

---

# Analyse des PCDD et PCDF par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse basse résolution en tandem

Les polychlorodibenzodioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF) sont deux classes de composés engendrées principalement par l'activité humaine. Ce sont deux séries de composés tricycliques comportant un ou deux hétéroatomes d'oxygène et de un à huit atomes de chlore. Selon le nombre et la position de ces derniers, il existe 75 isomères de PCDD et 135 isomères de PCDF. Parmi ces 210 molécules, celles substituées en position 2,3,7,8 apparaissent les plus toxiques.

Les problèmes de dissémination dans l'environnement des dioxines et des produits organochlorés apparentés (PCDF et PCB) sont liés à plusieurs champs d'activité : industries chimiques, agroalimentaires, santé publique. La bio-accumulation de ces composés dans les organismes vivants conduit à une contamination pouvant atteindre la chaîne alimentaire.

Récemment, le Conseil de l'Europe a exprimé son désir d'obtenir des données sur les PCDD et PCDF contenus dans divers matériaux agro-alimentaires. En France, le Conseil Supérieur d'Hygiène de France a présenté la détection de ces composés comme un objectif prioritaire.

Des méthodes analytiques pour la détermination des PCDD et PCDF ont été développées dans les pays européens et d'Amérique du Nord. Une norme française AFNOR NF EN 14186 a été publiée en juin 1997 (analyse des poussières d'incinérateur). La plupart des analyses pour la détermination des PCDD et PCDF sont effectuées à l'aide de spectromètres de masse haute résolution ( $P \geq 10\ 000$ ) qui permettent d'obtenir une grande sensibilité et une grande sélectivité (limite de détection de l'ordre de 0,02 pg). Mais le prix à payer pour ce type de dosage est hors de portée pour des analyses de routine visant à traiter des centaines d'échantillons en épidémiologie ou en santé publique.

Les progrès de la chimie analytique (en particulier séparative) (Pyell et coll., 1993 ; Pyell et Garrigues, 1994 ; Stranberg et coll., 1998) permettent la réalisation de méthodologies d'extraction et de purification plus rapides, moins coûteuses mais aussi performantes quant à la validité des résultats. On peut également envisager d'utiliser la spectrométrie de masse basse résolution

en mode tandem (Hayward, 1997, Hayward et coll., 1999). Ces méthodologies sont intéressantes dans le cas d'études de surveillance dans les compartiments de l'environnement (animaux, végétaux, sols...) mais aussi dans les études épidémiologiques pour augmenter le nombre de sujets étudiés et mieux apprécier les niveaux d'exposition (dosages systématiques dans le sang par exemple).

Le développement présenté dans ce chapitre a trait à la mise au point d'un protocole analytique pour l'extraction, la séparation et la détection des PCDD et PCDF. Le but de ce projet était de développer un protocole analytique rapide et fiable pour l'analyse des PCDD et PCDF utilisant l'extraction assistée par micro-ondes, la chromatographie en phase liquide haute pression (HPLC) comme méthode de purification et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse basse résolution comme méthode d'identification et de quantification.

### **Méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse basse résolution en tandem**

L'optimisation a porté dans un premier temps sur un seul composé : la 2,3,7,8-TCDD. Tous les développements analytiques ont été effectués sur un couplage chromatographe en phase gazeuse/spectromètre de masse de type trappe à ions. La colonne chromatographique était une colonne capillaire à phase stationnaire peu polaire (méthyle (95 %) - phényle (5 %) - silicone), de type CP-SIL 8CB (Chrompack) (60 m longueur × 0,25 mm diamètre intérieur × 0,25 µm épaisseur de phase). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à un débit constant de 2 ml/min en mode d'injection « *on-column* ». Le programme de température du four chromatographique est le suivant : 50 °C (1 min), 15 °C/min jusqu'à 200 °C (3 min), 2 °C/min jusqu'à 290 °C (10 min). L'interface est maintenue à 260 °C et la source d'ionisation à 180 °C.

Le spectre de masse de ce composé obtenu sur cet appareillage sous impact électronique à 70 eV est caractéristique. On note le profil de distribution typique obtenu pour les ions M ( $m/z$  320), M + 2 ( $m/z$  322) et M + 4 ( $m/z$  324), dans les proportions 75, 100 et 50, respectivement. L'ion majoritaire est M + 2. On note également un ion fragment caractéristique résultant de la perte de COCl (perte neutre de 63).

