


Analyse des dioxines: méthodes physico-chimiques ou « bio »

G. Eppe, J.F. Focant, C. Xhrouet, E. De Pauw

Centre d'Analyse des Résidus en Traces (C.A.R.T.)

Allée de la Chimie, B6C

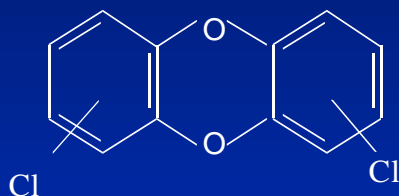
4000 Liège

 + 32 (0)4366 34 14

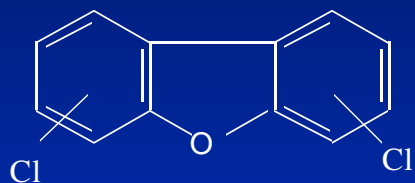
Fax +32 (0)4366 34 13

<http://www.cartulg.be>

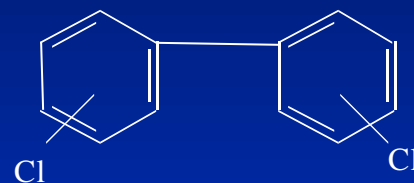
Structure générale des Dioxines, Furannes et PCBs



Dioxines
75 congénères
dont 7 en position 2,3,7,8



Furannes
135 congénères
dont 10 en position 2,3,7,8



PCBs
209 congénères
dont 13 sont ' dioxin-like '

PCDDs, PCDFs et PCBs ' Dioxin Like '

Polychlorobenzodioxines :	75 congénères	7 « toxiques »
Polychlorobenzofurannes :	135 congénères	10 « toxiques »
Polychlorobiphényles :	209 congénères	13 « dioxin-like »

Total	419	30
-------	-----	-----------



30 composés sont considérés comme
équivalents-dioxine

Facteurs d'équivalence toxique (TEF)

facteurs de pondération permettant de tenir compte des toxicités relatives par rapport à la substance la plus toxique : la 2,3,7,8-TCDD (“dioxine dite de Seveso”)

Facteurs d'équivalence Toxique PCDDs

• PCDDs, PCDFs

TEF selon WHO

2,3,7,8 TCDD	1
1,2,3,7,8 PeCDD	1
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0.1
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0.1
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0.1
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0.01
OCDD	0.0001
2,3,7,8 TCDF	0.1
1,2,3,7,8 PeCDF	0.05
2,3,4,7,8 PeCDF	0.5
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0.1
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0.1
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0.1
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0.1
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	0.01
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0.01
OCDF	0.0001

Facteurs Equivalents Toxiques PCBs

Congénère PCBs co-planaies	TEF
3,3,4,4'-TetraCB (77)	0,0001
3,3',4,4',5-PentaCB (126)	0,1
3,3',4,4',5,5'-HexaCB (169)	0,01
autres PCBs	0,0001-0,0005

Les valeurs des équivalents toxiques sont basées sur:

1° des informations concernant le **pouvoir cancérogène** chez les animaux, à long terme et chez l'homme

2° des informations, à défaut de 1°, concernant les autres effets néfastes (**reproduction, immunité**)

3° des données de **toxicité aigüe**

4° des **tests in vitro ou in vivo** (liaison à un récepteur, effets biologiques)

Peu de données existent pour chacun des congénères.
Les données existantes concernent principalement les points 3° et 4°

Calcul de la TEQ (TEQ : quantité équivalente toxique)

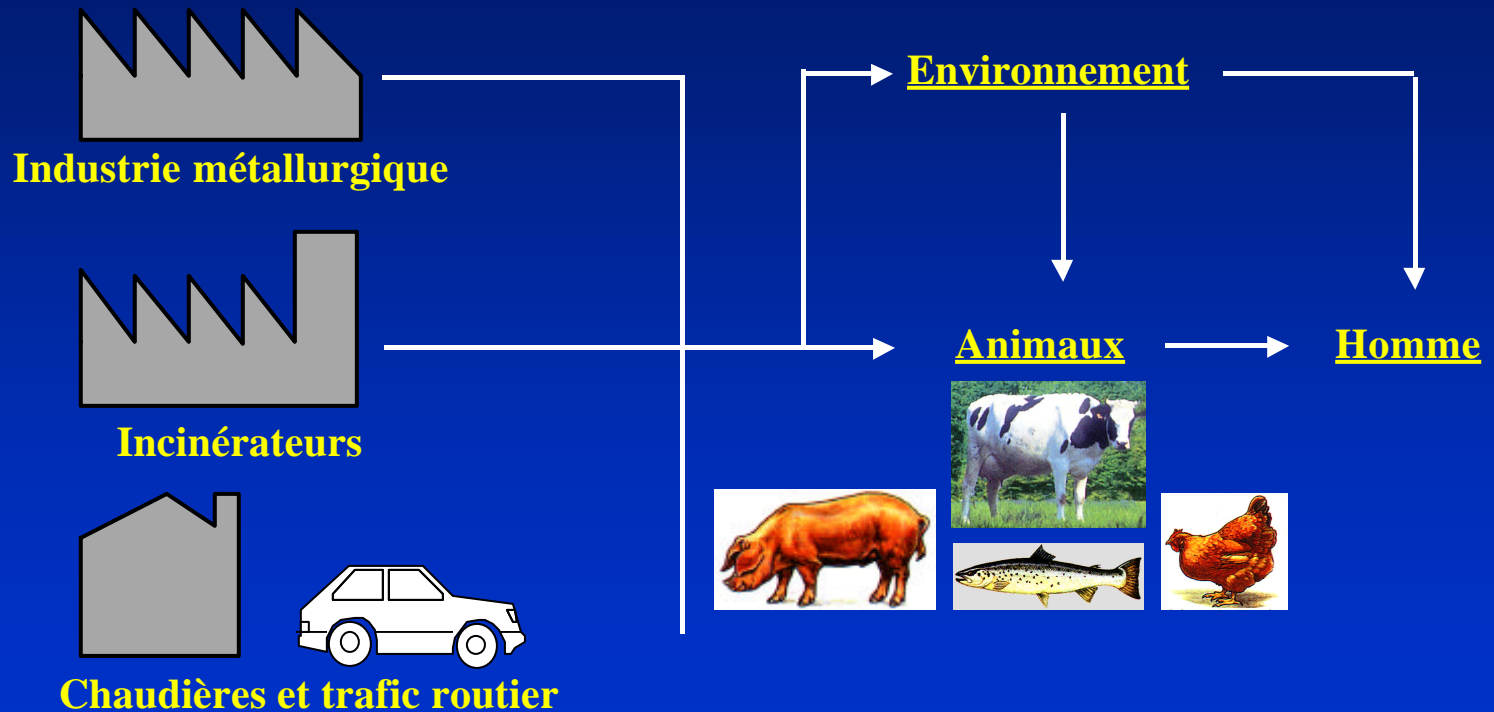
Résultats exprimés en pg de TEQ par gramme de
matière grasse

