

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Diplôme 2008

Jessica Muller

*Analyses de cPCB
dans les poissons*

Professeur

Umberto Piantini

Expert

Dr Didier Ortelli

Confidentiel / Vertraulich

☐ oui / ja ☐ non / nein

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2007/2008	No PS / Nr. PS ca/2008/75
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte	Etudiant / Student Jessica Muller	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent Umberto Piantini	Expert / Experte (données complètes) Didier Ortelli	

Titre / Titel

Analyses de cPCB dans les poissons

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Les dioxines et PCB (polychlorobiphényles) forment un ensemble de polluants chimiques non naturels extrêmement toxiques, car susceptibles d'être cancérigènes. Des contaminations dues aux PCB — plus précisément aux cPCB dits coplanaires ou de type dioxine — ont cependant été découvertes dans les poissons, en août 2007 dans la Sarine et en février 2008 dans la Birse. Des taux trop élevés de cPCB ont aussi été mesurés récemment chez l'omble chevalier dans le Léman.

Devant cette menace, il est nécessaire de disposer de méthodes analytiques performantes et spécifiques. Le travail de diplôme consiste donc à mettre au point une méthode analytique sélective basée sur la GC-MS-MS permettant la quantification des PCB coplanaires et des dioxines dans les poissons.

Cahier des charges

- Etude de la littérature
- Développement d'une méthode basée sur la GC-MS-MS
 - LOD/LOQ, justesse, reproductibilité
 - spécificité, linéarité, etc.
- Mise au point de la préparation des échantillons
 - extraction
 - séparation des graisses
 - etc.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

 Resp. de filière
 Studiengangsleiter:

Etudiant/Student:

Délais / Termine

 Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:
 01.09.2008

 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:
 21.11.2008 — 12.00

 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:
 28.11.2008

 Défense orale / Mündliche Verfechtung:
 semaine/Woche 49

Analyse des cPCB, dioxines et furanes dans les poissons par GPC GC-MS/MS

Analyse der cPCB, Dioxine und Furane in Fischen von GPC GC-MS/MS

Objectifs: Ce travail effectué dans le cadre du Service de la consommation et des affaires vétérinaires, avait pour but de développer une méthode d'analyse des cPCB, dioxines et furanes dans les poissons par GPC GC-MS/MS.

Résultats : La méthode proposée en partant d'une prise d'échantillon de 10g purifiée par GPC et injectée sur une colonne de 60m en splitless pulsé à 3µl à 80°C, une température initiale de 80°C augmentée de 40°C/min jusqu'à 170°C, puis de 5°C/min jusqu'à 320°C et maintenu à cette température pendant 20min avec une ionisation par impact électronique avec une énergie de 70 eV fournit la séparation nécessaire pour l'analyse des cPCB, dioxines et furanes.

Mots-clés :

polychlorobiphényle, dioxine, furane, GPC, GC-MSMS, impact électronique, poisson

Ziele: Diese Arbeit, die im Rahmen des Service de la consommation et des affaires vétérinaires durchgeführt wurde, hatte zum Ziel, ein Prüfverfahren der cPCB, Dioxine und Furane in den Fischen durch GPC GC-MS/MS zu entwickeln

Resultate: Die vorgeschlagene Methode (10g Probe gefolgt von einer GPC Reinigung, gemessen mit einer 60m Kolonne, splitless pulsiert 3 µl, Temperaturegradient 80°C → 170°C (40°C/min) → 320°C (5°C/min) während 20min) liefert die notwendige Trennung für die Analyse der cPCB, Dioxine und Furane.

Schlüsselwörter:

Polychlorierte Biphenyle, Dioxine, Furane, GPC, GC-MS/MS, elektronische Impact, Fisch

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
1 INTRODUCTION.....	6
1.1 Les PCB.....	7
1.2 Les dioxines et furanes.....	8
1.3 La problématique des PCB, dioxines et furanes.....	9
1.3.1 Impact sur l'Homme et l'environnement.....	9
1.3.2 Toxicité.....	9
1.4 Méthodes de préparation et d'analyse utilisés.....	12
1.4.1 Chromatographie sur gel perméable (GPC).....	12
1.4.2 Spectrométrie de masse en tandem.....	12
1.5 Objectif.....	14
2 MATERIELS ET METHODES.....	15
2.1 Echantillons.....	15
2.2 Produits et solvants.....	15
2.3 Courbe de calibration.....	16
2.4 Extraction.....	17
2.5 Purification.....	17
2.5.1 Hydrolyse sur colonne de silice.....	17
2.5.2 Purification par GPC.....	17
2.6 Analyse GC-MS/MS.....	18
3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	19
3.1 Gradient de température.....	19

3.2 Mode d'injection.....	21
3.3 Méthode d'ionisation	21
3.4 Longueur de la colonne GC	22
3.5 Facteur de concentration	22
3.6 Optimisation MSMS	22
3.7 Limites de détection	24
3.8 Rendement d'extraction	28
3.9 Essai pratique	29
4 CONCLUSION & PERSPECTIVES	31
5 BIBLIOGRAPHIE	32
6 ANNEXE.....	34

Remerciements

Je tiens à remercier le chimiste cantonal Patrick Edder et le Docteur Didier Ortelli de m'avoir permis de réaliser ce stage au sein du Service de la Consommation et des Affaires Vétérinaire de Genève (SCAV).

Je remercie le chimiste Pierre Zimmerli pour son soutien, sa patience et ses conseils tout au long de ce travail de recherche ainsi que tout le service des objets usuels et les autres personnes travaillant au SCAV pour leur accueil et leur gentillesse.

