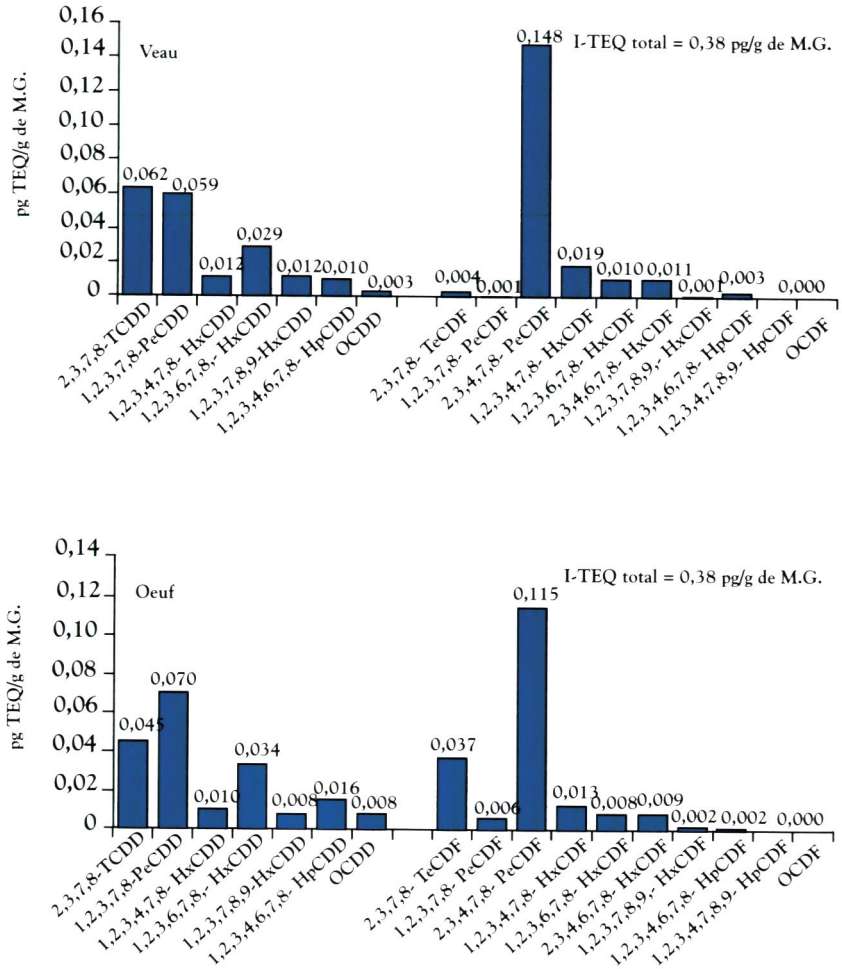


Figure 5 : Analyse (pg TEQ/g de matières grasses) des 17 congénères toxiques PCDD/PCDF dans un échantillon de viande de veau et d'œufs

« verrouiller » l'analyseur et éviter toute dérive de façon à conserver le maximum de sensibilité pour les ions des PCDD et PCDF. L'analyste dispose donc d'une trace permanente d'un ion témoin de la stabilité de l'ionisation et du spectromètre de masse. Ce paramètre est un critère de qualité de l'efficacité des étapes de purification car la présence d'impuretés modifie l'ionisation donc l'intensité du signal de l'ion de référence. Par exemple, la présence d'une interférence au temps de rétention de l'étalon interne se traduit par une baisse de l'intensité du signal et donc une quantification erronée.