La limite de détection de la 2,3,7,8-TCDD en mode de balayage (*full scan*) est de 10 pg injecté. De façon à abaisser cette limite de détection, le mode d'analyse en spectrométrie de masse choisi a été celui de la spectrométrie de masse en tandem (ou mode MS/MS), qui est très facile à mettre en œuvre avec

un spectromètre de masse de type trappe à ions. Différents paramètres ont été optimisés de façon à maximiser la sensibilité :

- sélection de l'ion parent ;
- fenêtre et temps d'isolement de l'ion parent ;
- énergie de collision ;
- temps d'application de l'énergie de collision ;
- valeur de  $Q_z$ .

L'ion parent choisi pour effectuer l'analyse en mode MS/MS est l'ion majoritaire  $M + 2$  ( $m/z$  322). Le mode MS/MS permet de suivre des réactions spécifiques et de cette façon de gagner en sensibilité et sélectivité. Dans le cas présent, la réaction choisie est la perte de neutre  $\text{COCl}$ . Ainsi, on suit la fragmentation  $322 - 63 = 259$ .

Le temps d'isolement de l'ion parent n'a pas d'influence significative sur la sensibilité de la détection. Il est fixé par conséquent à 10 ms. En revanche, la fenêtre d'isolement de l'ion parent est un paramètre important. La sensibilité maximale est obtenue pour la fenêtre la plus petite ( $322 \pm 2$ ).

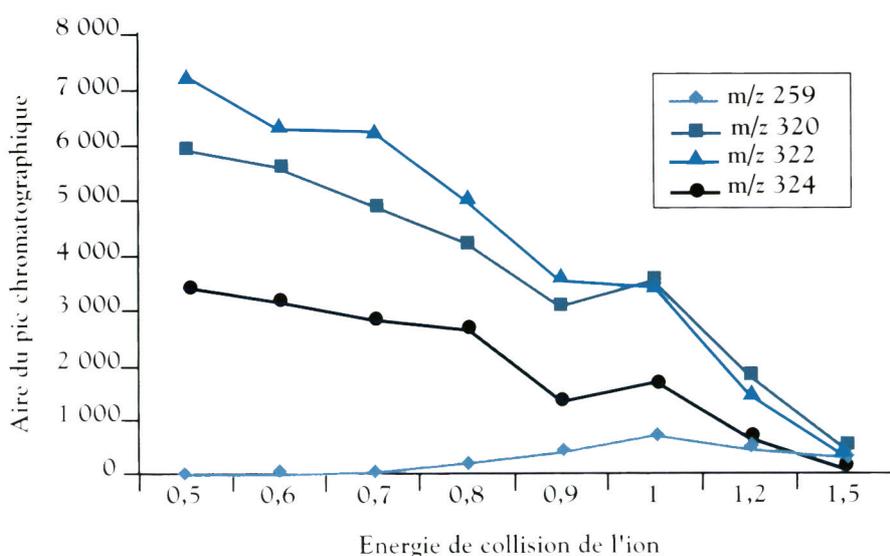


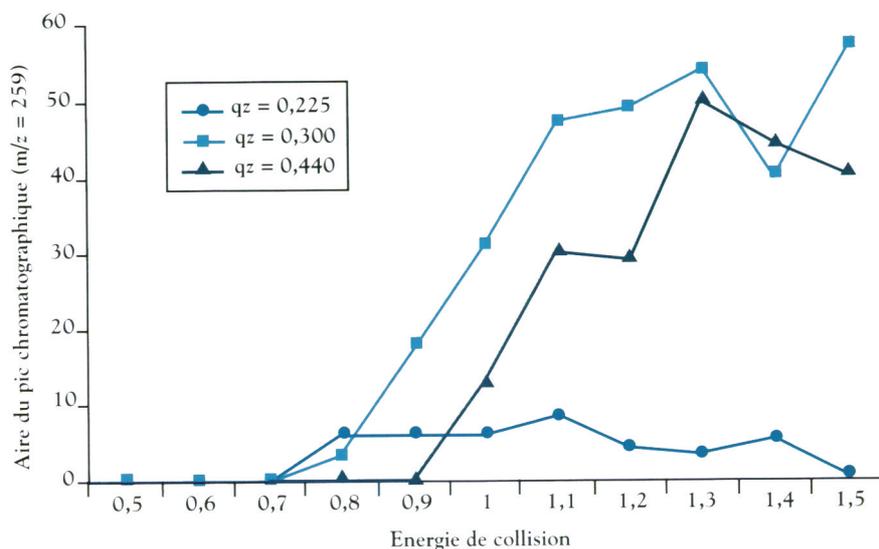
Figure 1 : Effet de l'énergie de collision sur la dissociation de l'ion parent

