

Analyse des dioxines par Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-HRMS, GC/MS/MS et GCxGC-TOFMS): Principes, applications et perspectives

Gauthier EPPE¹, Jean-François FOCANT¹, Catherine PIRARD¹, Céline XHROUET¹, Guy MAGHUIN-ROGISTER², Edwin DE PAUW¹

¹ Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Centre d'Analyse des Résidus en Traces (CART),
Université de Liège, Allée de la chimie, B6c, 4000 Liège, Belgium

² Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires d'Origine Animale, Centre d'Analyse des Résidus en Traces (CART),
Université de Liège, Bvd de Colonster, B43bis, 4000 Liège, Belgium

* Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Centre d'Analyse des Résidus en Traces (CART),
Université de Liège, Allée de la chimie, B6c, 4000 Liège, Belgium, Tél +32 43 66 34 22, Fax +32 43 66 43 87, G.Eppe@ulg.ac.be

Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry in the Analysis of dioxins (GC-HRMS, GC/MS/MS and GCxGC-TOFMS): Principles, applications and perspectives

Abstract

The determination of dioxins and related compounds requires a method that provides extremely high sensitivity and selectivity. The significant sensitivity improvements of sector instruments during the last two decades naturally enforced the high-resolution gas chromatography (HRGC) in combination with high-resolution mass spectrometry (HRMS) as the 'gold' standard method. In selected ion monitoring (SIM) mode, HRGC-HRMS (10,000 resolution) can achieve detection limit at the femtogram (10^{-15} g) level for most of the dioxin congeners. However, alternative techniques based on MS instruments exist. The most studied alternative method is GC coupled to bench-top low resolution quadrupole ion storage mass spectrometer (QIST-LRMS). The loss in mass resolution is counter-balanced by a gain in specificity in tandem mode (MS/MS). Emerging technique as comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS) offers series of advantages that can be used in the field of dioxin analysis. This paper explains the specificities and the pitfalls that could be met by analysts during the analytical development of these particular techniques. Sample preparation, cleanup, selection of GC columns, specific aspects of double focusing sector instruments in SIM mode, high-resolution in mass, MS/MS with ion trap instruments, comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with TOF-MS, quantification by isotope dilution technique, and future perspectives are discussed and illustrated by examples.

Keywords

Gas chromatography (GC), comprehensive two dimensional gas chromatography (GCxGC) high resolution mass spectrometry (HRMS), tandem mass spectrometry (MS/MS), time-of-flight mass spectrometry (TOFMS), polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), Isotope Dilution (ID)

Le Centre d'Analyse des Résidus en Traces

Le CART, Centre d'analyse des résidus en traces, est un centre interfacultaire de recherche de l'Université de Liège. Ce centre a été conçu en réponse aux besoins criants en analyses chimiques performantes clairement apparus en Belgique lors de la très médiatique 'crise de la dioxine' du printemps 1999. Une des motivations de création de ce centre était que les laboratoires analytiques soient mieux armés pour affronter les différentes crises qui affectent régulièrement l'image de marque des produits alimentaires, plus particulièrement d'origine animale. Dans ce contexte, cet article synthétise les travaux de recherche de ces cinq dernières années en chimie analytique des traces utilisant la spectrométrie de masse comme outil analytique pour le dosage des dioxines.

1. Les dioxines

1.1. Composition chimique

Le terme générique 'dioxines' désigne 2 familles de composés aromatiques tricycliques halogénés : les polychlorodibenzo-*para*-dioxines (PCDDs) et les polychlorodibenzofuranes (PCDFs). Les PCDDs sont constitués de deux noyaux benzéniques interconnectés par deux atomes d'oxygène tandis que les PCDFs se différencient des PCDDs par la présence d'un seul atome d'oxygène dans le cycle central (Figure 1). Le contenu en chlore de ces molécules peut varier de 1 à 8 atomes. Il existe donc un grand nombre de combinaisons différentes liées au nombre d'atomes de chlore et aux positions qu'ils occupent : 75 PCDDs et 135 PCDFs. Ils portent le nom de congénères. Parmi ces 210 molécules, seuls 17 congénères sont considérés comme toxiques. Ils sont caractérisés par un minimum de quatre atomes de chlore en position 2, 3, 7 et 8. Le plus toxique est la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxine (2,3,7,8-TCDD). Elle porte également le nom de 'dioxine de Seveso'.

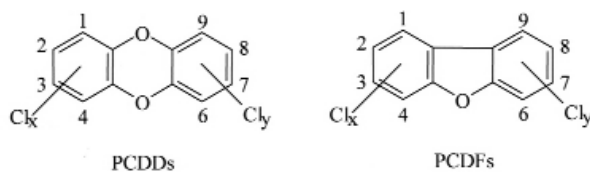


Figure 1 : Représentation de la structure chimique des composés PCDDs et PCDFs

Pour pouvoir déterminer le potentiel toxique d'un mélange de PCDD/Fs, on a introduit le concept de 'facteur d'équivalence toxique' (TEF: Toxic Equivalent Factor). Ce facteur relie la toxicité du congénère considéré à celle de la 2,3,7,8-TCDD, prise comme référence [1]. Les valeurs des TEFs pour les 17 congénères toxiques sont synthétisées dans le Tableau 1. Le potentiel toxique d'un échantillon contenant divers congénères est représenté par la concentration en 2,3,7,8-TCDD produisant le même effet toxique que la somme des congénères. Cette valeur (Toxic Equivalent ou TEQ) est obtenue en multipliant la concentration de chaque congénère présent dans l'échantillon par son facteur d'équivalence toxique correspondant et en additionnant les différentes contributions.

Tableau 1 : Facteurs d'équivalence toxique chez l'homme, établis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour les 17 PCDD/Fs

Congénères de dioxines	TEF de l'OMS	Congénères de furanes	TEF de l'OMS
2,3,7,8 TCDD	1	2,3,7,8 TCDF	0,1
1,2,3,7,8 PeCDD	1	1,2,3,7,8 PeCDF	0,05
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0,1	2,3,4,7,8 PeCDF	0,5
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0,1	1,2,3,4,7,8 HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0,1	1,2,3,6,7,8 HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0,01	1,2,3,7,8,9 HxCDF	0,1
OCDD	0,0001	2,3,4,6,7,8 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

1.2. Propriétés physico-chimiques

Comme pour n'importe quel composé, il est important de connaître pour les PCDD/Fs les propriétés physico-chimiques qui peuvent influencer leur analyse. Les PCDD/Fs sont des composés chimiquement très stables (même en milieu acide) qui se décomposent thermiquement à des températures de l'ordre de 800 à 1000°C. Ce sont des composés lipophiles, peu ou non polaires. Ils sont donc peu ou pas solubles dans l'eau et ceci se traduit par des coefficients de partage octanol-eau (K_{ow}) élevés. Le caractère lipophile de ces composés augmente avec le nombre d'atomes de chlore alors que leur volatilité, elle, décroît. De plus, ces molécules présentent une forte tendance à s'adsorber à la surface de particules solides.

1.3. Les sources d'émission

Les PCDD/Fs ne sont pas des produits de synthèse volontaire. A l'opposé des polychlorobiphényles (PCBs), ces composés

n'ont jamais présenté une quelconque utilité. Ces composés sont libérés dans l'environnement à très faibles doses à partir de divers processus anthropogéniques de combustion et en tant que produits secondaires formés lors de réactions de synthèse de produits chimiques chlorés (pentachlorophénol, chloranil, pigments textiles,...) ou lors de traitements chimiques au chlore ou aux perchlorates [2]. Les premières traces de PCDD/Fs remontent à plusieurs centaines d'années [3].

En ce qui concerne la formation de ces composés, il existe deux voies de synthèse des dioxines et furanes. D'une part, la synthèse *de novo*. Elle décrit la formation de dioxines comme étant le produit de réactions secondaires entre le carbone et l'oxygène en présence de chlore et d'un catalyseur à des températures de l'ordre de 350°C. Cette voie de synthèse concerne plus particulièrement les processus d'incinération des déchets ménagers, des déchets hospitaliers et plus généralement tous les procédés faisant intervenir une étape de combustion, tels que la production de fer et d'acier; l'incinération des déchets domestiques (surtout les matières plastiques); la combustion du mazout, du diesel, des combustibles agricoles et de l'huile de chauffage; le chauffage au bois (surtout le bois traité); la production d'électricité; la fumée du tabac; ou encore les causes naturelles, comme les feux de forêt et les éruptions volcaniques. La synthèse dite *de novo* est actuellement la principale voie de production des dioxines et furanes [4]. D'autre part, la synthèse par des précurseurs. Ainsi, le 2,4,5-trichlorophénol entrant dans la synthèse de l'herbicide à base d'acide phénoxyacétique (2,4,5-T) peut, par une réaction de condensation/cyclisation, donner naissance à la tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) [5]. De même, le pentachlorophénol, utilisé dans la conservation du bois, est à même de produire de l'octa-CDD. On peut aussi mentionner la dégradation des PCBs (Askarel, Arochlor, ...) en tant que composant des huiles de transformateurs qui par pyrolyse produit des furanes [6].