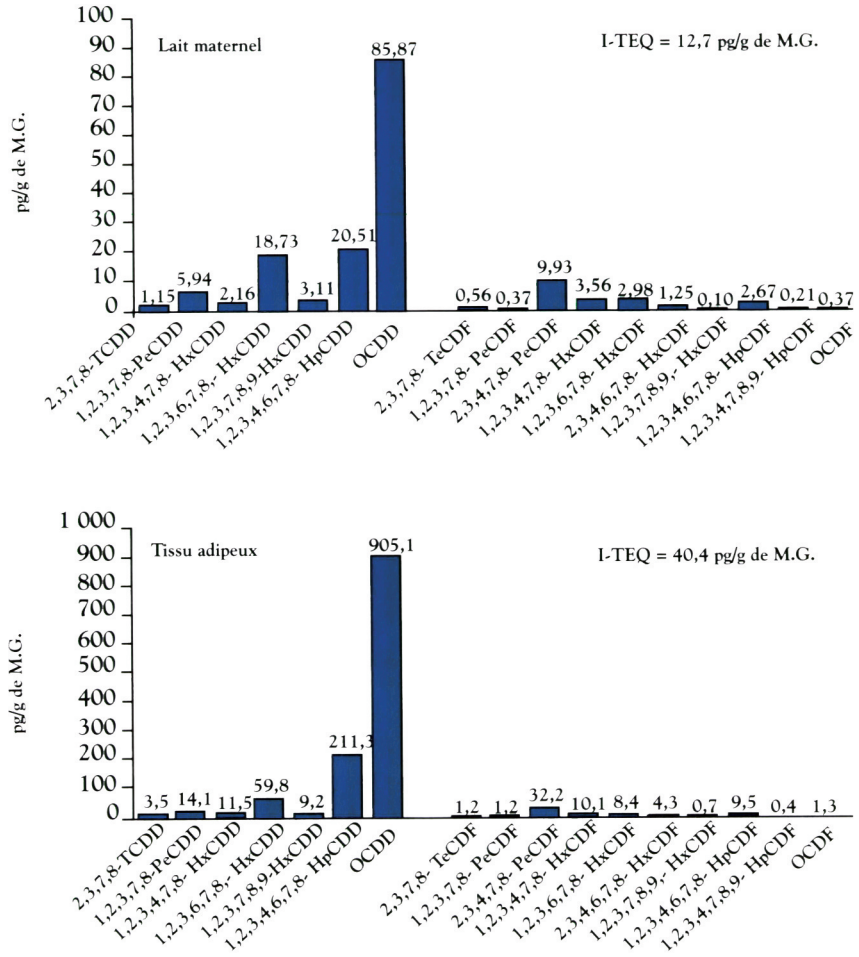


Figure 6 : Analyse (pg/g de matières grasses) des 17 congénères toxiques PCDD/PCDF dans un échantillon de lait maternel et de tissu adipeux

Contrôle de qualité dans l'analyse des PCDD et PCDF

L'analyse des PCDD et PCDF doit être exécutée avec le maximum de garanties à cause :

- des faibles quantités à mesurer ;
- de la réglementation existante : pour les émissions, norme EN 1948 en réponse à la directive européenne de 1992 ; pour les aliments des animaux, Directive 98/60/CE du 24 juillet 1998 ; pour les additifs dans les aliments pour animaux, règlement (CE) N° 2439/1999 ;

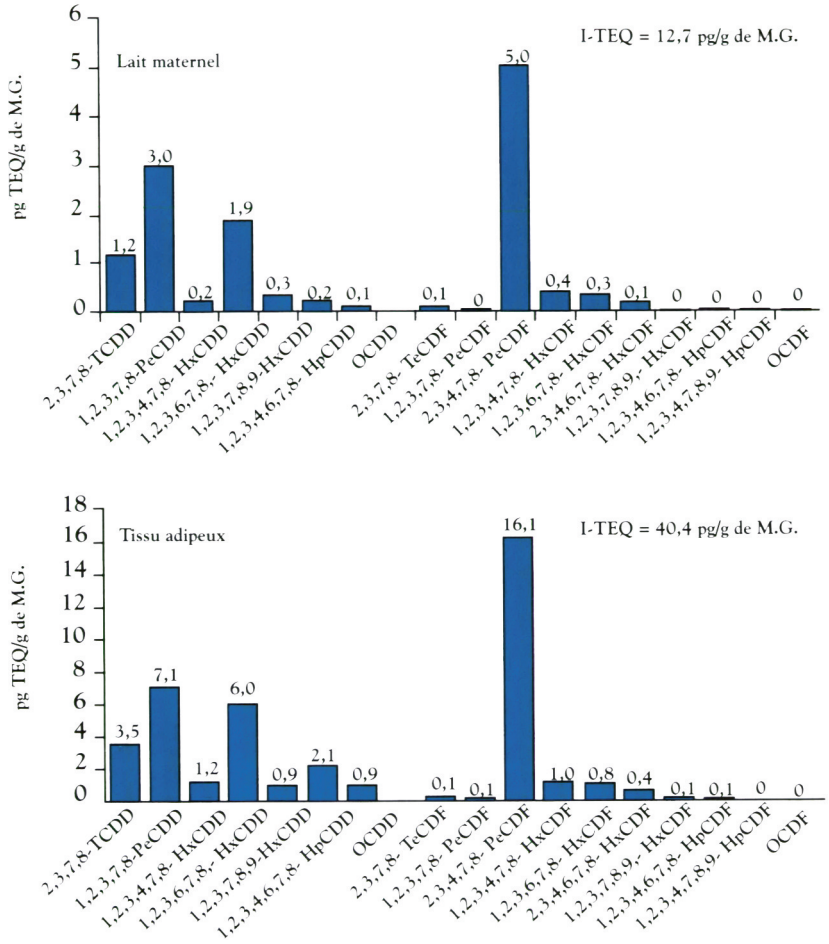


Figure 7 : Analyse (pg TEQ/g de matières grasses) des 17 congénères toxiques PCDD/PCDF dans un échantillon de lait maternel et de tissu adipeux