Je remercie également le Professeur Umberto Piantini qui m'a permis de réaliser ce travail grâce à son aide et ses conseils.

Enfin je souhaite remercier tout particulièrement mon copain, ma famille et mes amis de m'avoir soutenu, encouragé et d'avoir été présent durant ce travail de diplôme.

Liste des abréviations

CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CID	collision induce dissociation
CIPEL	Commission internationale pour la protection des eaux du Léman
cPCB	polychlorobiphényle coplanaire
GC	gas chromatography
GC-MS/MS	gas chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
GPC	gel permeation chromatography
HpCDD	heptachlorodibenzo-p-dioxine
HpCDF	heptachlorodibenzo-furane
HxCDD	hexachlorodibenzo-p-dioxine
HxCDF	hexachlorodibenzo-furane
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
MRM	multiple reaction monitoring
MS	mass spectrometry
OCDD	octachlorodibenzo-p-dioxine
OCDF	octtachlorodibenzo-furane
OFEV	Office fédéral de l'environnement
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCB	polychlorobiphényle
PCDD	polychlorodibenzo-para-dioxine
PCDF	polychlorodibenzo-furane
PeCDD	pentachlorodibenzo-p-dioxine
PeCDF	pentatachlorodibenzo-furane
POP	polluants organiques persistants
TEF	toxic factor equivalent
TeCDD	tetrachlorodibenzo-p-dioxine
TeCDF	tetrachlorodibenzo-furane
THT	très haute tension

1 Introduction

La présence de polychlorobiphényles (PCB), dioxines et furanes dans les poissons ainsi que dans diverses denrées alimentaires est depuis plusieurs années d'intérêt public selon l'OMS puisqu'il a été déterminé que ces substances avaient un impact sévère sur la santé des consommateurs en raison de leur accumulation dans l'organisme [1].

Les mesures prises par l'Office fédéral de l'environnement (OFEV) depuis 1986, année de l'interdiction générale des PCB en Suisse, ainsi que par la Convention de Stockholm en 2004 dont l'optique vise à interdire la production de PCB et à éliminer les rejets de sous-produits industriels que sont les dioxines et les furanes, ont permis une diminution notable de la charge de PCB à laquelle l'environnement ainsi que la population sont exposés.

Nonobstant, de récentes données fournies par l'OFEV ont fait état de taux trop élevés en PCB dit coplanaires (cPCB) ou de type dioxine dans les poissons de la Sarine en août 2007, dans la Birse en février 2008 ainsi que dans les ombles chevaliers du lac de Léman [2].

Suite à ces contaminations découvertes en Suisse et aux interdictions de pêche dans le Rhône en France, des recherches et investigations plus poussées ont été entreprises pour clarifier la situation.

En l'absence de méthode officielle et de matériel adéquat appliqués à ce type d'analyse, les échantillons concernant le canton de Genève étaient jusqu'à présent envoyés au laboratoire cantonal de Berne ou en France.

Dans le but de mettre au point une méthode de dosage des cPCB, dioxines et furanes, un GC-MS/MS a été acquis en juin dernier par le Service de la consommation et des affaires vétérinaires (SCAV). Dans un premier temps, il s'agit d'analyser différents poissons, essentiellement les espèces indigènes, tels que le brochet, la perche, le fera ou encore l'omble chevalier, avec la perspective d'appliquer cette méthode à d'autres denrées alimentaires.

1.1 Les PCB

Les PCB sont des substances chimiques synthétiques constituant une famille de 209 substances congénères qui se distinguent par leur nombre d'atome de chlore et leur position sur les deux cycles phényle. Ce sont, selon leur teneur en chlore, des liquides plus ou moins visqueux voir des produits résineux, insolubles dans l'eau, incolores ou jaunâtres à forte odeur aromatique. Ils sont thermodynamiquement très stables et peu sensibles aux acides, aux bases et aux oxydants [3].

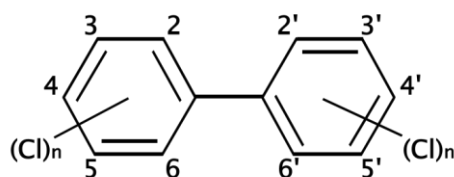


Figure 1: Structure chimique des polychlorobiphényles

Dans le passé, ils ont largement été utilisés comme lubrifiant dans la construction, la fabrication de transformateurs électriques, de condensateurs, de sectionneurs de puissance, ou comme isolateurs dans des environnements à très haute tension (THT) en raison de leur relative inflammabilité et de leurs excellentes caractéristiques diélectriques. Ils ont également été utilisés dans les moteurs de pompe, pour les fours à micro-ondes, ou comme additifs d'huiles ou de produits de soudures, dans certains adhésifs, peintures et jusque dans des papiers autocopiants. Leur utilisation a également été facilitée de par leur moindre coût [4].

En 1972, l'application des PCB a été interdite dans les systèmes ouverts comme les peintures, les joints, le mastic, les tissus et le papier du fait de leurs propriétés nocives pour l'homme et l'environnement. Depuis 1986, les PCB sont interdits de façon générale en Suisse [5].

Cependant des centaines de tonnes de PCB se trouvent encore dans les matériaux de construction d'anciens bâtiments, dans les revêtements anticorrosion et dans les condensateurs des anciennes installations électriques. Il est également probable que les déchets contenant des PCB aient été stockés par le passé dans certaines décharges dont l'infiltration dans les sols, l'écoulement dans les cours d'eau et leur stagnation dans les sédiments les auraient fait entrer dans la chaîne alimentaire. [6].