Il est important d'optimiser l'énergie de collision car elle a un effet important sur la dissociation de l'ion  $M + 2$  et l'obtention de l'ion  $m/z$  259. La figure 1 montre cet effet. On peut noter que  $m/z$  259 est maximum pour une énergie supérieure à 0,9 V, mais que si cette énergie est trop forte ( $> 1,2$  V) on a alors un effet contraire à celui recherché ; l'énergie étant trop forte, il y a une

fragmentation trop importante de la molécule et  $m/z$  259 devient moins abondant.

Le temps d'application de cette énergie n'a lui en revanche que peu d'effet. Il a été fixé à 15 ms pour toute l'étude.

La valeur de  $Q_z$  a un effet très important sur la sensibilité de la détection. De plus, l'effet de l'énergie de collision dépend de la valeur de  $Q_z$  fixée (figure 2). La sensibilité de la détection est maximale pour des  $Q_z$  de 0,3 ou 0,45 et des énergies de collision de 1,3 V.



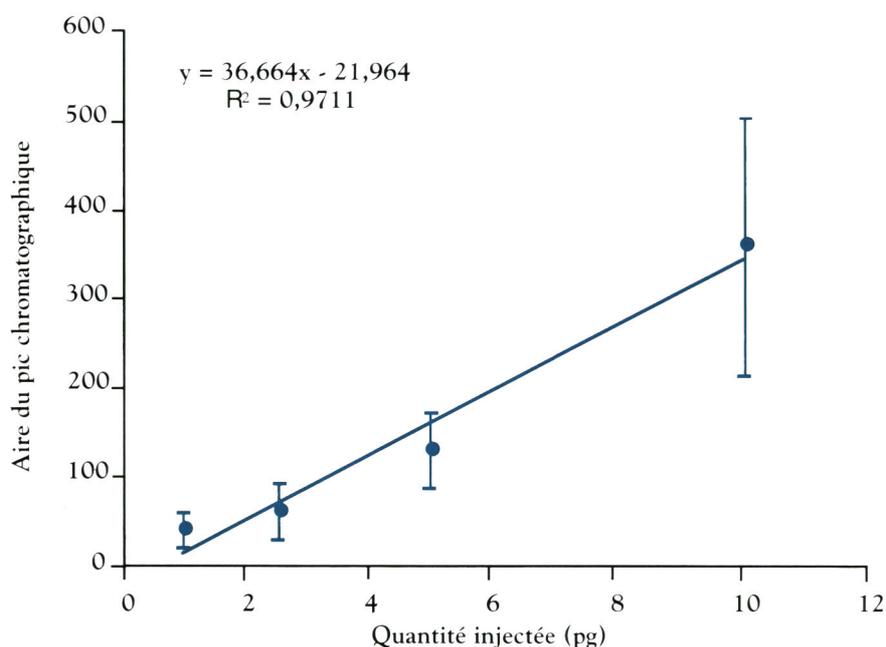
**Figure 2 : Influence de l'énergie de collision et de la valeur de  $Q_z$  sur la dissociation de l'ion parent**

Si l'on considère les différents paramètres optimisés, on aboutit aux conditions optimales présentées dans le tableau I.

