

**Premier plan d'appui scientifique à une politique de  
développement durable (PADD I)**

*Programme "Gestion durable de la Mer du Nord"*

**Développement de méthodes d'analyse des hydrocarbures et de  
micro-polluants organiques dans le milieu marin**

**Résumé de la recherche**

Edwin De Pauw

*Laboratoire de spectrométrie de masse  
Université de Liège, B6c  
4000 Liège, Belgique*

## Introduction

Depuis quelques années, des avancées significatives ont été réalisées dans le domaine de l'analyse des dioxines. L'utilisation combinée de nouvelles techniques d'extraction [1] et de clean-up [2,3] ainsi que les derniers développements dans le domaine de la spectrométrie de masse [4] ont rendu possible le développement de stratégies intégrées. Les méthodes de référence nécessitent encore un intense travail de préparation des échantillons ainsi que des spectromètres de masse haute résolution extrêmement coûteux (HRMS) qui ne sont disponibles que dans des laboratoires très spécialisés, ce qui limite le nombre d'échantillons à étudier dans une fourchette de coût acceptable [5]. Pour être en mesure de traiter un plus grand nombre d'échantillons, il est nécessaire de simplifier les procédures (protocoles) ou de valider des méthodes alternatives. Dans ce domaine, les principaux critères sont 1) la rapidité, 2) le screening et 3) le faible coût.

Présentés comme des outils potentiels pour le screening, les essais biologiques (sur la base d'anticorps ou de réponse cellulaire) ont monopolisé l'attention au cours de ces dernières années du fait de l'émergence de toute une batterie d'immunoessais et de bioessais présentant des avantages et des inconvénients [6]. Les avantages de ces essais sont non seulement leur faible coût (généralement 5 fois meilleur marché que les HRMS classiques) mais également le fait qu'ils offrent la possibilité de traiter plusieurs échantillons en parallèle. Toutefois, étant donné que les essais peuvent être aussi activés par d'autres substances chimiques présentes dans le mélange dans une concentration souvent plus importante que celle des analytes, des étapes complémentaires de préparation des échantillons sont toujours nécessaires pour réduire les risques de faux positifs et c'est là le goulet d'étranglement de la procédure. De plus, ils entraînent de délicats échanges de solvants étant donné que les essais doivent être réalisés dans un milieu aqueux [7]. La réactivité croisée des différents congénères (sur base de la 2,3,7,8-TCDD) peut considérablement modifier les valeurs TEF. Sachant que, pour de nombreuses matrices, l'estimation définitive du TEQ repose uniquement sur la contribution relative de quelques congénères, ces disparités concernant le TEF peuvent entraîner des incertitudes quant à l'estimation du TEQ.

En ce qui concerne le développement de ces méthodes biologiques, les progrès réalisés dans le domaine des outils d'analyse physico-chimiques ont atteint un niveau digne d'intérêt [8]. Il était dès lors devenu intéressant d'évaluer leurs possibilités en termes de screening des dioxines sur base de congénères sélectionnés [9].

## Discussion

Certaines tendances se dégagent en passant en revue la littérature récente dont nous disposons au sujet de la distribution des congénères dans les matrices alimentaires et humaines. Il semblerait que, pour les centaines d'échantillons évalués, la 1,2,3,7,8-PeCDD et la 2,3,4,7,8-PeCDF contribuent majoritairement au TEQ-OMS (Tableau 1). Ces contributions relatives apparaissent de façon quasi constante pour tous les types de matrices.

Tableau 1 : Contributions relatives (%) de congénères penta sélectionnés.