$$\text{TEQ} = \sum_{1}^{n} (\text{qté trouvée} \times \text{TEF})$$

n = nombre de congénères détectés dans
l'échantillon

LES DIOXINES

Sources et voie d'exposition



LES DIOXINES

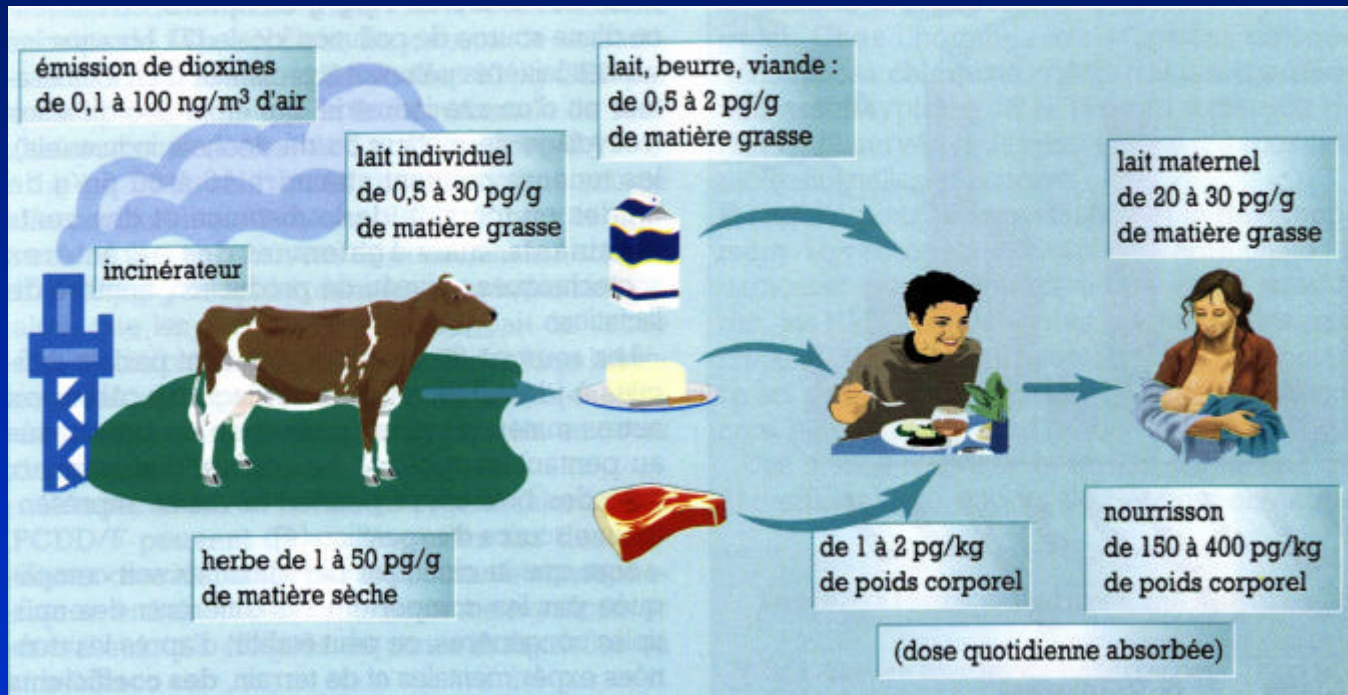
Autres sources

- Les PCBs industriels (transformateurs, fluides calorifuges et autres applications)
- Les précurseurs (polychlorophénols, herbicides chlorés...)
- Eléments par synthèse « de novo »

 PCBs oxydés introduits dans la chaîne de recyclage des graisses

 Dioxines et furannes dans les pulpes de citrus

Contamination de la chaîne alimentaire



Cas des régimes particuliers: les faroes

Exposition humaine aux dioxines

- Absorption journalière = 50 - 200 pg TEQ/jour (pour un **adulte** de 60 kg = 1-3 pg/kg/jour)
- *N.B.: si on inclut les PCBs “dioxin-like” —> 2 à 3 fois plus!*
- Absorption journalière pour **les bébés** nourris au sein : jusqu’à 2 fois plus.
- Mais : depuis fin 80, émissions réduites d’un facteur 2 sur 7 ans dans certains pays.

Absorption journalière tolérable

(selon l'OMS : Organisation Mondiale de la Santé)

- Doses sans effets chez l'animal le plus sensible (DSE) selon l'OMS :
10 - 40 pg/kg/jour
- Absorption journalière tolérable pour l'homme selon l'OMS :
1 - 4 pg/kg/jour
- mais certains effets toxiques possibles déjà à 2-6 pg/kg/jour ! —> il faut réduire l'exposition

Absorption journalière tolérable

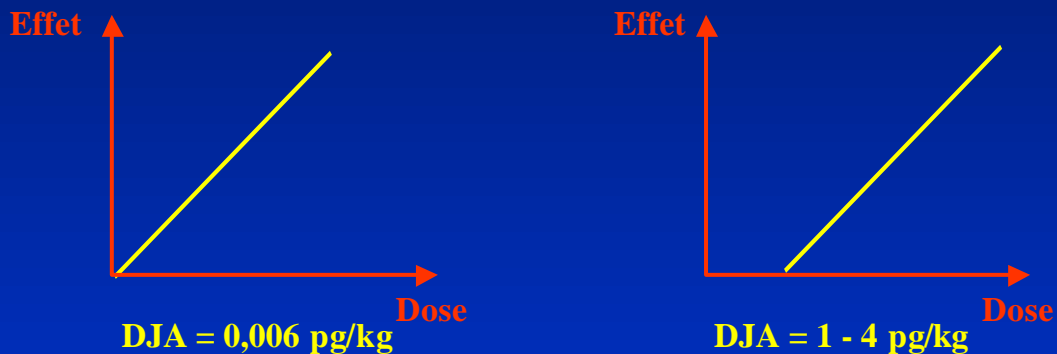
(selon l'EPA : Environment Protection Agency - USA)

0,006 pg/kg/jour

- Rappel : l'exposition est de 1-3 pg/kg/jour pour un adulte de 60 kg dans les pays industrialisés

Le problème des normes

- Sensibilité très variable entre les espèces.
- Extrapolation des effets aux faibles doses.