**Tableau I : Valeurs des paramètres influant sur la détection de la 2,3,7,8-TCDD**

Sélection de l'ion parent	322
Fenêtre et temps d'isolement de l'ion parent	± 2 pendant 10 ms
Énergie de collision	1,3 V
Temps d'application de l'énergie de collision	15 ms
Valeur de $Q_z$	0,3

Dans ces conditions, on obtient pour la 2,3,7,8-TCDD une limite de quantification de 1 pg injecté. La linéarité du système est correcte (figure 3), même si elle n'est pas excellente. Ceci implique que, pour obtenir une bonne quantification (en termes de précision et de reproductibilité) par la méthode de l'étalonnage interne, les étalons internes (congénères marqués au C13) devront impérativement être rajoutés dans des teneurs voisines de celles des composés natifs présents dans les échantillons à doser.



**Figure 3 : Intensité du signal obtenu pour la 2,3,7,8-TCDD en fonction des quantités injectées**

Une optimisation semblable à celle effectuée pour la 2,3,7,8-TCDD a été menée pour l'ensemble des 17 congénères recherchés. Les conditions optimales sont rassemblées dans le tableau II.

En ce qui concerne la 2,3,7,8-TCDD, le mode d'injection (« *splitless* » ou « *on-column* ») n'a pas d'influence sur la sensibilité. En revanche, de façon tout à fait prévisible, l'injecteur « *on-column* » permet d'améliorer les limites de détection des composés les plus lourds, notamment les octachlorés. Avec ce type d'injecteur, on obtient les limites de détection présentées dans le tableau III.

La méthode de quantification par GC/MS/MS développée a été ensuite appliquée au dosage des 17 congénères présents dans un mélange étalon. Les

**Tableau II : Paramètres optimisés pour l'analyse par MS/MS des PCDD et PCDF**

Composés	Ion parent (m/z)	Energie de collision (V)	Ion fils (m/z)
Tétrachlorodibenzodioxines	322	1,3	259
Pentachlorodibenzodioxines	356	1,4	293
Hexachlorodibenzodioxines	390	1,5	327
Heptachlorodibenzodioxines	424	1,6	361
Octachlorodibenzodioxine	460	1,8	397
Tétrachlorodibenzofuranes	306	1,3	243
Pentachlorodibenzofuranes	340	1,4	277
Hexachlorodibenzofuranes	374	1,5	311
Heptachlorodibenzofuranes	408	1,6	345
Octachlorodibenzofurane	444	1,8	381

**Tableau III : Limites de détection pour les 17 congénères, obtenues pour la méthode de GC/MS/MS développée**

Composés	Limite de quantification (pg injecté)
2,3,7,8-TCDD	1,0
1,2,3,7,8-PeCDD	1,6
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8)HxCDD	3,0
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1,5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,5
OCDD	3,0
2,3,7,8-TCDF	0,8
1,2,3,7,8-PeCDF	4,0
2,3,4,7,8-PeCDF	3,0
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8)HxCDF	8,0
2,3,4,6,7,8-HxCDF	4,0
1,2,3,7,8,9-HxCDF	4,0
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	4,0
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	4,0
OCDF	8,0

résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV (trois solutions différentes ont été préparées et analysées séparément. Le rendement donné est la moyenne de ces trois essais avec l'écart-type obtenu).

La première phase des travaux a abouti à la mise au point d'une méthode d'analyse des PCDD et PCDF par GC/MS/MS compatible avec les exigences (en termes de sensibilité et de reproductibilité) de l'analyse d'échantillons environnementaux. Les limites de détection sont moins bonnes que celles

**Tableau IV : Rendements de quantification obtenus pour les 17 congénères dans le cas d'un mélange étalon**

Composé	Rendement de quantification
2,3,7,8-TCDD	97,6 ± 5,3
1,2,3,7,8-PeCDD	99,5 ± 3,5
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8)HxCDD	99,9 ± 1,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	101,3 ± 2,0
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	96,4 ± 6,3
OCDD	88,7 ± 8,9
2,3,7,8-TCDF	106,2 ± 3,2
1,2,3,7,8-PeCDF	96,5 ± 6,7
2,3,4,7,8-PeCDF	95,2 ± 10,9
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8)HxCDF	95,2 ± 10,9
2,3,4,6,7,8,9-HxCDF	94,2 ± 3,2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	101,8 ± 9,9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	92,6 ± 4,2
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	96,0 ± 13,9
OCDF	106,8 ± 2,7

obtenues par l'utilisation de spectromètres de masse haute résolution (tableau V). Néanmoins, l'appareillage employé est de type « benchtop » et est compatible avec une utilisation de routine.