1.2 Les dioxines et furanes

Les polychlorodibenzo-para-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzo-furanes (PCDF) sont deux types de composés aromatiques organochlorés présentant des propriétés physico-chimiques semblables au PCB. Ce sont des molécules qui possèdent une structure spatiale plane (cf. Figure 2). Ces deux types de composés, ainsi que les PCB, sont souvent désignés sous le terme général de dioxine. Ce terme englobe donc les PCDD, les PCDF et les cPCB.

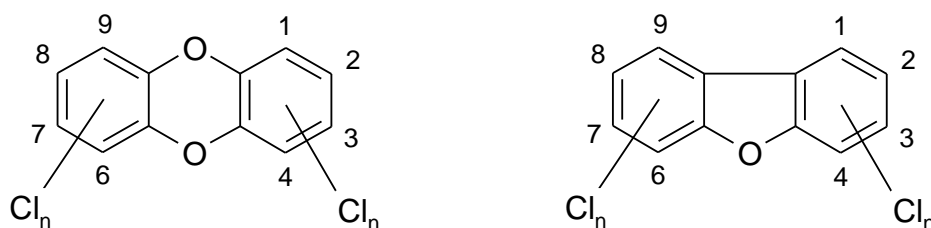


Figure 2: Structures chimiques des dioxines (à gauche) et des furanes (à droite)

Les dioxines et furanes ne sont pas des produits de synthèse volontaire mais des composés non désirés dont la formation est principalement liée aux activités humaines, industrielles et domestiques. Elles sont produites dans les incinérateurs des usines de traitement de déchets mais aussi sous toutes les formes de combustion, de la cigarette au barbecue.

Parmi les sources d'émission sont comprises également les industries de sidérurgie, la chimie des organochlorés comme par exemple les PCB, les gaz d'échappement, l'industrie du blanchiment de la pâte à papier mais aussi des phénomènes naturels tels que les incendies de forêt ou les éruptions volcanique [5]

Tout comme les PCB, ce sont des molécules présentant une grande stabilité augmentant avec le nombre de chlore. Ne se dégradant qu'en contact d'oxydants puissants, elles ont tendance à s'accumuler dans l'environnement et le long de la chaîne alimentaire.

1.3 La problématique des PCB, dioxines et furanes

1.3.1 Impact sur l'Homme et l'environnement

Les PCB, dioxines et furanes sont ubiquitaires, liposolubles et difficilement biodégradables. De ce fait elles s'accumulent dans la chaîne alimentaire jusque dans l'organisme humain. Ingérées quotidiennement en petites quantités par le biais de la nourriture, leur bioaccumulation prend place principalement dans les tissus adipeux liposolubles.

Une exposition brève de l'homme à de fortes concentrations en dioxines, furanes et PCB peut entraîner des lésions dermiques, comme la chloracné (acné chlorique) et une altération de la fonction hépatique.

Une exposition de longue durée s'associe à une dégradation du système immunitaire, du développement du système nerveux, du système endocrinien et des fonctions génésiques. Chez l'animal, l'exposition chronique aux dioxines, furanes et PCB a entraîné plusieurs types de cancers. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé ces produits comme étant cancérogènes pour l'homme. En revanche, ils n'altèrent pas le patrimoine génétique [1].

1.3.2 Toxicité

Les PCB sont des substances qui font partie des polluants organiques persistants (POP) [7]. De plus, 12 des 209 congénères, les 12 cPCB, font partie des produits de type dioxines et sont donc dotés de propriétés toxiques similaires.

Les dioxines et les furanes ont une structure plane très semblable. En revanche, dans le cas des PCB, les congénères n'adoptent une structure plane qu'en l'absence d'atomes de chlores en position ortho du deuxième cycle.

Plus les positions en ortho sont occupées par des chlores, plus la molécule adopte une structure tridimensionnelle pour limiter l'encombrement stérique. Les cPCB ne possédant pas d'atomes de chlore en ortho sont donc ceux qui s'apparentent le plus aux dioxines et furanes.

Il existe 210 dioxines et furanes mais seuls 17 congénères, listés dans le Tableau 2, sont reconnus comme toxiques. Chacun des 17 congénères est affecté d'un facteur de toxicité (TEF, Toxic Equivalent Factor) édicté par L'OMS, correspondant à un facteur d'équivalent toxique par rapport à la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine, congénère le plus toxique, mieux connu sous le nom de dioxine de Seveso.

Chacun des 12 congénères de cPCB de type dioxine est également affecté d'un facteur de toxicité équivalent de la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine.

Tableau 1: Nombre de congénères pour les produits de type dioxines

Nom	Nombre théorique de congénères possibles	Nombre de congénères avec une forte toxicité
PCDD	75	7
PCDF	135	10
PCB	209	12
Total	419	29

Ces 29 produits de types dioxines, présentant une toxicité élevée et soumis à une réglementation fixée par l'OMS [1] nécessitent en plus d'une surveillance particulière, de pouvoir être identifiés et analysés. Ils sont regroupés dans le Tableau 2 de la page suivante.

Les teneurs maximales autorisées [8] dans la chair musculaire des poissons à l'état frais sont de 4.0 pg/g pour la somme des dioxines et furanes et de 8.0 pg/g pour la somme des dioxines, furanes et PCB de type dioxine. Dans le cas particulier de l'anguille, les teneurs maximales sont respectivement de 4.0 pg/g et 12.0 pg/g. Ces valeurs sont exprimées en équivalents toxiques de l'OMS.