1.4. Effets connus sur la santé humaine

L'évaluation de la toxicité de ces composés n'est pas chose aisée. Il peut s'avérer être très difficile de comprendre l'apparition de divers effets. Les informations recueillies chez l'animal lors d'expositions par voie orale à de hautes doses de 2,3,7,8-TCDD indiquent que ce composé est l'un des plus toxiques que l'on peut rencontrer. Sa dose létale 50 (DL50) varie cependant considérablement suivant les espèces, allant de l'ordre de 0,6 µg/kg chez le cochon d'Inde mâle à seulement 5,051.10³ µg/kg chez le hamster mâle [7]. La 2,3,7,8-TCDD entraîne diverses réponses de l'organisme chez les animaux comme par exemple : néoplasie, immunosuppression, hépatotoxicité, dysplasie épithéliale, perturbation des organes reproducteurs, perte de poids, lésions de la peau connue sous le nom de chloracné [8]. Des effets cancérogènes importants sont déjà observés après quelques mois sur des animaux soumis à une dose journalière de 1 ng/kg de 2,3,7,8-TCDD. Une des difficultés lors des études toxicologiques réside dans le fait que, non seulement, chaque espèce ne présente pas le spectre complet de la toxicité ni même des sensibilités égales, mais en plus, divers paramètres tels l'âge, le poids, la masse grasseuse, le sexe peuvent modifier fortement les réponses au sein d'une même espèce.

En ce qui concerne l'homme, les risques posés par les dioxines restent mal définis. Les effets toxiques observés dans des populations exposées sont du chloracné et une élévation transitoire des enzymes hépatiques. Certaines études font état d'un risque augmenté de maladies cardiovasculaires, d'une modification des taux de lipides sanguins, d'un risque augmenté de diabète, de modifications de la fonction thyroïdienne, voire d'effets neurologiques ou neuropsychologiques [9]. Cependant, les résultats ne sont pas toujours cohérents entre les différentes études. De même, les données sur l'immunotoxicité, bien que nombreuses, sont contradictoires. En ce qui concerne les effets sur la reproduction et le développement, une modification du sex-ratio (prédominance des filles) et une diminution de la fertilité masculine ont été observées lors de fortes expositions. Bien que la 2,3,7,8-TCDD ait récemment été déclarée cancérigène par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) [10], aucun congénère n'est capable d'amorcer un processus de cancérisation. C'est à ce sujet que les valeurs concernant les quantités admissibles chez l'homme sans risque (NOEL – No Observed Effect Level) divergent entre d'une part l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et, d'autre part, l'USEPA (US-Environmental Protection Agency). L'OMS se base sur les valeurs les plus basses entraînant un effet cancérigène observé (LOEL – Lowest Observed Effect Level) chez le rat en y ajoutant un facteur de sécurité d'environ 200. Cela conduit à une dose hebdomadaire acceptable de 14 pg par kg de poids corporel. L'USEPA, à l'inverse de l'OMS, reconnaît la 2,3,7,8-TCDD comme étant capable à elle seule d'initier le processus de cancérisation. Ceci a pour conséquence l'absence d'un seuil de sûreté et du facteur de sécurité. L'USEPA, pour qui le risque nul n'existe qu'à quantité nulle, a donc choisi une valeur environ 1000 fois inférieure à celle de l'OMS (0,0064 pg/kg/j). Cette valeur repose sur une hypothèse souvent critiquée [11].

1.5. Dispersion dans l'environnement

La grande stabilité des dioxines et leur caractère lipophile les prédisposent à une longue persistance dans l'environnement ainsi qu'à une bioaccumulation dans les chaînes trophiques [12]. Tous les compartiments de l'environnement (masses d'air, sols, sédiments, végétaux et animaux) sont contaminés, à des degrés divers, par les dioxines. La plupart des dioxines s'introduisent dans l'environnement par l'air. Ces molécules présentes dans l'air peuvent se fixer sur de petites particules et ainsi parcourir des distances considérables dans l'atmosphère. La contamination des sols se fait essentiellement par dépôt des particules atmosphériques. La concentration en dioxines dans les sols dépend de la présence dans le voisinage de sources potentielles telles qu'un incinérateur. Les dioxines sont très persistantes dans les sols (environ 10 ans pour la 2,3,7,8-TCDD) et se concentrent dans leur partie superficielle (généralement dans les 10 cm situés au-dessous de la surface). En effet, la migration verticale des dioxines dans les sols est très faible, du fait de leur forte affinité pour les colloïdes du sol en relation avec leur coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}). Pour la même raison, le transfert du sol vers les végétaux par voie racinaire semble très limité, sauf certaines exceptions éventuelles comme les cucurbitacées. Les concentrations observées dans des échantillons de sols non conta-

minés sont de l'ordre de grandeur du picogramme (pg) TEQ/g de sol. Les teneurs en dioxines dans les sols dits industriels peuvent quant à eux atteindre des valeurs cent fois supérieures. Les différentes sources d'émission des dioxines sont caractérisées par une signature particulière. Cette signature se traduit par un profil de distribution des congénères toxiques et non toxiques tout à fait caractéristique permettant de retrouver dans la plupart des cas la source de contamination de l'environnement [13].

Un compartiment de l'environnement particulièrement riche en dioxines est représenté par les animaux. Dès lors que les dioxines se retrouvent dans les chaînes alimentaires, leurs concentrations dans les divers niveaux trophiques augmentent de façon inversement proportionnelle à la diminution des biomasses. C'est pour cette raison que nous absorbons une plus grande quantité de dioxines par les aliments que par l'air, l'eau ou le sol. En fait, nonante pour cent de l'exposition de l'homme aux dioxines se fait par l'entremise des aliments [14]. La viande, les produits laitiers et le poisson contiennent des concentrations plus élevées de dioxines que les fruits, les légumes et les céréales.

1.6. La réglementation

Les dioxines n'étant pas synthétisées intentionnellement, il n'existe donc pas, à proprement parler, de réglementation concernant leur utilisation. Les réglementations concernent d'une part les émissions de certaines sources telles que les incinérateurs de déchets ménagers et d'autre part les concentrations rencontrées dans les denrées alimentaires.

1.6.1. L'incinération

Dans les années nonante, la réglementation Européenne (94/67/CE) a fixé à 0,1 ngTEQ/Nm³ la valeur limite des dioxines émises dans l'atmosphère par les usines d'incinération de déchets ménagers. D'autres sources d'émission sont également contrôlées comme dans le domaine de la sidérurgie où des recommandations à 0,5 ngTEQ/Nm³ ont été établies. Afin de pouvoir contrôler leurs émissions, des campagnes de mesures, ponctuelles ou en continu, doivent être effectuées. Les prélèvements et les dosages s'effectuent selon les prescriptions de la norme EN 1948-1/2/3 (juin 1997). La première partie concerne les techniques à mettre en œuvre pour effectuer un prélèvement, la seconde décrit les techniques d'extraction et de purification des échantillons et la troisième partie décrit l'analyse proprement dite par chromatographie gazeuse en haute résolution couplée à la spectrométrie de masse en haute résolution (HRGC/HRMS).

1.6.2. La chaîne alimentaire

La voie principale d'exposition de l'homme à ces contaminants est liée à l'ingestion de denrées alimentaires. L'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande une dose mensuelle admissible de 70 pg TEQ/kg de poids corporel/mois. L'objectif étant, que d'ici 2006, nonante-cinq pour cent de la population Européenne se trouve en dessous de cette dose mensuelle admissible. Dans ce but, l'Europe a fixé en 2001 des teneurs maximales dans diverses denrées alimentaires (règlement 2375/2001/CE) mais également en amont de la chaîne alimentaire pour plusieurs

aliments pour animaux (directive 2001/102/CE). De nombreux programmes de surveillance dans les pays membres ont donc été lancés. Afin d'assurer une fiabilité maximale des résultats fournis par les laboratoires, des directives Européennes (2002/69/CE et 2002/70/CE), fixant des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse, ont été introduites. Celles-ci décrivent les critères d'exigences et de performances analytiques à atteindre.

2. La procédure analytique

En général, lorsque l'on parle d'analyse de dioxines, il faut distinguer les matrices environnementales des matrices biologiques. Passer de l'analyse de matrices environnementales (sols, sédiments, cendres volantes, prélèvement à l'émission) caractérisées par des niveaux assez élevés à l'analyse des denrées alimentaires ou des fluides biologiques (sérum, lait maternel) n'est pas chose aisée. On peut considérer qu'au minimum trois ordres de grandeurs séparent les niveaux de concentration entre ces deux types de matrices. Il faut donc être extrêmement prudent et vigilant lorsque l'on manipule ces deux familles d'échantillons au sein d'un même laboratoire. Il faut prendre un maximum de précautions pour éviter les contaminations croisées.