Matrice	Moyenne		Somme DS	Intervalle	References
	1,2,3,7,8-PeCDD	2,3,4,7,8-PeCDF			
<b>alimentaires</b>					
Boeuf	26	45	71	3	[ 68-74 ] 10-12
Veau	39	35	74	n.a.	n.a. 10
Porc	39	36	75	11	[ 68-83 ] 10-12
Agneau	47	34	77	9	[ 71-84 ] 10,12
Cheval	29	36	65	9	[ 56-73 ] 10-12
Poulet	21	46	67	2	[ 65-69 ] 10-12
Oeufs	22	43	65	n.a.	n.a. 11
Fromag	23	50	73	n.a.	n.a. 11
Crème	62	16	78	n.a.	n.a. 12
Beurre	19	59	78	1	[ 77-78 ] 11,12
Lait	25	43	68	10	[ 51-79 ] 11-18
Crevett	13	42	55	n.a.	n.a. 12
Truite	16	41	57	n.a.	n.a. 12
Saumon	21	41	62	n.a.	n.a. 19
Maquereau	13	30	43	1	[ 42-44 ] 11,15
Hareng	28	46	74	n.a.	n.a. 15
Plie	24	49	73	n.a.	n.a. 15
Riz	26	11	37	n.a.	n.a. 20
Orge	28	19	47	n.a.	n.a. 20
Haricot	32	8	40	n.a.	n.a. 20
Epinards	36	22	58	6	[ 54-62 ] 21
<b>Humain</b>					
Sang	29	26	55	10	[ 37-70 ] 11,22-37
Lait	32	31	63	11	[ 45-78 ] 13,23,24,31,32,38

n.a. : [NDT : not applicable] Ne s'applique pas en raison du nombre limité de données disponibles sur la distribution des congénères.

Les écarts types sont relativement faibles pour tous les types de matrices, ce qui indique que ces contributions sont proportionnellement bien représentatives de la situation générale. Cette constatation entraîne différentes conséquences, 1) il est absolument nécessaire qu'un outil de screening soit en mesure de prendre en considération ces deux congénères avec le plus de précision possible, 2) ces deux congénères peuvent être utilisés comme "congénères de screening" pour effectuer un premier tri des échantillons avant de réaliser une analyse adéquate par HRMS. Etant donné que les outils biologiques offrent parfois des facteurs de réponse relative (particulièrement pour ces deux congénères) qui ne correspondent pas aux valeurs TEF-OMS [39] et que ces essais ne donnent qu'une réponse globale, il conviendrait d'utiliser un autre outil. Sachant que même pour des essais, une méthodologie adéquate de clean-up s'impose, on peut envisager d'utiliser la GC pour séparer les congénères analysés et le détecteur sensible de la MS pour le screening. De récentes améliorations apportées à la sensibilité des spectromètres de masse tandem avec stockage d'ions quadripôles (QISTMS) en font de précieux détecteurs [40,41,42]. Leur fonctionnement est simple, leur coût est raisonnable, leur limite de détection en mode de dilution isotopique est faible (picogrammes) et ils permettent d'effectuer des calculs du taux de récupération sans aucun problème de compatibilité standard. En utilisant les paramètres adéquats et après avoir limité l'essai GC dans le temps, les analyses peuvent être effectuées très rapidement. La Fig. 1 montre un exemple d'essai rapide (temps de cycle de moins de 10 min) obtenu par un spectromètre de masse de paillasse à stockage d'ions couplé à un système GC classique (A:1,2,3,7,8-PeCDF, B:2,3,4,7,8-PeCDF, C:1,2,3,7,8-PeCDD).

Afin d'éviter la production de faux-négatifs, un screening réalisé en toute sécurité utilisera la valeur moyenne de la somme des deux PeCDD/Fs comme valeur représentative de chaque type de matrice avec une certitude de 20 %. Le calcul à partir des quantités obtenues permettra d'évaluer le TEQ-OMS total et par la suite

d'effectuer l'analyse complémentaire avec l'HRMS. L'élément essentiel ici est que les échantillons qui doivent être injectés par la suite dans le

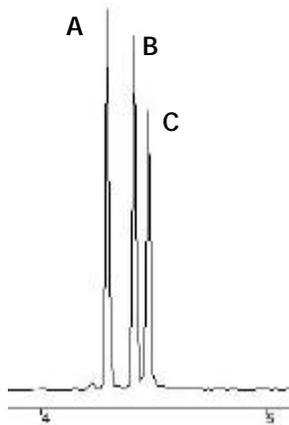


Fig. 1 : PeCDD/Fs (min)

HRMS sont déjà disponibles, et qu'ils ne nécessitent aucune préparation supplémentaire avant l'injection, ce qui améliore fortement la rapidité et le coût moyens de la procédure. Si l'on considère le contrôle global de cette méthode de screening, comme dans le cas des essais [43], une certaine quantité (10%) d'échantillons déclarés négatifs peuvent être systématiquement confirmés par le HRMS. La fiabilité de cette approche fait actuellement l'objet de recherches et il est déjà établi qu'une telle stratégie ne produirait pas plus de faux-négatifs que les autres méthodes de screening.