Les valeurs pour les autres denrées alimentaires telles que la viande, les œufs et le lait sont disponibles à l'Annexe 1.

Tableau 2: Liste des analytes ainsi que leur valeur OMS-TEF 2005 [9]

	Abréviation	Congénère	Valeur TEF ₀₅
<i>Dibenzo-p-dioxines</i>	DD048	2,3,7,8-TeCDD	1
	DD054	1,2,3,7,8-PeCDD	1
	DD066	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1
	DD067	1,2,3,6,7,8-hexaHxCDD	0.1
	DD070	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1
	DD073	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01
	DD075	OCDD	0.0003
<i>Dibenzofuranes</i>	DF083	2,3,7,8-TeCDF	0.1
	DF094	1,2,3,7,8-PeCDF	0.03
	DF114	2,3,4,7,8-PeCDF	0.3
	DF118	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1
	DF121	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1
	DF130	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1
	DF124	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1
	DF131	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01
	DF134	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01
	DF135	OCDF	0.0003
<i>Polychlorobiphényles non ortho</i>	PCB 77	3,3',4,4'-Tetrachlorobiphényle	0.0001
	PCB 81	3,4,4',5-Tetrachlorobiphényle	0.0003
	PCB 126	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphényle	0.1
	PCB 169	3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphényle	0.03
<i>Polychlorobiphényles mono-ortho</i>	PCB 105	2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphényle	0.00003
	PCB 114	2,3,4,4',5-Pentachlorobiphényle	0.00003
	PCB 118	2,3',4,4',5-Pentachlorobiphényle	0.00003
	PCB 123	2',3,4,4',5-Pentachlorobiphényle	0.00003
	PCB 156	2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphényle	0.00003
	PCB 157	2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphényle	0.00003
	PCB 167	2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphényle	0.00003
	PCB 189	2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphényle	0.00003

1.4 Méthodes de préparation et d'analyse utilisés

1.4.1 Chromatographie sur gel perméable (GPC)

La chromatographie sur gel perméable est basée sur la capacité des molécules à se déplacer à travers une colonne remplie d'un gel poreux dont la taille des pores est clairement définie.

Les plus grosses molécules ne pouvant entrer dans les pores, traversent la colonne avec une vitesse linéaire plus importante et sont donc éluées en premier. A mesure que la taille des molécules diminue, leur capacité à pénétrer certains pores augmente et retarde d'autant plus leur élution à travers la colonne. L'avantage principal de cette méthode réside dans sa simplicité. En effet, cette méthode utilisée en mode isocratique permet de séparer rapidement les grosses molécules, telles que les matières grasses dans notre cas, de nos substances beaucoup plus petites que nous recherchons. Cependant cette méthode nécessite l'utilisation de colonnes coûteuses et sensibles aux contaminations, il faut donc s'assurer de la propreté des échantillons.

1.4.2 Spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse isotopique [10]. Les parties principales d'un spectromètre de masse sont représentées dans la Figure 3 ci-dessous.

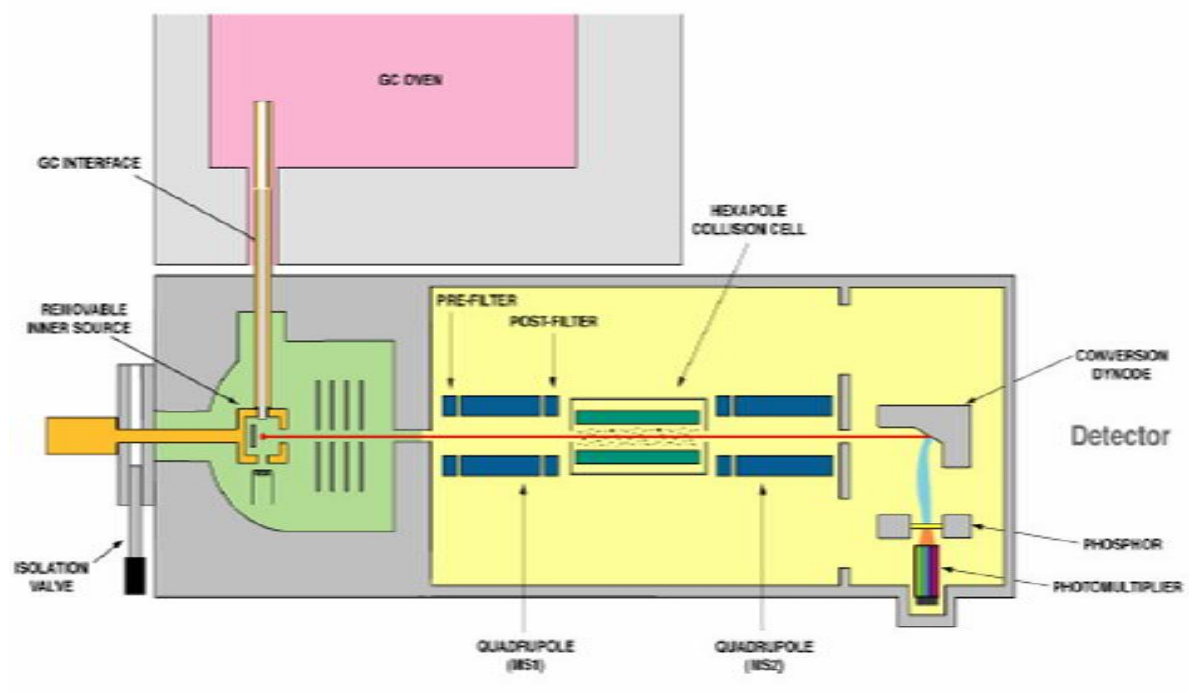


Figure 3: Schéma général d'un spectromètre de masse Micromass Quattro micro GC Optics [11]