Il existe plusieurs méthodes de dosage des dioxines. On distingue la méthode dite 'de référence' des méthodes alternatives ou de dépistage. La spectrométrie de masse est connue comme étant la méthode de choix pour identifier et quantifier des PCDD/Fs à l'état de traces dans des matrices complexes. Les instruments à secteurs électrique (E) et magnétique (B) ont connu un regain d'intérêt au milieu des années quatre-vingts avec la mise au point du dosage des dioxines [15]. Ces instruments, aussi appelés spectromètres de masse à haute résolution (HRMS), sont encore, à l'heure actuelle, les seuls outils analytiques permettant à la fois une identification univoque et une mesure de 'haute qualité' de ces composés présents en traces dans des matrices complexes. Nous entendons par 'haute qualité' une méthode analytique respectant des critères de performance strictes tels que la fidélité, la justesse, l'exactitude, les seuils de détection, imposés par des directives européennes (EN 1948-1/2/3, 2002/69/CE, 2002/70/CE). Ceci ne veut pas dire que les méthodes de dépistage ne fournissent pas des résultats de qualité, mais simplement que les exigences, en terme de performances analytiques, ne sont pas les mêmes. La HRMS est considérée comme la méthode de référence et doit être utilisée comme méthode de confirmation si une méthode de dépistage détecte un échantillon non-conforme. Dans le cadre de plan de surveillance, elle est de plus en plus utilisée à cette fin car le prix à payer pour ce type de dosage est hors de portée pour des analyses de routine visant à traiter des centaines ou des milliers d'échantillons. Parmi les méthodes de dépistage, on distingue les tests biologiques des méthodes physico-chimiques. Le test biologique le plus répandu est le test CALUX (Chemical Activated Luciferase gene eXpression) [16]. Ce test fournit une réponse toxicologique globale exprimée en équivalence toxique (TEQ). Aucune information sur le profil et la répartition des différents congénères toxiques n'est disponible. Il n'est donc pas possible avec ce test de pouvoir reconnaître un profil caractéristique d'une source de contami-

nation et d'en identifier son origine. Par contre, il offre l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et de permettre le dosage d'un nombre élevé d'échantillons dans un laps de temps court. Il est donc extrêmement efficace lorsque l'on est confronté à une situation de crise où un tri rapide entre des échantillons conformes et non-conformes doit être réalisé. Parmi les méthodes physico-chimiques alternatives à la HRMS, la spectrométrie de masse basse résolution en tandem (MS/MS) est une technique attrayante et élégante qui a connu un véritable intérêt ces dernières années comme en témoigne les nombreuses publications dans des revues scientifiques [17, 18]. Plus récemment, une autre alternative à la HRMS est le couplage entre la chromatographie bidimensionnelle dite exhaustive (GCxGC) à la spectrométrie de masse à temps de vol (TOFMS) [19]. Les principes de ces trois méthodes de détection et de dosage sont décrits ci-après [20].

Préalablement au dosage des PCDD/Fs, quelle que soit la matrice et la méthode de détection, la procédure analytique comporte un tronc commun qui se décline en plusieurs étapes : la collecte de l'échantillon, l'étape de préparation à l'extraction, l'extraction, la purification et la concentration de l'extrait purifié. Etant donné les niveaux extrêmement faibles de ces composés (de l'ordre du nanogramme (10^{-9} g) au femtogramme (10^{-15} g) par gramme, selon les matrices), la quantité d'échantillon doit être prise en conséquence. Par exemple, plusieurs grammes de matière grasse sont nécessaires pour doser les PCDD/Fs dans les produits alimentaires.

2.1. Extraction

En général, l'extraction est précédée d'une préparation adaptée à la matrice de l'échantillon. Celle-ci peut comprendre, par exemple, des traitements comme le broyage et la lyophilisation pour les denrées alimentaires. L'échantillon, homogénéisé, est extrait avec un solvant organique ou un mélange de solvants organiques. Les solvants les plus souvent utilisés sont l'hexane ou un mélange d'hexane-dichlorométhane, d'hexane-acétone, d'hexane-méthanol, d'hexane-ethanol pour l'extraction quantitative à la fois des PCDD/Fs et des lipides dans les denrées alimentaires. Pour des prélèvements solides dans l'environnement (sols, sédiments cendres, boues,...), le toluène est habituellement choisi car il est le solvant le plus efficace pour l'extraction de ces contaminants fortement adsorbés sur ces matrices complexes. Le choix du solvant est important et il doit être validé pour l'extraction. Parmi les techniques d'extraction, l'extraction Soxhlet est souvent utilisée pour les matrices solides. Elle reste une technique de référence. Durant ces dernières années, d'autres techniques plus rapides et automatisables ont été développées. Citons l'extraction liquide pressurisée (PLE ou ASE), l'extraction par fluide supercritique (SFE), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) et l'extraction par support solide (SPE) [21]. A ce stade, un standard de récupération, utilisé pour mesurer la teneur en dioxine dans l'échantillon est déposé soit avant l'extraction sur la matrice pour les échantillons environnementaux soit après l'extraction sur la matière grasse pour des échantillons agroalimentaires.

2.2. Purification

A ce stade de l'analyse, les PCDD/Fs sont en solution dans un solvant ou mélange de solvants organiques ou dans de la matière grasse. La purification doit permettre l'élimination de la matière grasse ainsi que d'autres familles de contaminants susceptibles d'interférer avec la mesure des PCDD/Fs. La chromatographie d'adsorption liquide-solide basée sur l'utilisation des réactifs comme la silice (acide, base, neutre), l'alumine, le florisil et le charbon actif est largement répandue et décrite dans la littérature scientifique. Des systèmes automatisés sont disponibles commercialement depuis la fin des années nonante. Cette méthode de purification sélective permet de séparer et de collecter des fractions contenant les PCDD/Fs des autres fractions comme les PCBs. Une autre méthode de purification largement répandue est la chromatographie par perméation de gel (GPC) ou chromatographie d'exclusion. Cette technique permet de séparer les fractions lipidiques de masses moléculaires élevées, des contaminants cibles de plus faibles masses moléculaires. Cette dernière est, cependant, de moins en moins utilisée dans les laboratoires car des effets de mémoire importants (contamination croisée) entre deux échantillons consécutifs ont été observés [22].

2.3. Concentration de l'extrait

L'étape suivante consiste à évaporer le solvant organique et à concentrer l'extrait final dans quelques microlitres de nonane (par exemple 5 µL). Ce solvant est souvent utilisé pour l'injection des PCDD/Fs par les techniques dites de 'GC-MS'. Un standard interne est généralement introduit à cette étape afin de mesurer le taux de réapparition des standards marqués introduits au moment de l'étape d'extraction ou après celle-ci en fonction des matrices (paragraphe 2.1).

2.4. Séparation par chromatographie gazeuse

A ce stade, l'échantillon est purifié et un maximum d'interférences provenant de la matrice a été éliminé. Cependant, l'échantillon peut contenir les 210 congénères des PCDD/Fs ainsi que toute une série d'interférences provenant de contaminants environnementaux ayant des propriétés physico-chimiques voisines de celles des PCDD/Fs. L'objectif final est la mesure des 17 congénères toxiques et les sommes des isomères des séries homologues portant un minimum de 4 atomes de chlore dans le cas d'échantillons prélevés à l'émission.

2.4.1. La chromatographie gazeuse classique à une dimension (GC)

La chromatographie gazeuse va permettre la séparation des congénères cibles des autres congénères pouvant interférer lors de la mesure. Mais le constat est simple, il n'existe pas, à l'heure actuelle, une colonne de chromatographie permettant la séparation des 210 congénères de PCDD/Fs. Il faudrait au minimum deux colonnes de polarité différente pour pouvoir éliminer les

interférences dues aux autres congénères. Mais ce constat prévaut principalement pour les matrices environnementales (émissions, sols, boues, sédiments,...) qui contiennent un nombre élevé des différents congénères dans l'extrait final. On utilise alors une colonne avec une phase stationnaire polaire permettant une meilleure séparation des congénères tétra et penta chlorés (par exemple une phase stationnaire à base de polysiloxane substituée par des groupements de cyanopropyle). Dans le cas des échantillons biologiques, seuls les 17 congénères toxiques ne sont pas métabolisés et ils s'accumulent dans les graisses. Toutes les matrices contenant de la matière grasse sont caractérisées par ce profil et la séparation chromatographique des 17 PCDD/Fs n'est plus un problème. On utilise une colonne plus courte et une phase stationnaire non polaire (par exemple une phase stationnaire à base de polysiloxane substituée par 5% de groupement phenyls), moins efficace au niveau de la séparation des congénères tétra et penta, mais qui a l'avantage d'être liée et donc d'être beaucoup plus stable et plus robuste à haute température.