En plus d'un temps d'analyse GC-MS rapide, un clean-up automatisé permet de préparer en peu de temps un grand nombre d'échantillons en parallèle. Par exemple, la procédure globale concernant les échantillons de lait peut être réalisée en quelques heures pour des lots de 10 échantillons, ce qui permet également d'isoler les PCBs et les fractions de pesticides persistants.

Nous projetons d'adapter cette stratégie aux matrices marines. Le clean-up est bien évidemment l'étape clé sur laquelle nous devons concentrer tous nos efforts, étant donné que c'est cette étape qui déterminera la majeure partie du coût du screening. Une méthode alternative prometteuse est pour nous l'utilisation de cartouches en phase solide (SPE) à usage unique et pré-conditionnées qui peuvent être facilement combinées pour produire des extraits propres [44]. L'optimisation ainsi que la transposition de cette méthode vers des systèmes automatisés utilisant la nouvelle technologie 96-well SPE pour la préparation des échantillons à traitement rapide, sera ensuite aussi réellement adaptée aux bioanalyses avec micro-plaques pour le screening de nombreux échantillons en parallèle.

## Conclusions

La capacité de screening est l'un des critères les plus importants pour l'analyse de grandes quantités d'échantillons car cela permet de réduire le temps consacré au traitement des échantillons contenant des quantités d'analytes négligeables. Toutefois, étant donné que l'analyse de traces de dioxines nécessite une procédure de clean-up complexe, les outils biologiques capables de traiter un grand nombre d'échantillons ne sont actuellement pas suffisamment exploités. La production d'un tel nombre d'échantillons doit inclure des procédures simples et/ou automatisées pouvant produire ensuite des extraits présentant des niveaux de propreté compatibles avec la GC. L'approche suggérée ici repose sur le screening out des échantillons négatifs, avant que ne soit effectuée une coûteuse analyse GC-HRMS, et utilisant la quantification de congénères représentatifs sélectionnés, isolés par clean-up automatisé et analysés par FGC-QISTMS. Cette méthode offre des possibilités très diverses, les "congénères screenés" sont toujours représentatifs de différents types de contamination (la TCDD peut être ajoutée si nécessaire) et la corrélation entre leur concentration et le TEQ est plus facile à établir que dans le cas de l'analyse du marqueur des PCBs pour l'évaluation des taux de dioxine présents.

Cette stratégie peut être envisagée comme étant une méthode de screening physico-chimique "spécial dioxines" d'un bon rapport coût-efficacité complémentaire à un puissant outil biologique capable d'estimer la toxicité totale de mélanges complexes de grands nombres de différents hydrocarbures aromatiques halogénés contenus dans les échantillons.

## Remerciements

Ce travail de recherche a été soutenu financièrement par le "Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture" (F.R.I.A.) et la Région Wallonne, Administration recherche (DGTRE) et les SSTC (programme Mer du Nord).