Après séparation chromatographique, les analytes pénètrent dans une source spécifique via l'interface GC chauffée. Dans le cas d'une ionisation par impact électronique (EI) à une énergie de 70eV (standard pour la reproduction des spectres), les ions sont formés par bombardement d'électrons (produits par un filament incandescent) sur les molécules d'échantillons à l'état de vapeur. Un certain nombre de molécules ionisées se brise en fragments, parmi lesquels on trouve des ions positifs qui formeront le spectre de masse caractéristique de la molécule étudiée.

Dans le cas d'une ionisation chimique (CI), un gaz réactant, le méthane dans notre cas, est introduit sous pression dans la chambre d'ionisation et est ionisé par les électrons produits par un filament incandescent. Lorsque la molécule entre dans la source, l'ionisation de celle-ci aura lieu par collision avec les ions du gaz réactant. Processus moins énergétique que l'impact électronique, il permet de reconnaître l'ion moléculaire et produit moins de fragmentations, augmentant de ce fait la sensibilité.

Les ions produits sont ensuite dirigés et accélérés vers l'analyseur à l'aide d'une série de lentilles électrostatiques. Les ions sont alors filtrés selon leur rapport m/z dans le premier quadripôle en procédant à une variation de l'intensité et de la fréquence du champ électrostatique appliqué. Les ions entrant dans la cellule de collision (hexapôle), qui est sous une pression d'argon, sont activés par la collision (CID) puis fragmentés. Les ions sont à nouveau filtrés selon leurs rapports m/z dans le deuxième quadripôle selon les mêmes principes que pour le premier quadripôle et finalement détectés à l'aide d'une détection excentrée équipée d'un photomultiplicateur.

La source est composée comme illustré dans la Figure 3, de deux éléments distincts, la "inner source" et la "outer source". L'inner source est la zone où a lieu l'ionisation des analytes acheminés par l'interface, il en existe deux modèles suivant le mode d'ionisation utilisé, impact électronique (EI) ou ionisation chimique (CI) dont le principe a été décrit ci-dessus. L'outer source est une partie mécanique de la source qui permet le transfert des ions vers l'analyseur quadripolaire. Elle contient l'ensemble des lentilles électrostatiques utilisées pour extraire les ions [11].

1.5 Objectif

L'objectif principal de ce travail de diplôme est de développer une méthode d'analyse sensible (≤ 2 ppb) des cPCB, dioxines et furanes par GPC GC-MS/MS dans les poissons.

Il s'agit d'optimiser le facteur de concentration de l'échantillon ainsi que les conditions GC-MS/MS, à savoir pour les paramètres GC : le type et la longueur de la colonne, le gradient de température, le mode d'injection. Et pour les paramètres MS: le mode de ionisation, l'optimisation des conditions de ionisation, la détermination des ions spécifiques, l'optimisation des conditions de collisions, le choix des transitions MRM.

Le but étant d'obtenir une méthode suffisamment sensible et sélective pour identifier et quantifier les 29 congénères des cPCB, dioxines et furanes en une seule analyse.

Les objectifs fixés par le cahier des charges peuvent être consultés en début de rapport.

2 Matériels et méthodes

2.1 Echantillons

Des échantillons de brochet et de saumon frais ont été utilisés lors des essais pour le développement de la méthode analytique par GPC GC-MS/MS. Les filets ont été tirés au couteau, broyés (Mixer B-400 à lame téflon, Büchi) et conservés dans des flacons scellés de 280 ml à -20°C.

Les échantillons de brochet ont été fournis par la Commission Internationale pour la Protection des Eaux du Léman (CIPEL) et les échantillons de saumon ont été fournis par Aligro (saumon d'élevage, Norvège). Seuls les filets avec la peau sont utilisés car ils représentent la partie consommable du poisson.

2.2 Produits et solvants

La solution EDF-4069 des 17 congénères toxiques de dioxines et furanes contenant le 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, OCDD, 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 2,3,4,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,7,8,9-HxCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF, OCDF provient de chez Cambridge Isotope Laboratories.

Les 12 solutions à 10 ng/μl de PCB coplanaires (PCB 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189) proviennent de chez Dr. Ehrenstorfer GmbH.

Le n-hexane (97%) provient de chez Sigma-Aldrich. Le cyclohexane (99.7%) et l'acétate d'éthyle (99.9%) proviennent de chez Biosolve. L'acétone (Suprasolv), le diéthyl éther (99.5%), l'acide sulfurique (97-99%), le méthanol (99.9%), le Silica Gel 60 (0.063-0.200 mm) et le sulfate de sodium anhydre (extra pur) proviennent de chez Merck. Le Bio-Beads S-X3 (200-400 mesh) provient de chez Bio-Rad Laboratories. L'argon (6.0), l'hélium (5.6), et le méthane (5.5) sont fournis par Pangas.