- de la réglementation à l'étude, notamment dans l'agroalimentaire où les concentrations maximales des PCDD et PCDF exprimées en équivalent toxique 2,3,7,8-TCDD, rapportées à la matière grasse proposées sont de 3 pg TEQ/g pour le lait, les volailles et la viande de bœuf, 2 pg TEQ/g pour la viande de porc, 5 pg TEQ/g pour les œufs et 3 pg /g pour les poissons (dans ce cas la valeur est rapportée à la totalité de l'animal) ;
- des conséquences sur la santé de l'homme.

Le contrôle de qualité est présent à tous les niveaux du protocole analytique, de la vaisselle de la verrerie à la mesure, en passant par les contrôles de tous les réactifs utilisés (solvants, adsorbants, acides...). En plus de l'étalonnage de l'instrument avec plusieurs solutions, des blancs de procédure, des analyses de

contrôle de matériaux certifiés, les laboratoires doivent participer aux exercices interlaboratoires pour montrer leur aptitude à analyser des échantillons réels et valider leur méthode. Les résultats doivent être accompagnés d'un minimum d'information tels que les profils analytiques, les taux de réapparition des étalons internes et éventuellement des limites de détection pour les congénères non détectés.

En conclusion, la spectrométrie de masse haute résolution utilisée en mode de scrutation d'ions, associée à des méthodes d'extraction et de purification validées et à l'utilisation des congénères marqués est actuellement l'état de l'art. Toute autre technique doit montrer qu'elle permet d'atteindre au moins la même qualité de résultats en termes de justesse, précision, répétabilité et sensibilité, pour être utilisable. La diversité des matrices cache un grand nombre de pièges que les analystes se doivent de connaître pour pouvoir les éviter. Ceci implique la participation aux essais interlaboratoires qui, seuls, permettent la validation des méthodes de préparation et de mesure. Ces essais sont organisés depuis plusieurs années par le département de chimie de l'Université de Umeä en Suède. Complémentairement à ces essais internationaux, l'utilisation des matériaux de référence est recommandée même par les laboratoires expérimentés.

Daniel Fraisse
Laboratoire CARSO - Centre d'analyse de traces, Lyon

Bibliographie

BACHER R, BALLSCHMITER K. Separation of polychlorodibenzo-*p*-dioxins and – dibenzofurans on the new polar stationary phase DB Dioxin. *Chromatographia* 1992, **34 :** 137-142

BAUGHMAN R, MESELSON M. An analytical method for detecting TCDD (dioxin) : levels of TCDD in samples from Vietnam. *Environ Health Perspect* 1973, **5 :** 27-35

BUSER HR. Analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in chlorinated phenols by mass fragmentography. *J Chromatogr* 1975, **114 :** 95-108

FRAISSE D, GONNORD MF, BECCHI M. High resolution/Tandem mass spectrometry : Analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 1989, **3 :** 79-84

HAYWARD DG, HOOPER K, ANDRZEJEWSKI D. Tandem-in time mass spectrometry method for the sub-parts-per-trillion determination of 2,3,7,8-chlorine-substituted dibenzo-*p*-dioxins and furans in high-fat foods. *Anal Chem* 1999, **71 :** 212-220

LIEM AKD, DE JONG APJM, MARSMAN JA, DEN BOER, AC, GROENEMEIJR GS, DEN ARTOG RS, DE KORTE GAL, HOOGERBRUGGE R, KOOTSTRA PR, VAN'T KLOOSTER HA. A rapid procedure for the analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in milk samples. *Chemosphere* 1990, **20 :** 843-850

MACKAY D, SHIU WY, MA KC. In : Illustrated Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemical, Ed. 2. Lewiw Publishers, Michigan 1992, pp 429-560

RYAN JJ, CONACHER HBS, PANOPIO LG, LAU BPY, HARDY JA, MASUDA Y. Gas chromatographic separation of all 136 tetra- to octa-polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans on nine different stationary phases. *J Chromatogr* 1991, **541 :** 131-183

SHIU WY, DOUCETTE W, GOBAS FAPC, ANDREN A, MACKAY D. Physical-chemical properties of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ. Sci. Technol* 1988, **22 :** 651-658

SMITH LM, STALLING DL, JOHNSON JL. Determination of part-per-trillion levels of polychlorinated dibenzofurans and dioxins in environmental samples. *Anal Chem* 1984, **56 :** 1830-1842