- Difficulté d'interpréter les données chez l'homme.
- Problème de l'intégration des PCBs ' dioxin-like ' dans les normes dioxines.

Les Normes

Type de polluant

PCDD/F= Σ des 17 congénères exprimée en équivalents toxiques de l'Organisation Mondiale de la Santé FET-OMS (1997)

Aliments pour animaux

1. Pulpe d'agrumes
2. Argiles kaolinitique
3. Matière grasse animale (> 25% de matière grasse)
4. Autre produits d'animaux terrestre (< 25% de matière grasse)

Norme

0.5 ng-TEQ/Kg
0.5 ng-TEQ/Kg
2 ng-TEQ/Kg MG
0.5 ng-TEQ/Kg

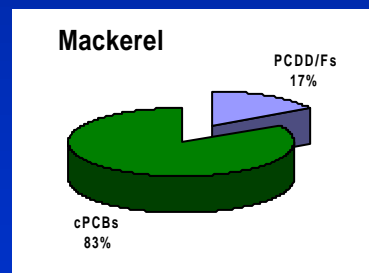
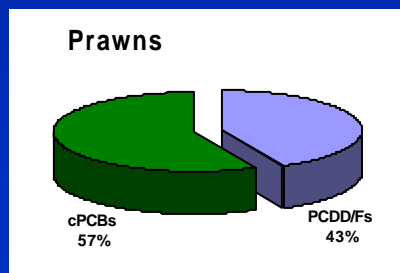
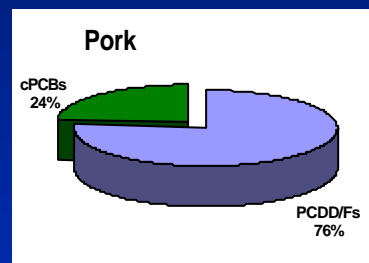
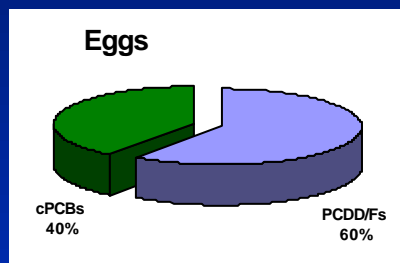
6. Poissons, autres animaux marins (<25% de matière grasse)
7. Huile végétale et sous-produits
8. Aliments pour poissons

1.5 ng-TEQ/Kg
1 ng-TEQ/Kg MG
3 ng-TEQ/Kg

Contribution des PCBs coplanaires au TEQ

Matrices	PCDD/Fs			cPCBs			n
	Mean pg TEQ/g fat	Range pg TEQ/g fat	% Total TEQ	Mean pg TEQ/g fat	Range pg TEQ/g fat	% Total TEQ	
Foodstuffs							
Pork	0,13	[0,1 - 0,2]	76	0,04	[0 - 0,1]	24	14
Bovine	1,9	[0,3- 4,1]	43	2,5	[1,3 - 6,0]	57	9
Poultry	0,3	[0,1 - 0,6]	39	0,5	[0,3 - 0,8]	61	8
Eggs	3,6	[1,2 - 7,6]	60	2,3	[0,7 -3,8]	40	3
Horse	5,8	[3,3 - 10,3]	34	11,5	[7,5 - 14,7]	66	3
Milk	1,4	[1,4 - 1,5]	46	1,7	[1,6 - 1,7]	54	4
Dairy fat	0,5	[0,3 - 0,8]	8	6,3	[3,5 - 7,7]	92	5
Cheese	1,6	[1,6 - 1,7]	50	1,6	[1,4 - 1,7]	50	3
Marine							
Sperm whale	285,9	-	44	362,9	-	56	1
Mackerel	51,6	-	17	257,3	-	83	1
Prawns	42,5	[38,1 - 45,8]	43	56,8	[48,6 - 63,2]	57	3
Human							
Serum	13,2	[5,4 - 19,7]	83	2,8	[1,2 - 4,5]	17	3

Contribution des PCBs coplanaires au TEQ



Méthodes d'analyse

- ⇒ **Méthode de référence** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRGC/HRMS)

- ⇒ **Indicateurs biologiques** :
 - Anticorps spécifiques aux PCDD/Fs (EIA)
 - CALUX
 - EROD

- ⇒ **Méthode alternative** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC/MS/MS)

Méthode de référence

⇒ HRGC/HRMS

La méthode est basée sur la haute résolution de la séparation chromatographique dite congénère spécifique

Elle basée sur la haute résolution de la détection par spectrométrie de masse pour éviter les interférences

Elle est basée pour la quantification sur la dilution isotopique: dopage par standard marqué $^{12}\text{C}^{13}$

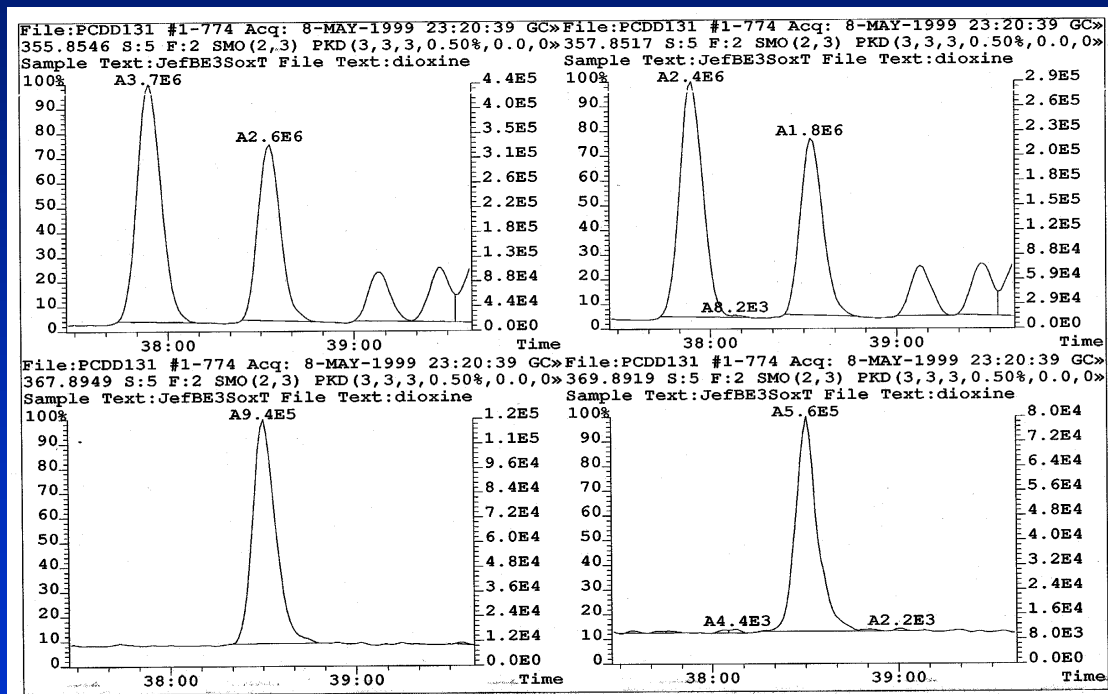
Elle est basée sur l'existence d'isotopes du chlore qui permettent la confirmation:

ê un chlore: 2 pics: 35 et 37

ê quatre chlores: 4 pics 4×35 , $3 \times 35 + 37$, $2 \times 35 + 2 \times 37$
..... 4×37

GC/HRMS

Technique de dilution isotopique pour l'identification et la quantification des PCDD/Fs



Méthodes de préparation des échantillons

Facteur de concentration très important (de 200 grs à qqes microlitres), la préparation des échantillons est donc un point essentiel

- Extraction
- Purification



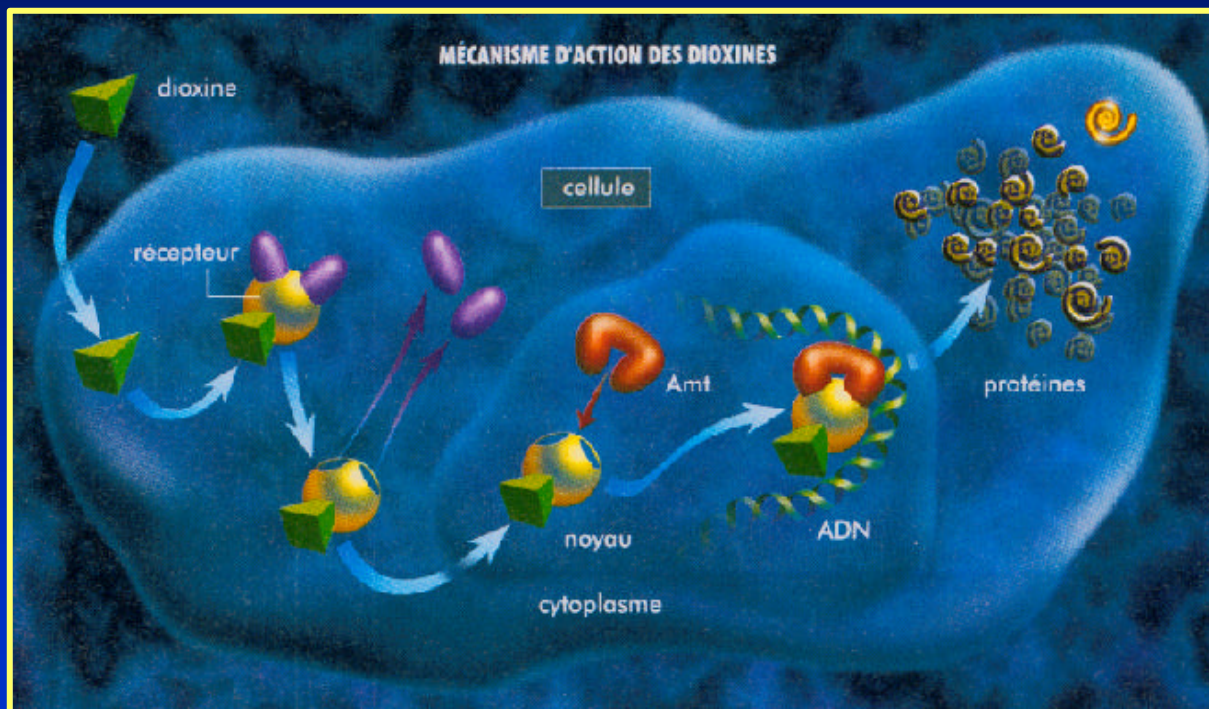
Étapes particulièrement importantes à optimiser

Pourquoi des méthodes alternatives ?

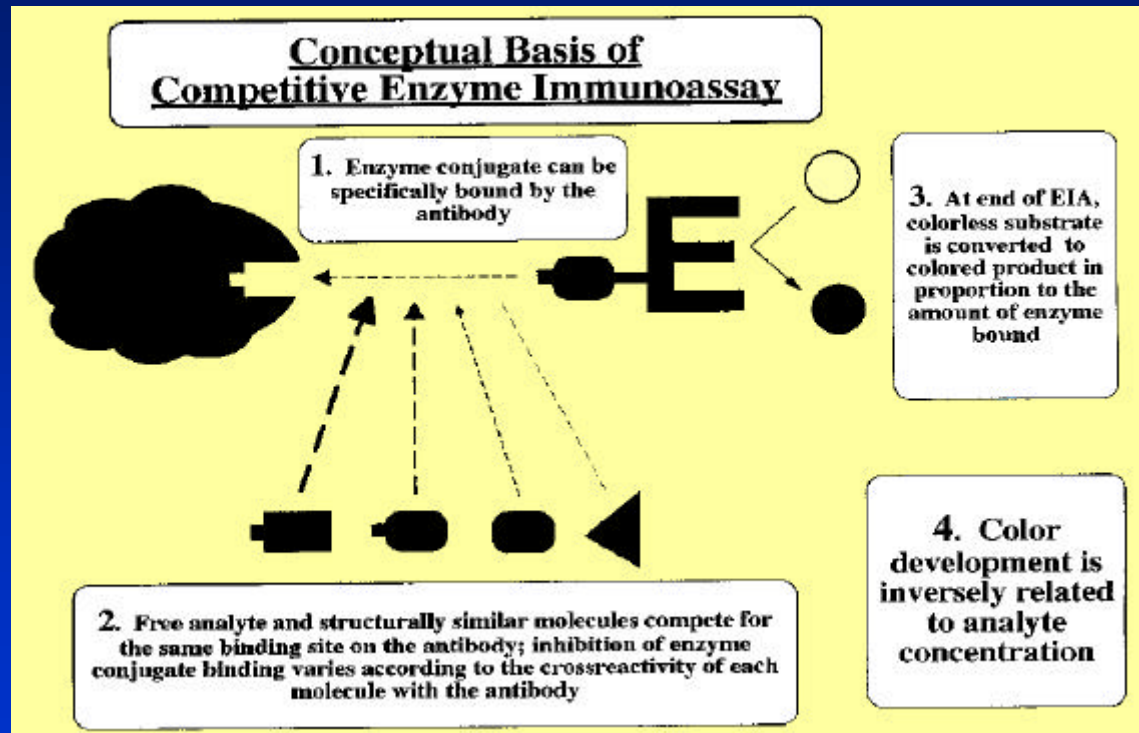
- Coût
- Difficulté de l'analyse (nombre d'échantillons, délais)
- Manque d'étendue de la plage des composés analysés