## Protocole d'extraction et de purification

L'étape d'optimisation a abouti au développement d'un protocole de routine pour l'extraction et la purification d'échantillons environnementaux pour la détermination des PCDD et PCDF, utilisant les micro-ondes et des fractionnements par HPLC. Le protocole général est donné dans la figure 4. L'extraction assistée par micro-ondes permet de diminuer de façon notable le temps consacré aux extractions (quelques minutes contre plusieurs heures pour l'extraction Soxhlet), ainsi que le volume de solvant utilisé (quelques dizaines de ml contre plusieurs centaines de ml) (Budzinski et coll., 1995 ; Letellier et Budzinski, 1999 ; Budzinski et Thompson, 1999). Les purifications par HPLC permettent un contrôle continu de la préparation d'échantillon ainsi qu'une automatisation de celle-ci, et donc un gain de temps important ainsi qu'une meilleure reproductibilité.

Ce protocole a été appliqué dans un premier temps à la détermination des 17 PCDD/PCDF dans un échantillon du port d'Arcachon dopé en PCDD et

**Tableau V : Limites de détection des dioxines : comparaison entre les méthodes GC/MS haute résolution et GC/MS basse résolution**

Matrice	GC/MS <sup>1</sup> haute résolution				GC/MS basse résolution			
	Matrices agro-alimentaires		Sol, sédiments, boues		Matrices agro-alimentaires		Sols, sédiments	
Prise d'essai (g)	10		100		10		100	
Volume injecté (µl)	1-1,8		1-1,8		3		3	
	LOQ <sup>2</sup> pg/g	LOD <sup>3</sup> pg/g	LOQ <sup>2</sup> pg/g	LOD <sup>3</sup> pg/g	LOQ <sup>4</sup> pg/g	LOD <sup>5</sup> pg/g	LOQ <sup>4</sup> pg/g	LOD <sup>5</sup> pg/g
<b>PCDD</b>								
2,3,7,8-TCDD	0,25	0,05	0,025	0,005	0,6	0,18	0,1	0,03
1,2,3,7,8-PeCDD	1	0,2	0,1	0,02	0,8	0,2	0,1	0,03
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,25	0,25	0,125	0,025	1	0,2	0,2	0,03
1,2,3,6,7,8-HxCDD								
1,2,3,7,8,9-HxCDD								
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,25	0,25	0,125	0,025	1,4	0,4	0,2	0,07
OCDD	2,5	0,5	0,25	0,05	2	0,6	0,3	0,10
<b>PCDF</b>								
2,3,7,8-TeCDF	0,25	0,05	0,025	0,005	1	0,30	0,2	0,05
1,2,3,7,8-PeCDF	1	0,2	0,1	0,02	1	0,30	0,2	0,05
2,3,4,7,8-PeCDF								
1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,25	0,25	0,125	0,025	2	0,8	0,3	0,13
1,2,3,6,7,8-HxCDF								
2,3,4,6,7,8-HxCDF								
1,2,3,7,8,9-HxCDF								
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF								
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1,25	0,25	0,125	0,025	2	0,7	0,3	0,12
OCDF	2,5	0,5	0,25	0,05	2	0,7	0,3	0,12
Répétabilité	± 15 %		± 15 %		± 15 %		± 15 %	

<sup>1</sup>GC/MS : chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse ; <sup>2</sup>LOQ : limite de quantification (concentration à laquelle un congénère de dioxine peut être détecté par l'instrument de mesure pour un rapport signal/bruit de 25) ; <sup>3</sup>LOD : limite de détection (concentration à laquelle un analyte peut être détecté par l'instrument de mesure pour un rapport signal/bruit de 5) ; <sup>4</sup>LOQ : limite de quantification (rapport signal/bruit de 10) ; <sup>5</sup>LOD : limite de détection (rapport signal/bruit de 3)

PCDF. D'un point de vue qualitatif, les résultats se sont avérés très satisfaisants ; les profils chromatographiques sont corrects, sans composé interférent. D'un point de vue quantitatif, les rendements sont compris entre 80 % et 120 %.