2.4.2. La chromatographie gazeuse à deux dimensions (GCxGC)

2.4.2.1. Principes

La chromatographie bidimensionnelle a été développée pour faire face aux limitations classiques rencontrées par des systèmes GC unidimensionnels (une faible capacité de pic, une gamme dynamique limitée et une spécificité restreinte) permettant ainsi d'améliorer l'efficacité globale de séparation. Elle peut se définir comme étant une technique chromatographique au cours de laquelle un échantillon est soumis à au moins deux procédés de séparation orthogonaux. L'orthogonalité étant régie par les deux règles suivantes :

- Règle d'orthogonalité : deux mécanismes de séparation différents et indépendants sont utilisés (les propriétés à la base de la rétention dans chacune des dimensions sont indépendantes)

- Règle de conservation : la séparation est structurée de telle sorte que, si deux composés sont résolus de manière adéquate dans la première dimension, ils le resteront durant l'entièreté du procédé

L'orthogonalité est observée lorsque ces deux règles sont respectées. En pratique, deux colonnes de GC classique sont connectées l'une à l'autre en série. Le choix et la combinaison des phases stationnaires sont effectués de manière à disperser au mieux les analytes dans le plan de rétention chromatographique. Par exemple, une combinaison entre une phase apolaire, permettant la séparation des composés selon leur point d'ébullition, et une phase plus polaire, permettant la séparation de ces mêmes composés selon leur polarité, est une association assez fréquemment rencontrée dans le cadre d'analyses de polluants organiques persistants (POPs).

Une autre caractéristique de la GCxGC est que la totalité de l'échantillon est soumise à l'ensemble du processus de séparation. On parle en anglais de 'comprehensive GCxGC'. La clé de cette approche est l'utilisation d'une interface appelée 'modulateur' qui est disposée entre les deux colonnes connectées en série. Ce modulateur permet d'assurer le transfert de l'échantillon de la première dimension (1D) vers la deuxième dimension (2D), tout

en respectant les règles d'orthogonalité et de conservation. L'utilisation de modulateurs cryogéniques permet de créer des pulses d'injection très fins en tête de deuxième dimension, assurant un échantillonnage rapide des composés non résolus en première dimension. L'entière du chromatogramme issu de 1D est ainsi segmentée suivant une période de modulation (P_M) de quelques secondes et envoyée à 2D pour une seconde séparation rapide. Le procédé est illustré à la Figure 2 pour deux composés X et Y qui co-éluent à la sortie de 1D à un temps de rétention (t_{R1}) défini dans la première dimension. Au fur et à mesure que la modulation s'effectue, pour P_M , des bandes étroites entrent dans 2D où les composés X et Y sont résolus et caractérisés par des temps de rétention différents ($2t_{R1}X$ et $2t_{R1}Y$).

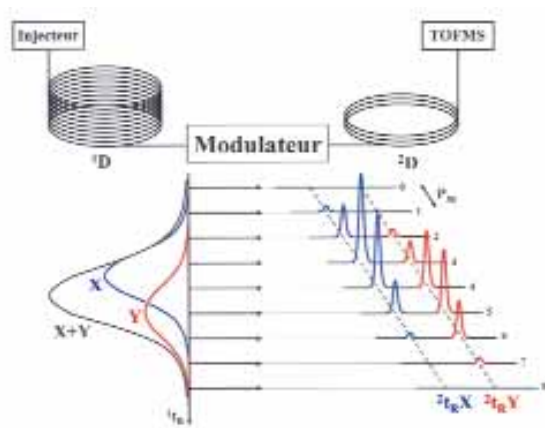


Figure 2 : Représentation schématique d'un modulateur en GCxGC (réf : J.-F. Focant, E. Reiner, K. MacPherson, J. Cochran, F. Dorman, A. Sjödin, D.G. Patterson Jr., Talanta 63 2004 1231-1240)

Il est important de remarquer que le temps total d'analyse reste inchangé par rapport à une séparation équivalente en GC classique unidimensionnelle car le processus de modulation a lieu en permanence pendant la séparation chromatographique 1D . Un signal continu est enregistré au niveau du détecteur, comme en GC classique. Ce signal est en réalité la résultante d'une succession de chromatogrammes secondaires de longueur P_M , généralement compris entre 3 et 10 sec, comme le montre la Figure 3.

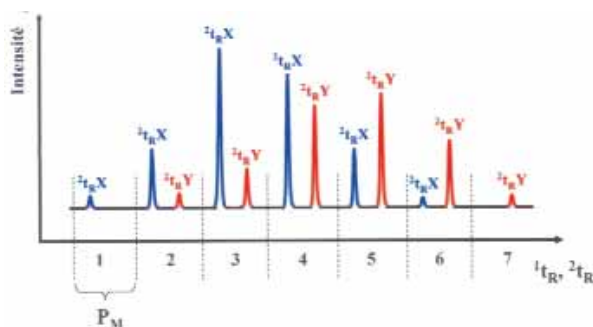


Figure 3 : Signal des données brutes enregistrées au détecteur (réf : J.-F. Focant, E. Reiner, K. MacPherson, J. Cochran, F. Dorman, A. Sjödin, D.G. Patterson Jr., Talanta 63 2004 1231-1240)

Ces chromatogrammes secondaires peuvent être recombinaés sous la forme de courbes de niveaux dans l'espace chromatographique pour décrire le profil d'élution multidimensionnel des composés séparés, comme l'illustre la Figure 4.

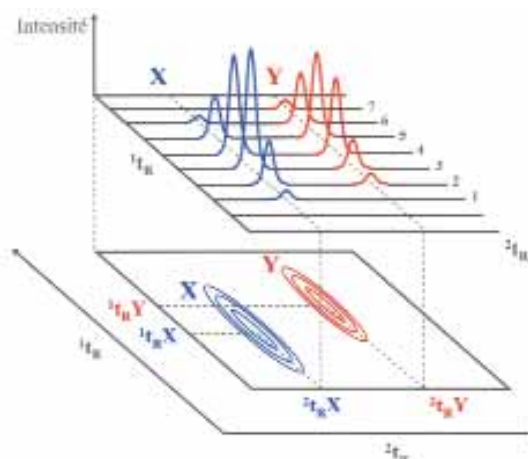


Figure 4 : Construction de la trace multidimensionnelle à partir des chromatogrammes secondaires rapides. Les lignes de contour ('contour plot') relient les signaux de même intensité (ref : J.-F. Focant, E. Reiner, K. MacPherson, J. Cochran, F. Dorman, A. Sjödin, D.G. Patterson Jr., Talanta 63 2004 1231-1240)

L'acronyme GCxGC indique que la capacité de pic dans le plan de séparation est égale au produit des capacités de pic dans chacune des dimensions et ce, lorsque tout le plan de séparation est exploitable. Cette technique ne se contente donc pas seulement de fournir une puissance de résolution remarquable, elle permet aussi la visualisation tridimensionnelle des pics, d'identifier des empreintes de mélanges complexes, d'optimiser la sélectivité par un choix adéquat du couple de colonnes analytiques et une compression de pics par re-focalisation en tête de deuxième colonne permettant une augmentation d'intensité de signal (principe de conservation des masses).

Par un choix adéquat de colonnes capillaires, cette technique va permettre de séparer les 17 congénères toxiques des autres congénères. Il serait cependant regrettable de restreindre cette approche à seulement quelques composés. Cette technique ouvre en effet les portes à du monitoring multi-résidus. On peut non seulement mesurer des dioxines mais également toutes une série d'autres familles de POPs dont notamment les PCBs, les retardateurs de flamme (polybromodiphényléthers : PBDEs), des pesticides organochlorés (OCPs),... en une seule injection. La Figure 5 illustre la séparation en 50 min de 38 PCBs, 10 PBDEs, 11 OCPs et 1 bromobiphenyl (BB) en GCxGC (DB-1 en 1D et HT-8 en 2D) dans le cadre du développement d'une méthode analytique pour des programmes de bio-surveillance humaine. La quantification pour ces 59 composés dans le sérum est réalisée avec une seule injection alors que trois injections sont nécessaires en GC unidimensionnelle.

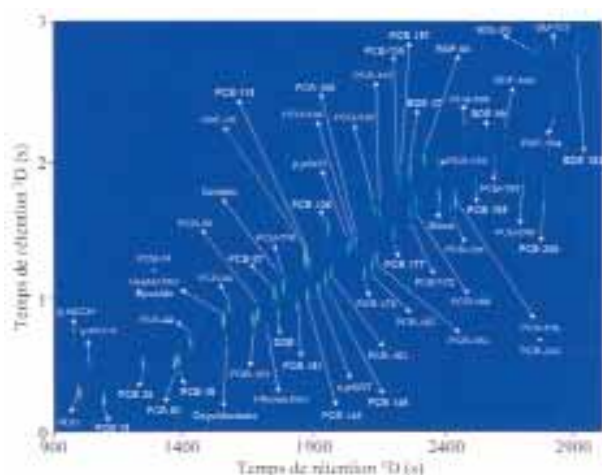


Figure 5 : Chromatogramme GCxGC-TOFMS pour un mélange de 59 composés cibles (38 PCBs + 11 OCPs + 9 PBDEs + 1 BB) mesurés dans le sérum humain. Le signal a été reconstruit en utilisant la somme de tous les ions caractéristiques (traces déconvoluées) (ref : J.-F. Focant, A. Sjödin, W.E. Turner, D.G. Patterson Jr, Anal. Chem. 2004, 76, 6313-6320)