Optimisation des méthodes existantes et
développement Méthodes alternatives

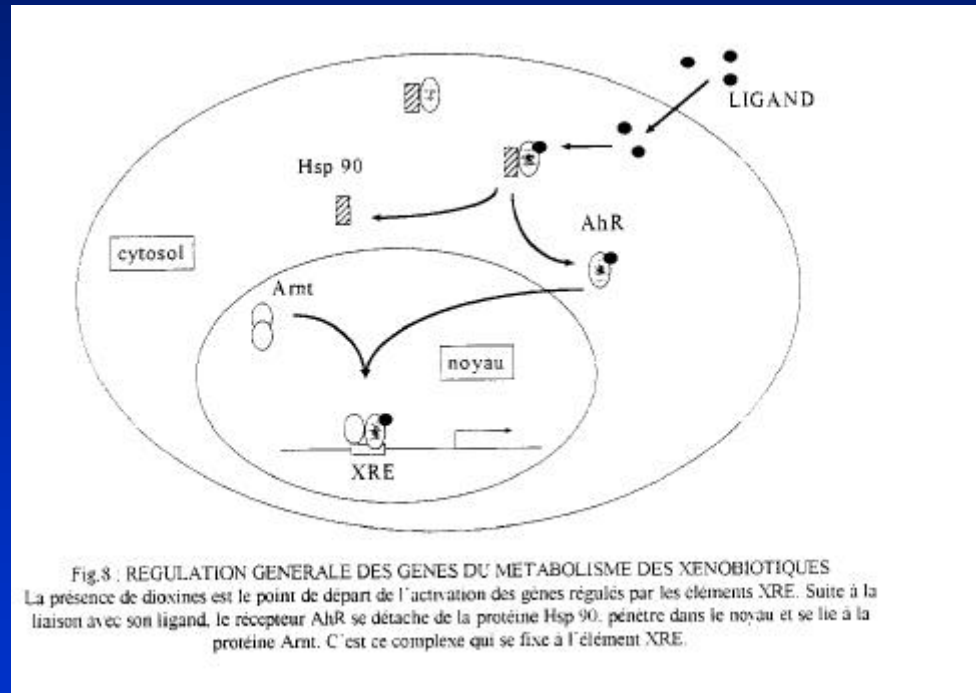
Mécanisme d'action des dioxines



Méthodes biologiques de screening (EIA)



Méthodes biologiques de screening (CALUX)



Méthode physico-chimique alternative: la MS/MS

Activation par collisions



Deux spectromètres en série ou utilisation
en série du même spectromètre

Amélioration du rapport signal sur bruit

Méthodes Alternatives: QIT MS/MS

Triple quadrupole MS/MS ??

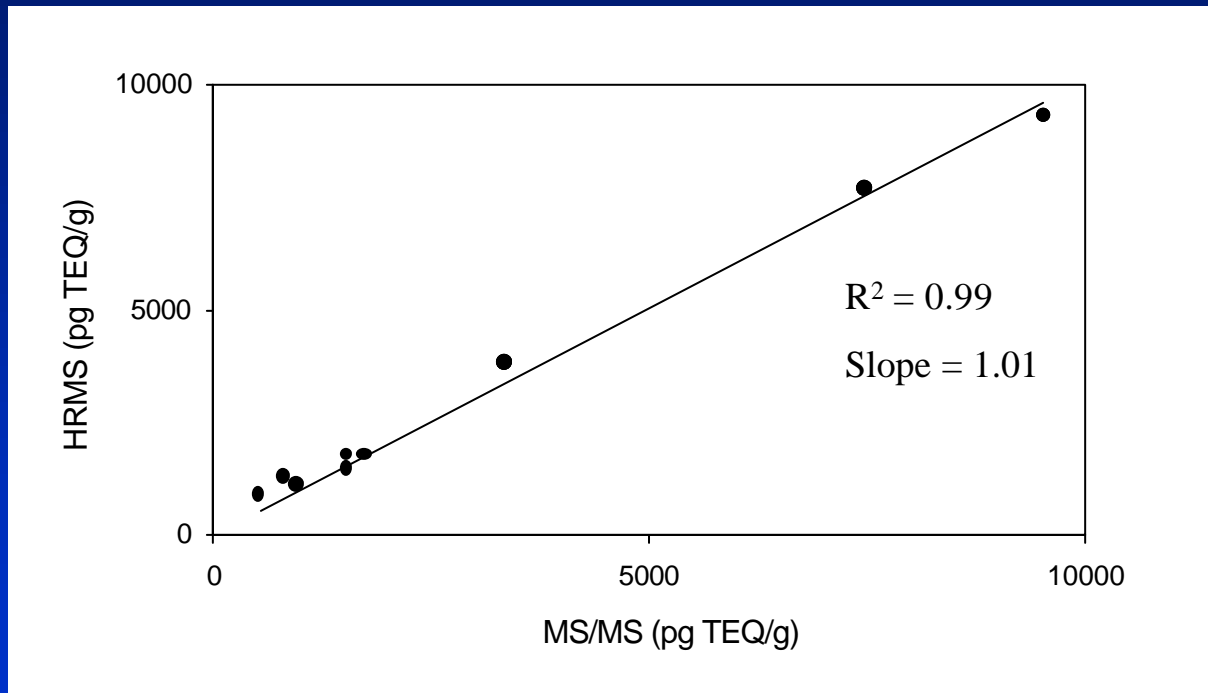
Pourquoi ?