Dans un deuxième temps, le protocole a été appliqué à la détermination des teneurs en PCDD et PCDF d'un sédiment certifié (sédiment DX1 vendu par Promochem, Molsheim, France). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VI (les concentrations mesurées sont la moyenne de trois réplicats indépendants donnée avec l'écart type correspondant).

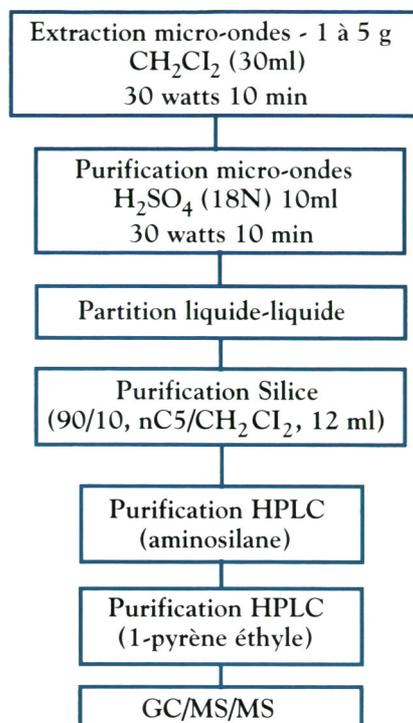


Figure 4 : Protocole développé pour l'analyse des PCDD et PCDF dans des échantillons environnementaux

Tableau VI : Concentrations certifiées et concentrations mesurées des 17 PCDD et PCDF du sédiment DX1

Composé	Concentrations certifiées	Concentrations mesurées
2,3,7,8-TCDD	263 ± 53	253 ± 46
1,2,3,7,8-PeCDD	22 ± 8	20 ± 1
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8) HxCDD	100 ± 34	99 ± 1
123789 HxCDD	53 ± 24	49 ± 5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	634 ± 182	457 ± 64
OCDD	3 932 ± 933	3 052 ± 489
2,3,7,8-TCDF	89 ± 44	117 ± 8
1,2,3,7,8-PeCDF	39 ± 14	95 ± 14
2,3,4,7,8-PeCDF	62 ± 32	63 ± 10
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8) HxCDF	830 ± 313	663 ± 33
2,3,4,6,7,8-HxCDF	57 ± 36	45 ± 5
1,2,3,7,8,9-HxCDF	28 ± 42	25 ± 1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2 397 ± 796	2 652 ± 199
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	137 ± 62	179 ± 44
OCDF	7 122 ± 2 406	5 420 ± 1 051

Les résultats obtenus sont tout à fait en accord avec les teneurs certifiées. Les concentrations mesurées sont dans la gamme de valeurs données pour les valeurs certifiées et les écart-types obtenus sont également comparables aux écart-types certifiés.

**En conclusion**, un protocole analytique rapide et fiable, utilisant l'extraction assistée par micro-ondes, des étapes de purification par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) et une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse basse résolution en mode tandem (CG/SM/SM) peut être utilisé pour l'analyse des PCDD et PCDF.

**Hélène Budzinski**

LPTC, UMR 5472 CNRS, université Bordeaux-I, Talence

**Bernard Salinière**

IEEB, 1 rue du Professeur Vèzes, Bordeaux

## BIBLIOGRAPHIE

BUDZINSKI H, PAPINEAU A, BAUMARD P, GARRIGUES P. Extraction assistée par chauffage micro-ondes focalisées (mof) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. *C R Acad Sci Paris* 1995, t. 321, série ii b, 69-76

HAYWARD D. Determination of PCDD and PCDF in milk and cheese by quadruple ion storage collision induced dissociation ms/ms. *Chemosphere* 1997, **34** : 929-939

HAYWARD D, K. 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

LETELLIER M, BUDZINSKI H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis* 1999, **27** : 259-271

PYELL U, GARRIGUES P, RAYEZ MT. Influence of shape parameters on the separation of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin isomers on reversed-phase columns. *J Chromatogr* 1993, **628** : 3-10

PYELL U, GARRIGUES P. Clean-up by high-performance liquid chromatography of PCDD and PCDF on a pyrenylethylsilica gel column. *J Chromatogr* 1994, **660** : 223-229

THOMPSON S, BUDZINSKI H. Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *Int J Environ Anal Chem* 1999, **75** : 1-12