2.3 Courbe de calibration

Le développement et la détermination des limites de détection de la méthode analytique par GC-MS/MS ont été effectués à l'aide d'une courbe de calibration composée de 7 points (A → G) aux différentes concentrations représentées dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3: Concentrations des cPCB, dioxines et furanes déterminant les points de la courbe de calibration

Points de la courbe de calibration	cPCB TeCDD/TeCDF [µg/l]	PeCDD/PeCDF HxCDD/HxCDF HpCDD/HpCDF [µg/l]	OCDD/OCDF [µg/l]
A	100	250	500
B	50	125	250
C	20	50	100
D	10	25	50
E	5	12.5	25
F	2	5	10
G	1	2.5	5

La Figure 4 représente une courbe de calibration pour le PCB 81, les autres courbes de calibration sont disponibles à l'Annexe 2.

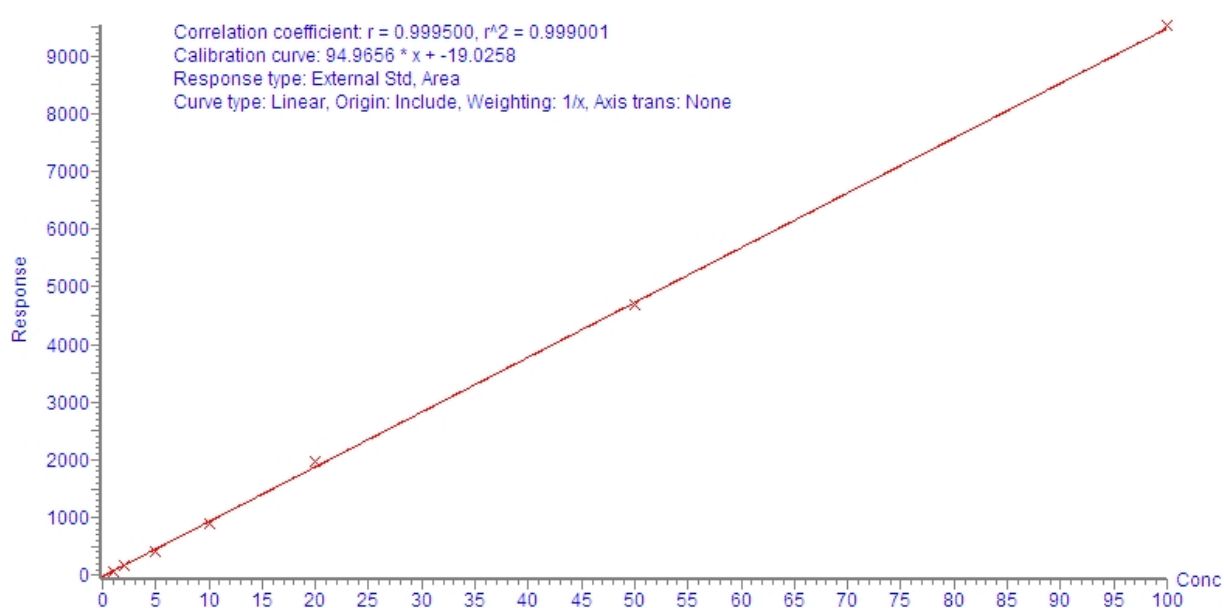


Figure 4: Courbe de calibration du PCB 81

2.4 Extraction

Environ 10g d'échantillon de poisson broyés (selon 2.1) sont extraits avec 60ml d'une solution hexane/acétone (3:1) à l'ultraturax (Polytron PCU, Kinematika) pendant 5 minutes puis centrifugés (Varifuge 3.0, Heraus AG Sepatech) à 3000 tours/minute pendant 15 minutes. Le surnageant organique est prélevé et filtré sur Na₂SO₄ anhydre. L'opération est répétée 2 fois et les fractions sont regroupées et évaporées au rotavapor (Rotavapor R-205, Büchi). Lorsque la prise de poisson est de 50g, elle est extraite avec 3 x 100ml de la solution hexane/acétone (3:1).

2.5 Purification

En fonction de la quantité d'échantillon obtenue après extraction, deux méthodes de purification sont possibles: sur silice et par GPC. La purification par GPC est effectuée seule si la quantité de graisse ne dépasse pas les 0.4 g. Dans le cas où la quantité de graisse est supérieure, une hydrolyse acide sur silice est effectuée au préalable afin de ne pas surcharger la colonne GPC.

2.5.1 Hydrolyse sur colonne de silice

Cette hydrolyse consiste à transformer la graisse en acide gras. Elle est effectuée sur une colonne (H = 350mm, d.i. = 30mm) préparée avec une première couche de 25g de silice contenant 33% d'H₂SO₄ conditionnée dans l'hexane, puis une deuxième couche de 25g de silice contenant 20% d'H₂SO₄ conditionnée dans l'hexane et finalement une dernière couche de 2g de Na₂SO₄ anhydre. L'extrait de gras est dilué avec 1ml d'éluant hexane / diéthyl éther (97:3), déposé sur la colonne et élué avec 160ml. La fraction contenant les cPCB, dioxines et furanes est évaporée au rotavapor.

2.5.2 Purification par GPC

La purification se fait par GPC sur une colonne Omnifit en verre (500x15mm i.d., Alltech Associates) contenant 38g de Bio-Beads S-X3 dans du cyclohexane/acétate d'éthyle (1:1), munie d'une boucle d'injection de 2ml et reliée à une pompe à gradient (Spectra System P1000XR, Thermo Fisher Scientific). La colonne est préparée selon la méthode en Annexe 3. L'extrait de gras est dilué dans 2.5ml d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (1:1) et injecté

dans la boucle de la colonne. L'élution se fait à un débit de 3ml/min. La fraction (de 16 à 35 minutes) contenant les PCB, dioxines et furanes est récupérée et évaporée au rotavapor.