- ⇒ Réduction du coût d'analyse
- ⇒ Appareillage moins complexe

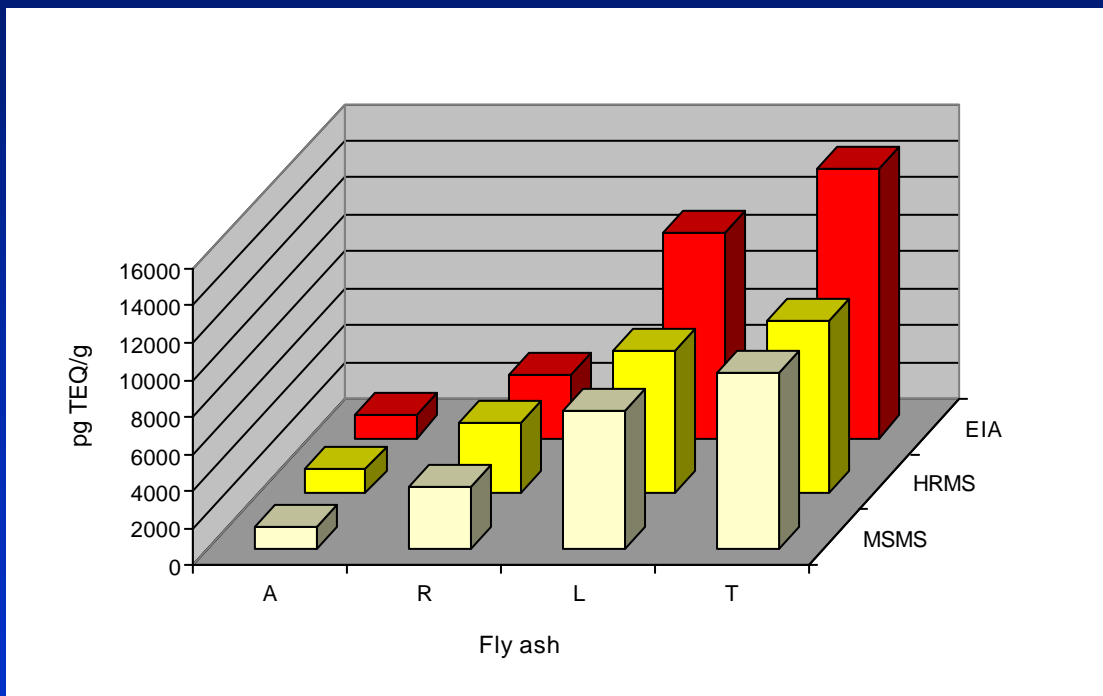
Comment ?

- ⇒ Dilution isotopique
- ⇒ Isolation des ions parents et fragmentation par CID
 - Suivi de 2 ions parents (^{12}C et ^{13}C) par MRM
 - Formation d'ions filles par perte spécifique de COCl^{\bullet}
 - Dosage effectué sur 2 ions *filles* pour les ^{12}C et les ^{13}C afin de vérifier les rapports isotopiques

Corrélation HRMS-MS/MS dans le cas d'échantillons réels de cendres



Comparaison entre MS/MS, HRMS et EIA



Résumé

- Surévaluation par les tests biochimiques
 - Faux positifs \longleftrightarrow marge de sécurité
- En cas de positifs par test biochimique, nécessité de recommencer la préparation de l'échantillon pour l'analyse par spectrométrie de masse.
- Bonne corrélation entre MS/MS-HRMS
- MS/MS peut être utilisée pour la quantification des dioxines dans les matrices « inorganiques »
- Qu'en est-il des matrices complexes ?

Utilisation de la MS/MS pour les matrices biologiques ?

- La MS/MS est la méthode accréditée (BELTEST) au CART pour l'analyse de routine des PCBs dans les denrées alimentaires.

Rem : La SM est imposée en confirmation par le Ministère de l'Agriculture pour l'analyse des PCBs dans les denrées alimentaires.

- Extension à l'analyse des dioxines ? Besoin de gain de sensibilité: efficacité de piégeage, d'activation, injection large volume ou GC rapide

Matrices complexes

- Le premier problème à résoudre dans les matrices complexes est celui de leur diversité
- Matrices grasses
- Matrices moins grasses: sang (animal et humain), lait
- Matrices non grasses: végétaux, sédiments, charges minérales...

La technique d'extraction doit être adaptée au type de matrice mais doit permettre de converger vers une même procédure de purification

Extraction

Préparation: découpe, homogénéisation, lyophilisation...

SPE

Cartouche C18
Sang, lait

ASE

Graisse à hexane
Sols, sédiments
au toluène

Soxhlet

Prélèvement, sols
au toluène
Lait en poudre au
DCM/pentane 1:1

SFE

Cendres volantes
CO₂+ toluène

Micro-ondes

Graisse, lait,
Cendres, sols

purification

Purification

- GPC ou colonne de silice haute capacité pour les échantillons de graisse
- Purification sur colonnes:
 - silice acide, neutre et basique
 - Alumine
 - Charbon actif avec reverse flow
- méthode automatisée à plusieurs échantillons en parallèle (PowerPrep™)
ou HPLC

High Capacity Disposable Silica Columns (HCDS)

Pourquoi ? : supprimer la GPC
augmenter le nombre d'échantillons
simplifier le clean-up

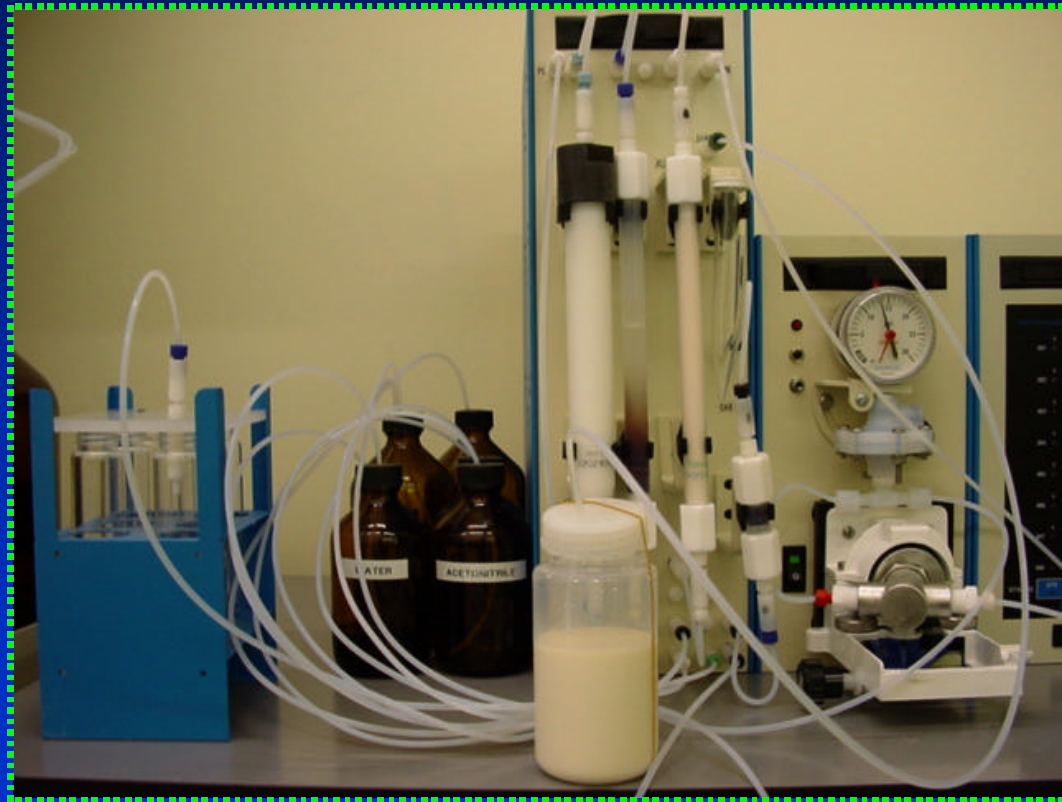
Comment ? : 28g acidic, 16g basic, 6g neutral
Disposable
Intégration dans le circuit PwP