2.5. Détection et mesure

2.5.1. Spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS)

La colonne chromatographique est directement connectée au spectromètre de masse par l'intermédiaire d'une ligne de transfert chauffée. Les congénères sortant en continu de cette colonne sont ionisés par impact d'électrons (EI) émis par un filament chauffé. Les ions sont ensuite accélérés par l'application d'une différence de potentiel à la sortie de la source. Les ions passent successivement dans un secteur électrique et magnétique (ou inversement selon la géométrie du spectromètre de masse). Les ions peuvent être séparés selon leur rapport masse sur charge (m/z) en faisant varier le champ électrique puis en gardant le champ magnétique constant. La sensibilité maximale est obtenue en EI comme méthode d'ionisation et en suivant des ions spécifiques (SIM) comme méthode de détection. Par cette technique, le spectromètre balaye rapidement la gamme de masse en passant seulement par les apex des pics d'intérêt en évitant de perdre du temps entre deux masses d'ions sélectionnés. Ainsi, le temps passé sur chaque ion cible est plus long (de l'ordre de 10 à 150 ms). Par convention, les deux ions les plus intenses du massif moléculaire sont scrutés ainsi que les deux ions de l'étalon de récupération correspondant. Pour chaque congénère toxique, il y a donc quatre ions sélectionnés et scrutés. Le nombre total d'ions s'élève à 40 pour couvrir l'ensemble des 17 PCDD/Fs (Cl_4 à Cl_8 , plusieurs congénères par degré de chloration) [23]. Ces 40 ions ne peuvent pas être mesurés en une seule fenêtre d'acquisition pour deux raisons. Premièrement, la largeur des pics de chromatographie des composés cibles varie entre 20 et 30 s en GC classique. Il est recommandé d'avoir au minimum 10 points de mesure sur un pic GC afin d'obtenir un pic Gaussien et de réduire ainsi l'erreur liée à l'intégration et à la quantification. Cependant, si 40 ions sont scrutés en mode SIM, l'intervalle de temps entre deux points de mesure est de plusieurs secondes (4 à 5 s) et ce critère ne pourra être respecté. Deuxièmement, étant donné que nous

allons devoir travailler à haute résolution en masse, cela signifie que les pics centrés sur la masse des ions cibles vont être étroits. Un réglage précis des masses est donc nécessaire. Cependant, dû au phénomène d'hystérésis des aimants, l'exactitude en masse nécessaire pour fixer la détection au sommet des pics est trop exigeante pour être compatible avec le mode de balayage rapide du champ magnétique. On préfère alors fixer l'aimant à une masse nominale de transmission et faire varier le champ électrique. En changeant simultanément le voltage d'accélération dans la source et le voltage lié à la trajectoire des ions dans l'analyseur (défocalisation), on peut ainsi effectuer un balayage dans une gamme de masse restreinte autour de la masse nominale (quelques pourcents de cette masse). Pour atteindre la gamme de masse complète allant de Cl_4 à Cl_8 , le positionnement de l'aimant est changé en cours d'acquisition afin de pouvoir couvrir les différents segments correspondants aux degrés de chloration des congénères. Pour contrôler l'exactitude des masses suivies, un produit de référence (par exemple le PFK = perfluorokérosène), dont l'ionisation par EI donne des ions d'intensité constante et proches de la gamme de masse des PCDD/Fs, est introduit en continu durant l'acquisition. Le PFK va permettre de corriger, après chaque boucle d'ions scrutés, les déviations pouvant intervenir au cours de l'acquisition. Cette méthode de balayage est la plus sensible pour l'analyse des dioxines et elle permet d'atteindre une limite de détection instrumentale de l'ordre d'une dizaine de femtomogramme injectés pour la 2,3,7,8 TCDD.

L'appareil est réglé à une résolution en masse de 10000 ($R = M/\Delta M = 10000$ à 10% de vallée). Cela signifie que l'on distingue à 10% de vallée la distribution Gaussienne centrée sur la $m/z = 300,00$ de la distribution Gaussienne centrée sur la $m/z = 299,97$ ou $m/z = 300,03$. La haute résolution va permettre d'améliorer la spécificité de la méthode en éliminant toute une série de composés susceptibles d'interférer. Dans la plupart des cas, travailler à 10000 de résolution en masse est suffisant. Cependant, malgré un nombre élevé d'étapes de purification et une séparation chromatographique à haute résolution, le risque d'interférences est toujours présent pour certaines matrices. Ces interférences sont caractérisées par des ions de rapports m/z proches et pouvant co-éluer avec les 17 congénères cibles. La Figure 6 montre plusieurs contaminants organiques qui pourraient interférer avec la 2,3,7,8 TCDD dans une gamme de masse de 0,08 dalton. Par exemple, une résolution de 18000 est nécessaire en masse pour séparer la 2,3,7,8 TCDD [$M+2$] du xanthène ou du benzylphényl'éther. Toutefois, nous avons encore un outil d'identification supplémentaire mis à notre disposition qui consiste en la vérification des rapports isotopiques du chlore. 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 la technique dite de 'dilution isotopique'. Elle consiste en l'addition d'étalons de récupération marqués au carbone 13 (^{13}C). On utilise une solution standard contenant les 17 congénères toxiques marqués au ^{13}C . L'addition de ce standard est réalisée avant l'extraction pour les échantillons environnementaux ou dans la matière grasse extraite pour les produits agroalimentaires. Ces étalons de récupérations ont la propriété de se comporter de la même façon que les PCDD/Fs natifs présents dans l'échantillon. Les taux de réapparition de ces standards ajoutés au début de la procédure analytique sont rarement de 100%.

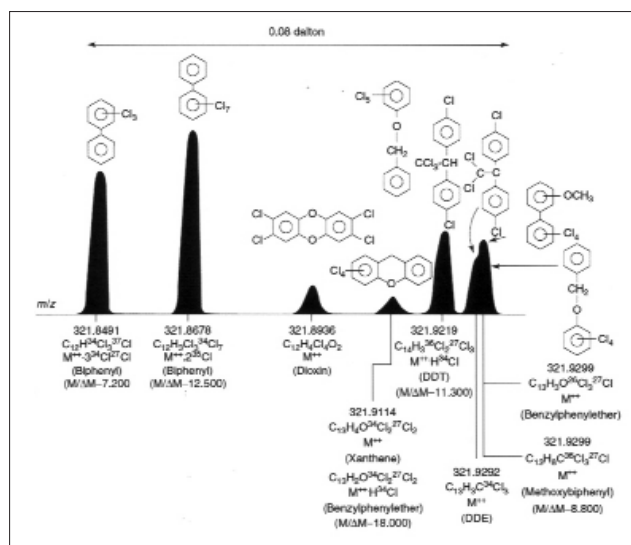


Figure 6 : Interférences possibles avec la 2,3,7,8 TCDD à m/z 322 (source Micromass)

Au cours des différentes étapes du processus analytique, on observe des pertes spécifiques mais qui n'altèrent en rien la quantification du résultat car la dilution isotopique est basée sur le postulat que l'on perd autant du composé natif que de son homologue marqué. Les normes Européennes imposent des critères d'acceptabilité des taux de réapparition (60-120%) à l'exception des congénères hepta et octa chlorés (20-150%) si leur contribution n'excède pas 10% de la valeur totale du TEQ (pour $\Sigma 17$ PCDD/Fs).

L'analyse des PCDD/Fs doit être exécutée avec le maximum de garanties à cause des faibles quantités (analyse en traces) et de la réglementation existante (à l'émission et dans les produits de la chaîne alimentaire). Il est important que les 17 congénères toxiques soient correctement identifiés. Avec ce mode de balayage en masse, l'information pertinente qui peut découler d'un spectre de masse est perdue. L'identification est donc basée sur le respect des paramètres suivants :

- Le rapport isotopique $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ des deux ions scrutés doit être égal à $\pm 15\%$ du rapport théorique
- Le temps de rétention du congénère natif doit être égal à celui de son homologue marqué dans la fourchette comprise entre 0, + 3 secondes
- Les temps de rétention des deux ions scrutés en ^{12}C et ^{13}C doivent être identiques
- Le rapport signal sur bruit doit être ≥ 3

La figure 7 représente un chromatogramme typique de la TCDD. En pratique, quatre traces de courant d'ions sont reconstruites avec les quatre ions caractéristiques du congénère (ions [M] et [M+2] en natifs et en standards marqués). Dans ce cas-ci, une cinquième trace provenant du standard interne (ajouté juste avant l'analyse en GC-HRMS et utilisé pour mesurer le taux de réapparition des standards de récupération déposés avant ou après extraction selon les matrices, paragraphe 2.3) est également scrutée dans cette fenêtre de temps. On utilise la 1,2,3,4 TCDD, dont 6 atomes de carbone sont marqués au ^{13}C . On sélectionne, parmi son massif moléculaire, l'ion [M+6] à la masse 331,9078 m/z.