Après la purification, le ballon de récupération est rincé avec 500µl d'hexane et transvasé dans un vial puis évaporé à sec sous flux d'azote (Techne DRI-BLOCK DB3, Biolabo). L'opération est répétée 2 fois.

2.6 Analyse GC-MS/MS

Les analyses sont effectuées sur un GC (HP7890, Agilent Technologies) couplé à un MS/MS triple quadripôle (Quattro Micro, Waters) muni d'une colonne GC capillaire (HT8, 8% phenyl-polycarbon-siloxan, 60m x 0.25mm, 0.25µm, SGE) précédée d'une pré-colonne de silice désactivée (2m x 0.25mm, 0.25 µm, BGB). Le système est équipé d'un autosampler (Combi Pal, CTC Analytics).

Les conditions GC sont les suivantes: une injection splitless pulsé de 3µl à 80°C, une température initiale de 80°C augmentée de 40°C/min jusqu'à 170°C, puis de 5°C/min jusqu'à 320°C et maintenu à cette température pendant 20min. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur. La température de la source est fixée à 200°C avec une température d'interface de 250°C. Le mode d'ionisation utilisé est l'impact électronique avec une énergie de 70 eV.

Une énergie de collision de 22eV est utilisée pour la fragmentation, le gaz de collision est l'argon.

3 Résultats et discussion

L'accent de ce travail a principalement été porté sur le développement de la méthode analytique par GC-MS/MS. Différents facteurs ont dû être optimisés afin d'obtenir une méthode valable.

3.1 Gradient de température

La méthode de séparation initiale ne tenait compte que des cPCB. Le but de ce travail étant de créer une méthode permettant d'analyser en une seule analyse également les dioxines et les furanes, il a fallu l'améliorer en utilisant des gradients de température. La Figure 4 de la page suivante montre un chromatogramme pour le gradient donnant une séparation plus que satisfaisante. La séparation des 29 substances à analyser permet l'identification de chaque composé.

La dioxine DD54 et la furane DF114 ne sont pas séparées par la chromatographie gazeuse, cependant elles ont deux masses molaires distinctes et sont par conséquent parfaitement différenciables par MS/MS.

Pour les furanes DF118 et DF121 elles présentent une meilleure séparation chromatographique cependant elle n'est pas optimum, et dans ce cas elles ont la même masse molaire et ne sont par conséquent pas différenciables par MS/MS. Cependant elles ont le même facteur de toxicité donc il est possible d'en faire la somme et de les quantifier ensemble.

Le cas se répète pour les dioxines DD66 et DD67 qui ne présentent pas non plus une séparation optimum et qui ont également la même masse molaire. Elles ont aussi le même facteur de toxicité et sont donc quantifiables ensemble.