## Références

- 1 Dean, J.R., Xiong, G., *Trends in Anal. Chem.*, **2000**, 19 (9), 553.
- 2 Turner, W.E., Isaacs, S.G., Patterson Jr., D.G. and Needham, L.L., in *Environmental Carcinogens Methods of Analysis and Exposure Measurement*, Rappe, C., Buser, H.R., Dodet, B. and O'Neill, I.K. Editors, IARC Scientific Publication Vol. 11, No. 108, Lyon **1991**, pp. 343.
- 3 Focant, J.-F., Eppe, G. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 45, 49.
- 4 Brunnée, C., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 76, 125.
- 5 Erickson, B.E., *Anal. Chem.*, **1999**, 71 (15), 541A.
- 6 Behnisch, P., Hosoe, K., Shiozaki, K. and Sakai, S.-I., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 45, 184.
- 7 Harrison, R.O. and Eduljee, G.H., *Sci. Total Environ.*, **1999**, 239, 1.
- 8 Holland, J.-F., Enke, C.G., Allison, J., Suits, J.T., Pinkston, J.D., Newcombe, B. and Watson, J.T., *Anal. Chem.*, 1983, 55, 997A.
- 9 Chen, C.-Y., Hass, J.R. and Albro, P.W., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 40, 5.
- 10 Malish, R., Gleadle, A. and Wright, C., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 43, 265.
- 11 Focant, J.-F., Eppe, G., Houziaux, J.-S., Xhrouet, C., André, J.-E., Dipede, D. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 312.
- 12 Focant, J.-F., Massart, A.-C., Eppe, G., Pirard, C., André, J.-E., Xhrouet, C. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2001**.
- 13 Focant, J.-F., Pirard, C., André, J.-E., Massart, A.-C. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2001**.
- 14 Concejero, M.A., Jimenez, B., Eljarrat, E., Rivera, J. and Gonzales, M.J., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 43, 271.
- 15 Startin, J.R., Rose, M., Wright, C., Parker, I. and Gilbert, J., *Chemosphere*, **1990**, 20 (7-9), 793.
- 16 Vartiainen, T., and Hallikainen, A., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1994**, 348, 150.
- 17 Ramos, L., Eljarrat, E., Hernandez, L.M., Alonso, L., Rivera, J. and Gonzales, M.J., *Chemosphere*, **1997**, 35 (10), 2167.
- 18 same authors than ref. 17, *Chemosphere*, **1999**, 38 (11), 2577.
- 19 Jacobs, M., Ferrario, J. and Byrne, C., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 47, 338.
- 20 Kim, Y., Young Lee, S. and Kim, M., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 47, 369.
- 21 Tsutsumi, T., Iida, T., Hori, T., Toshihiko, Y., Youichi, K., Hiroyasu, U. and Toyoda, M., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 47, 296.
- 22 Liao, P.-C., Kuei, C.-H., Chang, H.-Y. and Guo, Y.L., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 79.
- 23 Amirova, Z., Kruglov, E., Loshkina, E., Loshkina, E. and Chalilov, R., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 44, 75.
- 24 Iida, T., Hirakawa, H., Matsueda, T., Nakagawa, R., Hori, T. and Nagayama, J., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 44, 123.
- 25 Pöpke, O., Hermann, Th. and Schilling, B., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 44, 221.
- 26 Pöpke, O., *Environ. Health Perspect.*, **1996**, 106 (Suppl.2), 723.
- 27 Masuda, Y., Schechter, A. and Pöpke, O., *Chemosphere*, **1998**, 37, 1773.
- 28 Schechter, A., Grosheva, E.I., Pöpke, O., Ryan, J.J., Amirova, Z. and Silver, A., *Organohalogen Compounds*, **1999**, 44, 243.
- 29 Wittsiepe, J., Schrey, P., Ewers, U., Selenka, F. and Wilhelm, M., *Chemosphere*, **2000**, 40, 1109.
- 30 Dolgner, R., Ranft, U., Abel, J. and Vogel, C., *Organohalogen Compounds*, **1996**, 30, 77.
- 31 Schechter, A., Pöpke, O. and Fürst, P., *Organohalogen Compounds*, **1996**, 30, 57.

- 32 Schumacher, M., Granero, S., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Lindström, G. and Wingfors, H., *Organohalogen Compounds*, **1998**, 38, 191.
- 33 Schechter, A., Pöpke, O., Ball, M. and Ryan, J.J., *Chemosphere*, **1991**, 23 (11-12), 1913.
- 34 Masuda, Y., Schechter, A. and Pöpke, O., *Organohalogen Compounds*, **1996**, 30, 147.
- 35 Fujimine, Y., Hirai, T., Usuki, Y., Kodaira, T. and Watanabe, S., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 64.
- 36 Schechter, A., Rohr, W. and Pöpke, O., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 75.
- 37 Schechter, A. and Pöpke, O., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 68.
- 38 Fréry, N., Deloraine, A., Dor, F., Zeghoun, A. and Rouvière, F., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 48, 47.
- 39 Sugawara, Y., Saito, K., Ogawa, M., Kobayashi, S., Shan, G., Hammock, B.D., Nakazawa, H. and Matsuki, Y., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 45, 172.
- 40 Hayward, D.G., Hooper, K. and Andrzejewski, D., *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 212.
- 41 Eppe, G., Focant, J.-F., Pirard, C. and De Pauw, E., *Organohalogen Compounds*, **2001**.
- 42 Ragsdale, J.D. and Harvey, T.M., oral communication Pittcon **2001**.
- 43 Sherry, J.P., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1992**, 23, 217.
- 44 Chang, R.R., Jarman, W.M. and Hennings, J.A., *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2420.