Bien que ce dernier ne représente que 11% de l'ion de plus intense du massif moléculaire, ce choix n'est pas anodin. En effet, une résolution de 11400 est nécessaire pour séparer complètement l'ion de masse 331,9078 m/z de l'ion de masse 331,9368 m/z provenant du standard de récupération $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TCDD [M] (voir Figure 7). Par un choix approprié de masses sélectionnées, le standard interne assure donc deux rôles : mesurer le taux de réapparition des standards de récupération et assurer, en mode dynamique au cours de l'acquisition, que la haute résolution en masse est vérifiée. L'apparition d'un petit pic sur la trace de l'ion 330,9078 au temps de rétention du standard de récupération $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TCDD (tr : 28,97 min) provient bien de ce dernier et montre qu'à 10000 de résolution, les deux masses ne sont pas complètement résolues. L'aire de ce petit pic ne peut pas dépasser plus de 3 % de l'aire du pic $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TCDD [M], sous peine de non respect du critère.

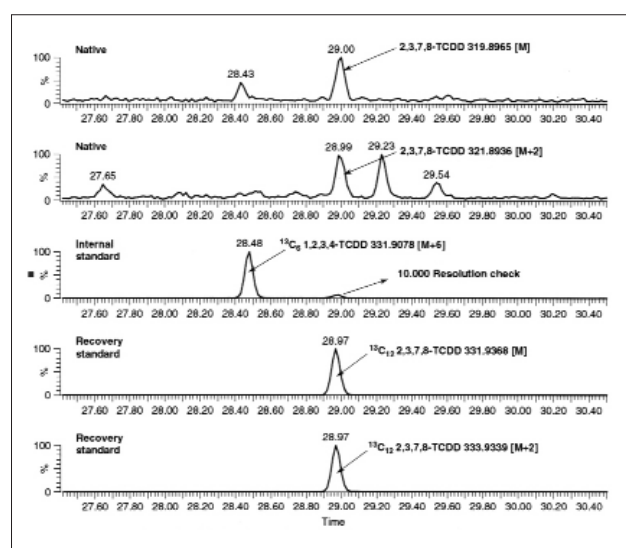


Figure 7 : La technique de dilution isotopique pour la TCDD en mode SIM, représentée par les deux ions les plus intenses du composé natif et du standard de récupération et l'ion [M+6] pour le standard interne [23]

2.5.2. Spectrométrie de masse basse résolution en tandem (GC-MS/MS)

Le développement présenté dans ce chapitre a trait à la description du couplage de la chromatographie gazeuse unidimensionnelle à la spectrométrie de masse basse résolution en mode MS/MS comme méthode d'identification et de quantification des PCDD/Fs. Cette technique peut être considérée comme une alternative à la méthode de référence GC-HRMS. Le choix de la MS/MS est lié au gain considérable de sensibilité et de spécificité que procure ce mode de balayage et que nécessite l'analyse des dioxines. Cette technique est facilement mise en œuvre avec des spectromètres de masse de 'paillasse' de type trappe à ions (GC-MS/MS). La limite de détection instrumentale de la 2,3,7,8-TCDD en mode de balayage (full scan) est de 10 pg injecté. Au niveau de la MS/MS, différents paramètres ont été optimisés de façon à maximiser la sensibilité [24] :

- La sélection de l'ion précurseur
- La fenêtre de temps d'isolement de l'ion précurseur

- L'énergie de collision (par CID : Collision Induced Dissociation)
- La pression d'hélium au sein de la trappe
- Le temps d'application de l'énergie de collision
- La valeur du paramètre de stabilité adimensionnel q_z (équation de Mathieu)

L'optimisation de ces différents paramètres a permis de descendre la limite de détection instrumentale pour la 2,3,7,8-TCDD en mode MS/MS à 0,2 pg injecté avec un rapport signal sur bruit (S/N) de 5:1 comme le montre la Figure 8. Cette valeur est cependant toujours supérieure d'un ordre de grandeur par rapport à la méthode GC-HRMS en mode SIM (0,02 pg injecté) ; ce qui limite l'utilisation de cette méthode alternative lorsque les niveaux en PCDD/Fs sont extrêmement faibles comme dans certaines denrées alimentaires ou dans des fluides biologiques. Une prise d'échantillon plus conséquente ne permet pas de compenser complètement ce manque de sensibilité car il faut que les étapes de purification en amont soient suffisamment robustes pour éliminer toutes interférences venant de la matrice.

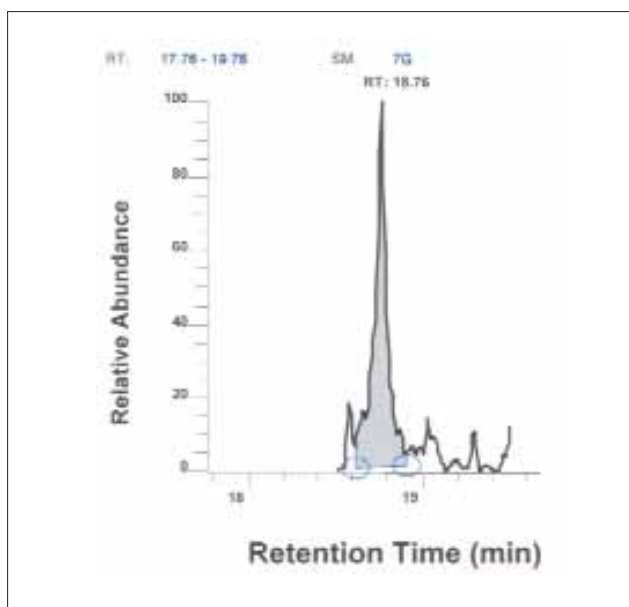


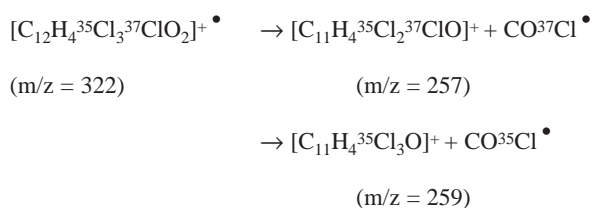
Figure 8 : Limite de détection instrumentale de 0,2 pg 2,3,7,8-TCDD (m/z : 257+259) avec un S/N \geq 5:1 par le couplage 'Programmable Temperature Vaporization-Large Volume' PTV-LV-GC/MS/MS [24]

2.5.2.1. La fragmentation caractéristique des PCDD/Fs en MS/MS par CID

La MS/MS dans une trappe à ions est caractérisée par une séquence d'événements dans le temps. Elle se déroule en quatre étapes distinctes : l'ionisation de l'ion précurseur, l'isolement de l'ion précurseur, la fragmentation de l'ion précurseur conduisant à la formation d'ions produits et pour terminer le balayage des ions produits. L'ion précurseur choisi pour effectuer l'analyse en mode MS/MS est l'ion majoritaire (par exemple $[M+2]$ pour la 2,3,7,8-TCDD, 322 m/z). Ce type de spectromètre de masse basse résolution est caractérisé par une résolution en masse permettant de distinguer une unité de rapport m/z (par exemple on distingue l'ion 322 m/z de l'ion 323 m/z). Hors la Figure 6 montre claire-

ment un nombre considérable d'interférences avec la 2,3,7,8-TCDD au voisinage de la masse 322 m/z . Ce manque de spécificité en mode de balayage 'full scan' va être composé par la MS/MS. Les dioxines et les furanes vont se dissocier par collision induite avec l'hélium dans la trappe et produire plusieurs ions fragments caractéristiques résultants de la perte de Cl^\bullet , $COCl^\bullet$, $2COCl^\bullet$ pour les dioxines et Cl^\bullet , $COCl^\bullet$, $COCl_2^\bullet$ et $COCl_3^\bullet$ pour les furanes. Cependant, l'ion fragment le plus intense est celui caractérisé par la perte de $COCl^\bullet$ (perte neutre de 63 m/z) à la fois pour les dioxines et les furanes comme le montre la Figure 9.

Congénère TCDD natif



Congénère TCDD marqué au ^{13}C

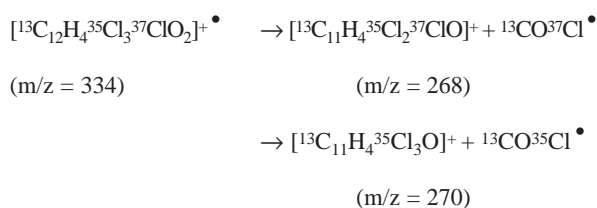


Figure 9 : Fragmentation caractéristique par CID dans une trappe à ions en mode MS/MS pour la TCDD native et marquée $^{13}C_{12}$.

Cette perte de $COCl^\bullet$ propre aux PCDD/Fs va permettre en scrutant les fragments produits en mode MS/MS d'éliminer bon nombre d'interférences ayant, dans l'exemple qui nous préoccupe, une masse voisine de 322 m/z (TCDD). De par leurs structures chimiques, il y a peu de chance que ces interférences à la masse 322 m/z soient caractérisées par cette perte de 63 m/z . Ainsi, cette technique va permettre de compenser le manque de spécificité en résolution de ces appareils de type 'paillasse' par le suivi d'ions caractéristiques provenant de la MS/MS.