SSTC, le 22 janvier 2002



Echantillons liquides



SSTC, le 22 janvier 2002

Séparation chromatographique

- Choix de la colonne:
 - environnement sp 23-31, 60 m
 - Matrices bio: db-5, 30 m
 - Colonnes « courtes » pour des runs de screening

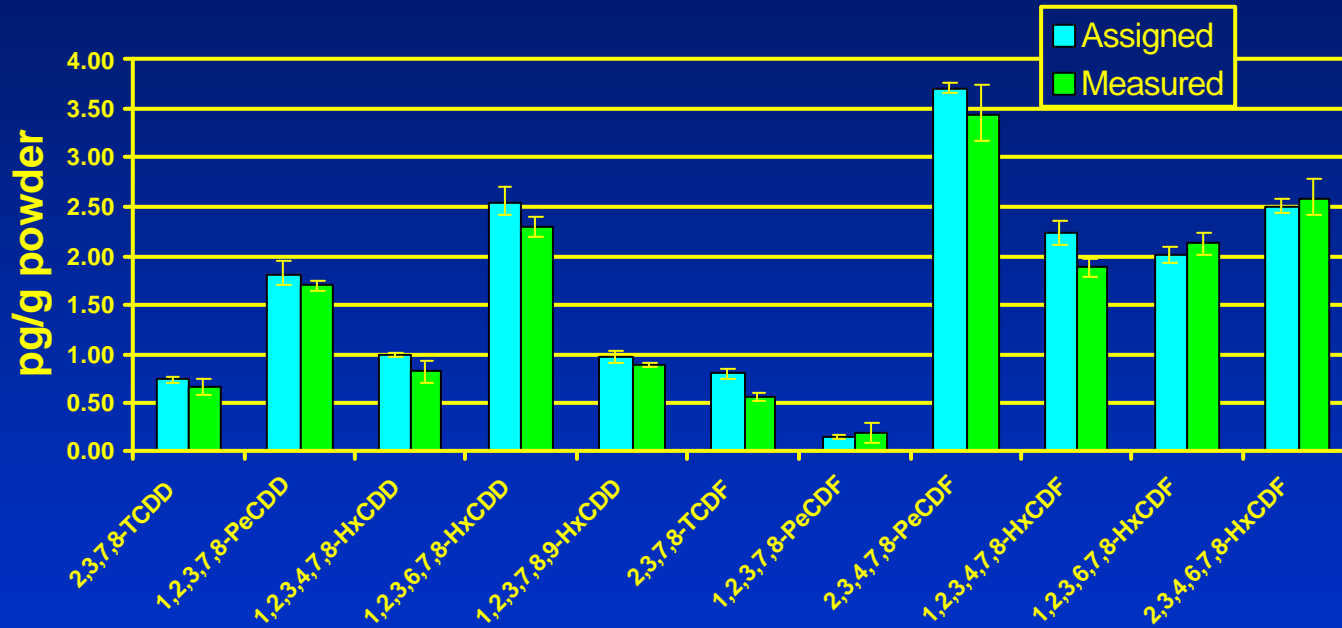
Assurance qualité

- Insertion de blancs, blancs de solvant et contrôle qualité (interne ou matériau de référence) par série de 10 échantillons
- Utilisation de standard de recovery
- Contrôle des temps de rétention
- Contrôle des abondances isotopiques
- Linéarité, facteurs de réponse (RRF)
- Ring tests

QC Chart



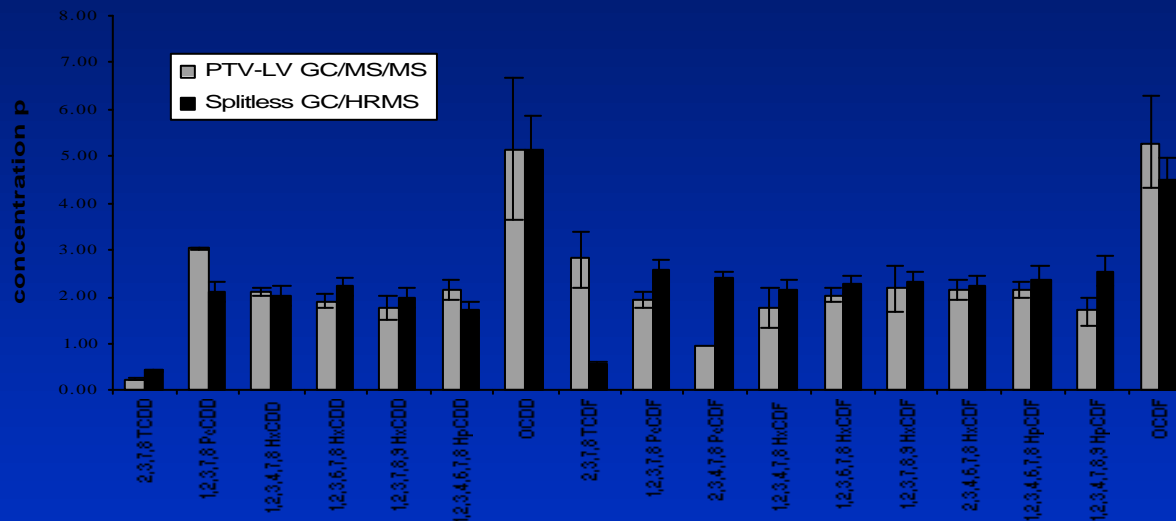
Reference Material (RM 534)



RSD ~ 5%

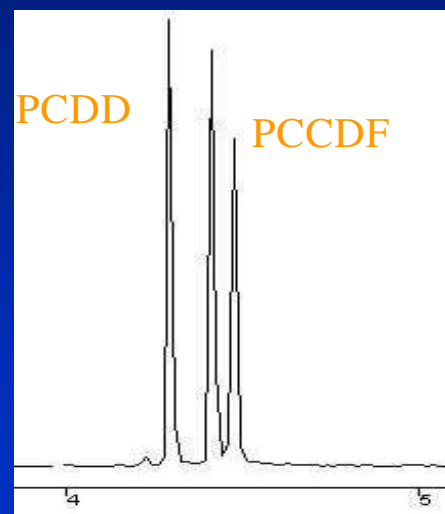
Justesse [90-110%]

Méthode alternative QITMS/MS



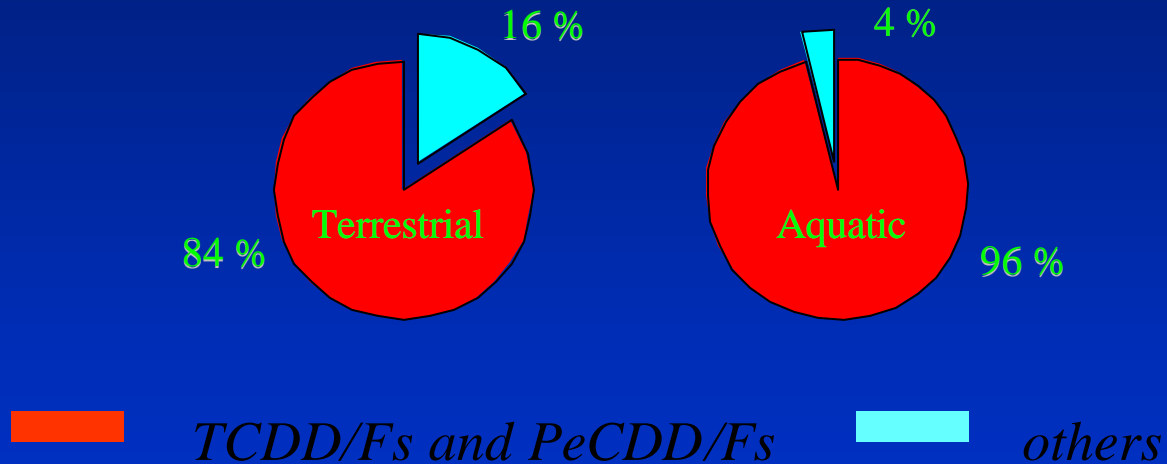
Nouvelle approche pour les dioxines et furannes

	Mean 1,2,3,7,8-PeCDD	Mean 2,3,4,7,8-PeCDF	Sum	SD	Range
Beef	26	45	71	3	[68-74]
Veal	39	35	74	n.a.	n.a.
Pork	39	36	75	11	[68-83]
Lamb	47	34	77	9	[71-84]
Horse	29	36	65	9	[56-73]
Chicken	21	46	67	2	[65-69]
eggs	22	43	65	n.a.	n.a.
cheese	23	50	73	n.a.	n.a.
Creme	62	16	78	n.a.	n.a.
Butter	19	59	78	1	[77-78]
Milk	25	43	68	10	[51-79]
Prawn	13	42	55	n.a.	n.a.
Trout	16	41	57	n.a.	n.a.
Salmon	21	41	62	n.a.	n.a.
Mackerel	13	30	43	1	[42-44]
Herring	28	46	74	n.a.	n.a.
Plaice	24	49	73	n.a.	n.a.



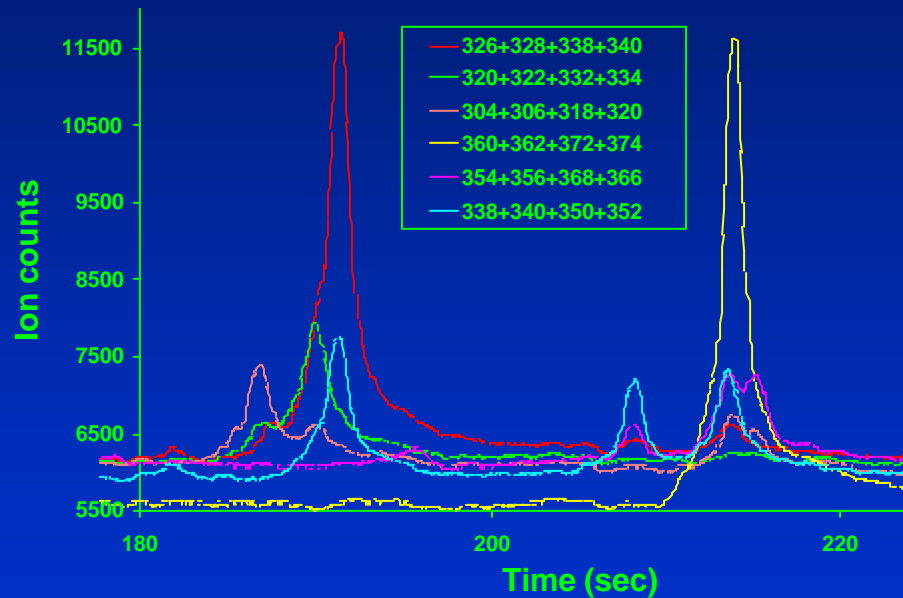
Problème des échantillons marins

Contribution au TEQ des différents congénères



Inclusion des cPCBs dans le screening

Fast GC QTOFMS



Evaluation des Tests biochimiques

- Sensibilité limite
- Clean up difficile (fonctionnent dans l'eau ou solvants polaires)
- Surtout intéressants en cas de très grandes séries à mesurer simultanément (incompatible avec 2)
- Calibration indépendante (pas de standard interne)
- Réponse en TEQ incluant tous les polluants, difficile à adapter à une modification de norme
- Pas de pattern

Mise en œuvre d'une stratégie globale



- Extraction et clean-up automatisés
- Méthode d'évaluation globale de toxicité: bioessai
- Méthode smi-quantitative (ou échantillon contaminés):QIT-MSMS
- Méthode précise: HRGC-HRMS
- **En développement: FastGCTOF**