2.5.2.2. La technique de dilution isotopique en MS/MS

La spécificité de cette technique va encore être rehaussée par l'utilisation de la technique dite de 'dilution isotopique' pour ce mode de balayage. Son principe est exactement le même que celui décrit en GC-HRMS à savoir qu'au lieu de scruter les deux ions les plus intenses du massif moléculaire à 10000 de résolution en mode SIM, les deux ions produits $[M+2-CO^{35}Cl^\bullet]$ et $[M+2-CO^{37}Cl^\bullet]$ ainsi que leurs homologues en standards marqués sont suivis pendant un laps de temps déterminé (voir Figure 9 dans le cas de la TCDD). C'est ce que l'on appelle en anglais du 'multiple reaction monitoring' (MRM). Dans une fenêtre de temps, l'instrument balaye alternativement l'ion précurseur natif et son homologue marqué (par exemple 322 m/z et 334 m/z , Figure 9). La spécifici-

té de la technique est obtenue par le suivi des 4 ions produits caractéristiques (257 m/z, 259 m/z, 268 m/z et 270 m/z, Figure 9) ainsi que par la vérification de leurs rapports isotopiques. Cependant, les rapports isotopiques des ions produits ne vérifient pas l'abondance naturelle du n-1 Chlore. Dans le cas de la TCDD, l'ion précurseur sélectionné est l'ion le plus intense [M+2] à la masse 322 m/z de la distribution isotopique de quatre Cl. Cela signifie qu'il contient trois ^{35}Cl et un ^{37}Cl . En perdant COCl^{\bullet} , il y a une chance sur quatre de perdre $\text{CO}^{37}\text{Cl}^{\bullet}$ et il y a trois chances sur quatre de perdre $\text{CO}^{35}\text{Cl}^{\bullet}$. Ainsi le rapport isotopique des ions produits (257/259) provenant de l'ion précurseur 322 m/z est de 0,33. Le Tableau 2 résume les conditions opératoires pour la 2,3,7,8 TCDD.

Tableau 2 : Paramètres principaux optimisés en MS/MS pour l'analyse de la 2,3,7,8-TCDD

Composés	Fenêtre (min)	Ions précurseurs	CID (V)	Temps de Collision (ms)	Valeur q_z	Ions produits	Rapports isotopiques
2,3,7,8 TCDD	21.4-21.95	322 [M+2]	5	30	0.45	257/259	0.33
2,3,7,8 TCDD $^{13}\text{C}_{12}$		334 [M+2]	5	30	0.45	268/270	0.33

Les rapports isotopiques d'ions produits en MS/MS pour les autres congénères allant de quatre à huit chlores sont calculés de la même façon.

2.5.3. Avantages du TOFMS et du couplage GCxGC-TOFMS pour l'analyse des dioxines

Un des nombreux avantages d'un spectromètre de masse à temps de vol (TOFMS) est sa vitesse de balayage. La prise d'un spectre de masse est de l'ordre de la ms et il en fait un détecteur de choix pour un couplage avec la GCxGC. Nous avons vu en effet au paragraphe 2.4.2 que la largeur des pics GC sortant de la deuxième colonne analytique est de l'ordre de 100 ms. Le TOFMS utilisé comme détecteur va donc permettre d'enregistrer suffisamment de spectres de masse pendant ce laps de temps pour pouvoir reconstruire une trace de courant d'ion avec les ions caractéristiques d'une molécule recherchée. Une vitesse de balayage élevée en tant que telle n'est pas le seul avantage du TOFMS comme détecteur en GCxGC. Le TOFMS, dont la séparation des ions en masse repose sur leur temps t pour parcourir une distance d dans un tube sous vide, permet de collecter tous les ions produits qui arrivent au détecteur. A l'opposé des techniques SIM et MS/MS où l'information spectrale est perdue, le TOFMS fournit un spectre de masse complet permettant de reconstruire des courants d'ions sur base de toutes les masses présentes dans la gamme collectée. Par des algorithmes de déconvolution des spectres de masse d'entités non résolues en GCxGC, le couplage avec un TOFMS ouvre la porte à une troisième dimension de séparation si bien sûr les composés non résolus ont des masses différentes ou des rapports d'intensité des ions caractéristiques différents. Les potentialités d'un système tridimensionnel GCxGC-TOFMS basé sur des propriétés orthogonales de volatilité, polarité et de masse sont donc très vastes. La spécificité du couplage en fait une technique de choix pour résoudre des problèmes analytiques complexes.

D'un point de vue sensibilité, Le TOFMS est moins sensible que les spectromètres de masse préalablement cités. Cependant, le gain considérable de sensibilité obtenu par la GCxGC en comparaison de la GC classique (rapport S/N augmenté) permet au couplage GCxGC-TOFM le dosage des polluants organiques persistants comme les PCBs, les pesticides organochlorés de manière fiable. La situation concernant les PCDD/Fs est un peu différente. En effet, ces derniers sont présents à des concentrations beaucoup plus faibles et proches de la limite de détection instrumentale. La mise au point et l'optimisation de la méthode GCxGC-TOFMS a permis de descendre la LOD instrumentale à 0,5 pg injecté pour la TCDD. Notons que cette valeur est voisine de celle obtenue par la méthode GC-MS/MS. Le dosage des PCDD/Fs à faible concentration dans matrices biologiques à tendance à augmenter la fidélité (augmentation des coefficients de variation) de cette méthode mais également le temps requis pour le traitement des données.

2.5.3.1. Approche quantitative par GCxGC-TOFMS pour l'analyse des dioxines

Comme pour les deux techniques précédentes, la GCxGC-TOFMS peut être utilisée en dilution isotopique à des fins de quantification. Cependant, alors qu'en GC classique un composé correspond à un pic chromatographique, nous avons vu que plusieurs pics secondaires correspondent à un seul et même composé en GCxGC (Figure 2 et 3). Dans ce cas, la quantification se fait par intégration des aires de tous les pics appartenant à un même groupe aussi bien pour les natifs que pour les standards marqués. A la Figure 3, si on se focalise sur X et que l'on utilise la technique de 'dilution isotopique', la caractéristique de ce standard de récupération est d'avoir des t_R identiques à X dans les deux dimensions. Connaissant les masses caractéristiques de chacun, il est possible sur base des spectres de masse collectés à chaque balayage, de reconstruire deux traces chromatographiques différentes, l'une basée sur les masses du composé X, l'autre sur celle de son standard marqué. La Figure 10 illustre ce principe pour la 2,3,7,8 TCDD en utilisant les deux ions les plus intenses de leur spectre de masse respectif (320 et 322 m/z pour le natif ; 332 et 334 m/z pour son homologue marqué au ^{13}C). On peut apprécier ici l'importance de la vitesse de balayage en MS et donc du nombre de points disponibles pour reconstruire des pics chromatographiques aussi étroits. Les rapports d'aires pour chaque pic secondaire sont ainsi calculés. On fait ensuite une moyenne des rapports des pics secondaires et ce rapport moyen, connaissant la concentration en standard marqué, permet de quantifier la présence du composé natif.

On remarque également qu'en plus des temps de rétention indépendants dans les deux dimensions en GCxGC, le spectre de masse en TOFMS, les rapports isotopiques des chlores peuvent être vérifiés pour une identification univoque du composé cible. A la Figure 10, les rapports d'intensité des ions 320 et 322 m/z ainsi que leurs homologues marqués 332 et 334 m/z pour la TCDD peuvent être calculés et comparés aux rapports isotopiques théoriques.

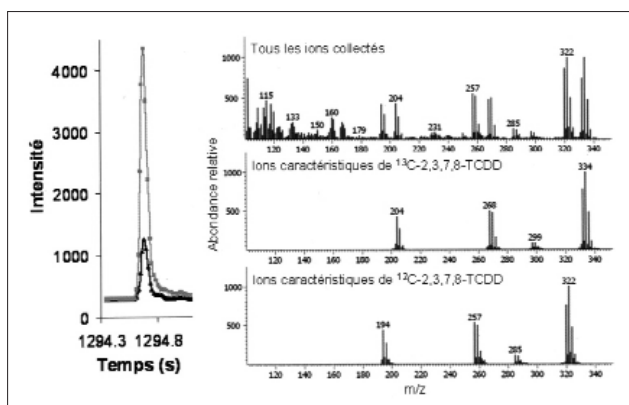


Figure 10 : Constructions des pics chromatographiques sur base des données spectrales. Pour chaque balayage en masse (correspondant aux points dans les pics chromatographiques), l'utilisation des ions caractéristiques des natifs et des standards marqués et la sommation de leurs intensités relatives permettent de reconstruire deux signaux différents. En gris, le signal reconstruit sur les masses de ^{13}C 2,3,7,8 TCDD, en noir le signal reconstruit sur les masses de ^{12}C 2,3,7,8 TCDD. A droite, les spectres de masses correspondants. (ref : J-F Focant, ERS 2006, en cours de publication).

2.6. Les avancées récentes et les perspectives

La GC-HRMS est une technique analytique qui est arrivée à maturité pour l'analyse des traces organiques. L'ensemble des connaissances acquises au cours de ces vingt dernières années et l'utilisation intensive de la technique pour le dosage des dioxines en fait une des méthodes analytiques les plus décrites dans la littérature. Elle restera certainement la méthode de référence dans ce domaine. La mise au point des deux méthodes alternatives à la GC-HRMS a montré que l'on pouvait atteindre des performances analytiques qui rencontrent les exigences des normes européennes [25]. Elles doivent être vues comme des techniques alternatives et non comme des méthodes de dépistage car il n'y a ni gain de temps ni gain de coût significatif à utiliser ces approches. Cependant, un des défis majeur pour les chimistes analytiques travaillant dans le domaine des contaminants en traces est de faire face à une tendance qui se généralise de plus en plus ces dernières années et qui consiste à augmenter le nombre de composés entrant dans les plans de surveillance aussi bien dans le domaine de l'environnement, du contrôle de la chaîne alimentaire que de la bio-surveillance humaine. Le mode de balayage SIM en HRMS montre ses limitations dans ce cas précis étant donné le nombre limité d'ions qui peuvent être scrutés en même temps. Les tests biologiques peuvent apporter une réponse à ces problèmes en fournissant une mesure globale de la toxicité de l'échantillon en unité TEQ sans se soucier du dosage spécifique des congénères. Cependant beaucoup de composés peuvent interférer avec l'activité biologique du test et des divergences importantes en comparaison avec les techniques MS peuvent apparaître lors des dosages. Le rôle de ces tests se cantonne alors à une approche de dépistage. Cette stratégie permet de cribler les échantillons et de confirmer seulement les échantillons positifs et aléatoirement un certain nombre d'échantillons négatifs. Pour répondre à cette problématique, la GCxGC-TOFMS est probablement la technique émergente

permettant d'offrir non seulement la possibilité d'identifier et de quantifier des composés cibles mais également de scruter et de rechercher des composés non ciblés. La GCxGC permet d'identifier des profils d'élution, des profils caractéristiques liés à des sources de contamination ou des matrices particulières. On peut ainsi établir des cartographies. Grâce à un TOFMS comme détecteur, toutes les informations spectrales sont disponibles pendant la durée de l'analyse et un traitement des données peut être réalisé a posteriori. Le prix à payer étant la gestion de fichiers de très grandes tailles pour l'exploitation des données brutes.

Le deuxième problème majeur auquel est confronté l'analyste est le niveau de contamination sans cesse décroissant observé maintenant depuis plusieurs années pour ces composés. Le niveau de bruit de fond des dioxines dans les denrées alimentaires et le sérum humain a diminué à un tel point que la mesure devient extrêmement difficile. Augmenter la taille de l'échantillon pour résoudre ce problème n'est certainement pas la direction à suivre étant donné que beaucoup d'argent a été investi ces dernières années pour automatiser les techniques et pour pouvoir répondre rapidement à des situations de crise. Réduire la taille des échantillons en augmentant la sensibilité de la méthode d'analyse est un domaine de recherche passionnant. La spectrométrie de masse haute résolution a encore de belles années devant elle puisque récemment un couplage GCxGC-HRMS a mis en évidence l'injection de 540 ag (ag = attogram, 10^{-18} g) de 2,3,7,8 TCDD provenant d'un échantillon de sérum humain et affichant un rapport S/N de 479:1 [26]. Ce couplage permettrait de réduire considérablement la quantité de sang prélevée nécessaire à l'analyse de ces contaminants lors d'études épidémiologiques.

Travailler à 10000 de résolution en masse n'est pas toujours suffisant pour éliminer tous les composés pouvant interférer avec les composés cibles. Le problème est généralement solutionné en augmentant la résolution entraînant, toutefois, une réduction de la transmission des ions vers le détecteur et donc une chute de sensibilité. La conception d'un nouveau détecteur pour un HRMS, fonctionnant en mode SIM à 10000 de résolution, a montré que l'on pouvait éliminer des interférences nécessitant initialement 25000 de résolution.

Pour terminer, la tendance générale qui se dégage en chimie analytique des traces est de développer des méthodes analytiques de plus en plus rapides. Une perspective est l'approche intégrée et automatisée entre les diverses étapes de préparation de l'échantillon et l'analyse par GC-MS. Ceci permettrait aux méthodes physico-chimiques d'entrer en compétition avec les tests biochimiques. Dans ce cas, l'étape limitante deviendrait la partie ultime du processus analytique à savoir : le traitement des données et la mesure proprement dite.

- [1] M. van den Berg, L. Birnbaum, A.T.C. Bosveld, B. Brunström, P. Cook, M. Feeley, J.P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S.W. Kennedy, T. Kubiak, J.C. Larsen, F.X.R. van Leeuwen, A.K.D. Liem, C. Nolt, R.E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillitt, M. Tysklind, M. Younes, F. Waern, T. Zacharewski *Environ. Health Perspect.* **1998**, 106, 775-792.
- [2] C. Rappe, *Chemosphere* **1992**, vol. 25, 41-44.
- [3] R. Alcock, M. McLachlan, A. Johnston, K.Jones *Environ.Sci.Technol.* **1998**, vol. 32, 1580-1587.
- [4] K. Breivik, R. Alcock, Y.F. Li, R.E. Bailey, H. Fiedler, J.M. Pacyna, *Environ.Pollut.* **2004**, vol. 128, no. 1-2, 3-16.
- [5] A. Hay *Nature* **1979**, vol 278, n°5700, 108-109
- [6] H. Fiedler, O.Hutzinger, C. Timms *Toxicol.Environ.Chem.* **1990** vol. 29, 157-234.
- [7] Pohjanvirta R, Unkila M, & Tuomisto J *Pharmacol.Toxicol.* **1993**, vol. 73, n° 1, 52-56.
- [8] J.P. Tindall *J.Am.Acad.Dermatol* **1985**, vol. 13, n° 4, 539-558.
- [9] S. Fierens, H. Mairesse, J.F. Heilier, C. De Burbure, G. Eppe, J.F. Focant, E. De Pauw, A. Bernard *Biomarkers* **2003**, vol 8, n°6, 529-534.
- [10] IARC. *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans* World Health Organization / International Agency for Research on Cancer, **1997**, Lyon, France.
- [11] L. Roberts, *Science* **1991**, 251, 624-626.
- [12] H. Fiedler *Chemosphere* **1996**, vol. 32, n° 1, 55-64.
- [13] H.Hagenmaier, C.Lindig, J.She, *Chemosphere* **1994**, 29, 2163
- [14] A.K Liem , P. Furst, C. Rappe *Food Addit.Contam* **2000**, vol. 17, n° 4, pp. 241-259.
- [15] D.G. Patterson, J.S. Holler, C.R. Lapeza, L.R. Alexander, D.F. Groce, R.C. O'Connor, S.J. Smith, J.A. Liddle, L.L. Needham *Anal. chem.* **1986**, 58, 705-713.
- [16] T.F.H. Bovee , L.A.P. Hoogenboom , A.R.M. Hamers , W.A. Traag , T. Zuidema , J.M.M.J.G. Aarts , A. Brouwer , H.A. Kuiper *Food add. Contam.* **1998**, 15 (8), 863-875
- [17] D.G. Hayward, K. Hooper, D. Andrzejewski *Anal. Chem.* **1999**, 71, 212-220
- [18] J.B. Plombey, M. Lausevic, R.E. March *Mass Spectrometry Reviews* **2000**, 19, 305-365.
- [19] J.-F. Focant, A. Sjödin, D.G. Patterson Jr., *Encyclopedia of Mass Spectrometry* **2006**, vol 8, in press.
- [20] Focant J.-F., Pirard C., Eppe G., De Pauw E., *J. Chromatogr. A.* **2005**, 1067, 265-275.
- [21] J.-F. Focant, C. Pirard, E. De Pauw, *Talanta* **2004**, 63, 1161-1113.
- [22] J.-F. Focant, C. Pirard, G. Eppe, E. De Pauw, *J. Chromatogr. A* **2001**, 925 207-221.
- [23] G. Eppe, J.-F. Focant, E. De Pauw, *Encyclopedia of Mass Spectrometry* **2006**, vol 8, in press.
- [24] G. Eppe, J.-F. Focant, C. Pirard, E. De Pauw, *Talanta* **2004**, 63, 1135-1146.
- [25] J.-F. Focant, G. Eppe, M.-L. Scippo, A.-C. Massart, C. Pirard, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, *J. Chromatogr. A* **2005**, 1086, 45-60.
- [26] D.G. Patterson Jr., S.M. Welch, W.E. Turner, J.-F. Focant, *Organohalogen Compd* **2005**, 67, 107-109.

Informations complémentaires

- J.-F. Focant., E. De Pauw, Les Dioxines. La Recherche **1999**, 323, 84-87.
- J.-F. Focant, C. Pirard, C. Douny, M.-L. Scippo, De Pauw E.,Maghuin-Rogister G., Le point, trois ans après, sur 'La crise de la dioxine'. Ann. Méd. Vét. **2002**, 146, 321-327.
- J.-F. Focant Dioxines : Un risque pour la Santé ou une ArmeEconmique? AILg **2000** Bulletin, 1, 6-10.