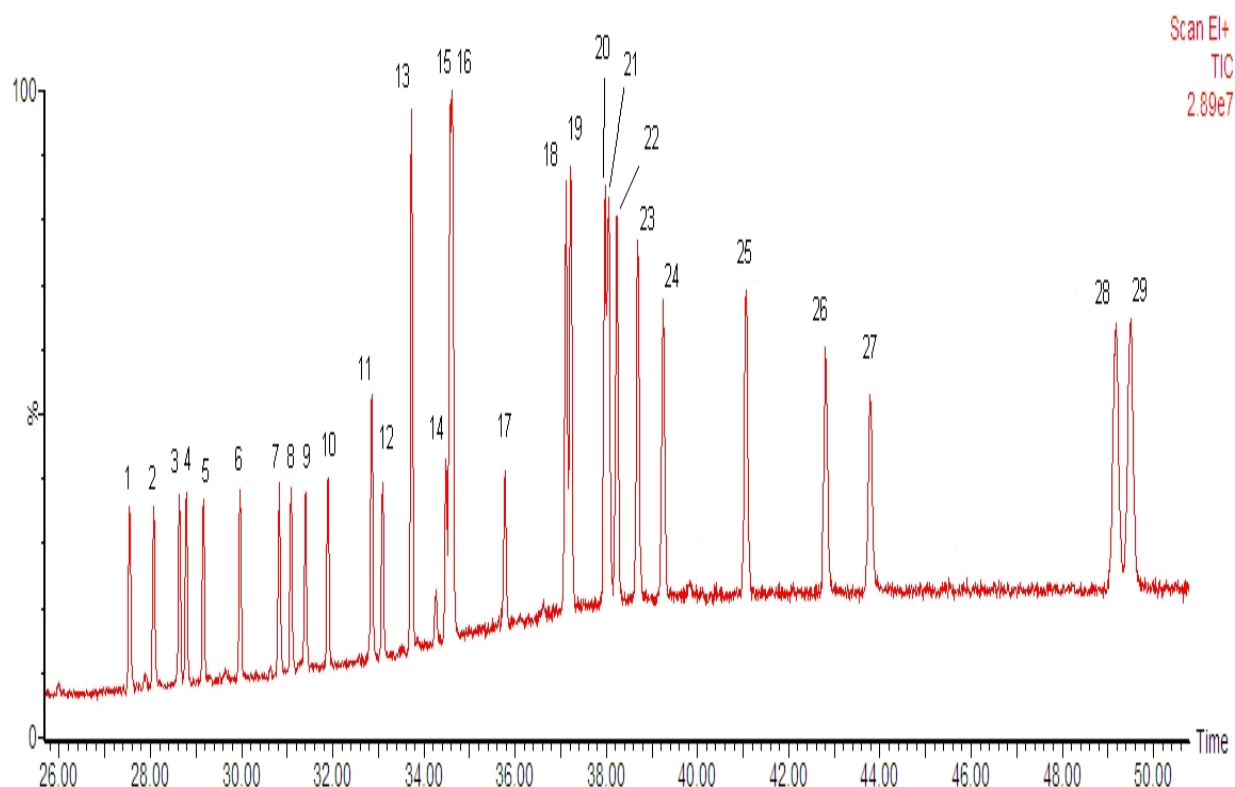


Figure 5: Chromatogramme en full scan des 29 substances à 500[µg/l]. (1) PCB81, (2) PCB77, (3) PCB123, (4) PCB118, (5) PCB114, (6) PCB105, (7) DF83, (8) DD48, (9) PCB126, (10) PCB167, (11) PCB156, (12) PCB157, (13) DF94, (14) PCB169, (15) DF114, (16) DD54, (17) PCB189, (18) DF118, (19) DF121, (20) DD66, (21) DD67, (22) DF130, (23) DD70, (24) DF124, (25) DF131, (26) DD73, (27) DF134, (28) DD75, (29) DF135.

3.2 Mode d'injection

Parmi les deux modes d'injection testés, à savoir l'injection normale de 1µl et l'injection en mode pulsée de 3µl, le mode pulsé a montré qu'il permettait d'augmenter de manière significative la sensibilité (cf Figure 5), c'est pourquoi il a été choisi comme mode d'injection.

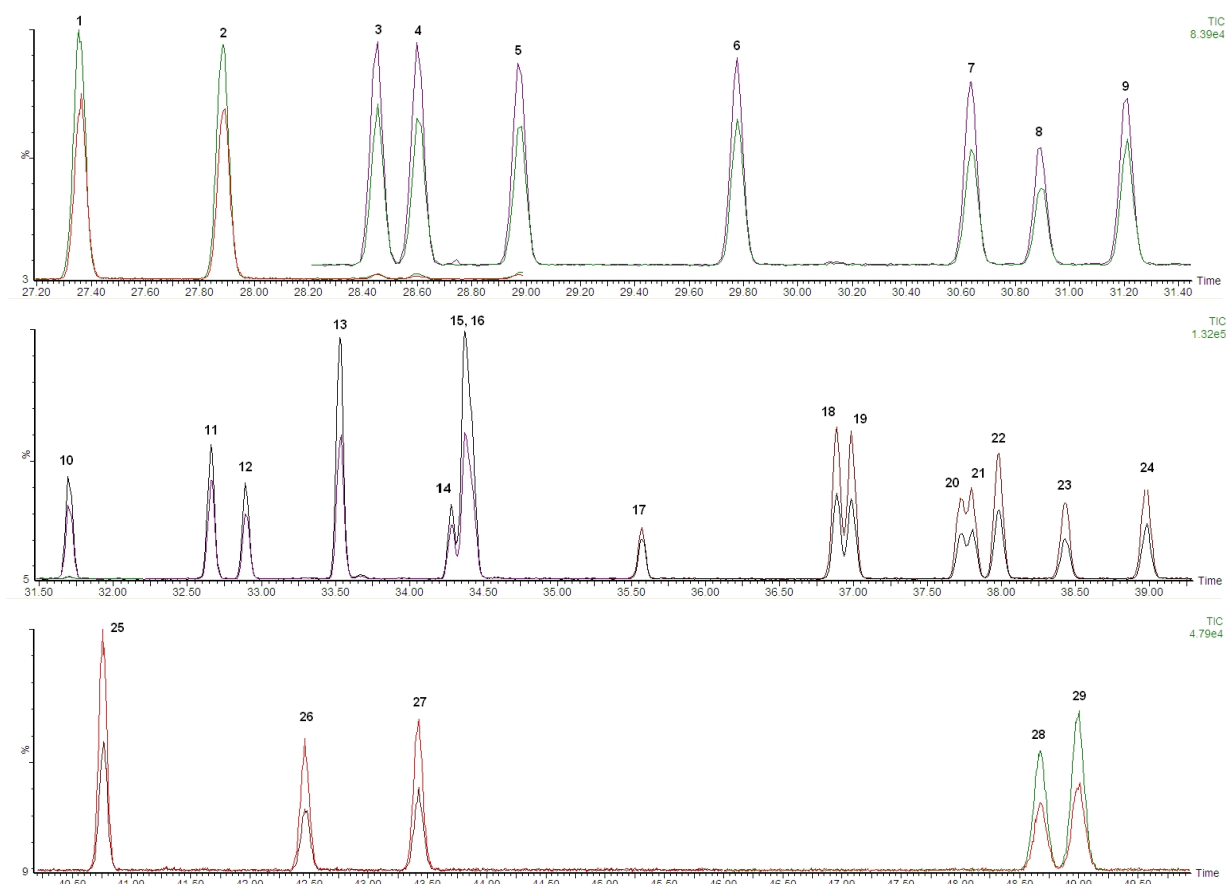


Figure 6: Chromatogramme en MRM des 29 substances correspondant aux concentrations 100, 250 et 500 µg/l en mode normal et en mode pulsé

3.3 Méthode d'ionisation

Il existe deux méthodes d'ionisation possibles avec le GC MS/MS, l'impact électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI). Ces méthodes ont été testées afin de déterminer laquelle présentait la meilleure sensibilité.

Plusieurs essais ont été effectués en ionisation chimique négative où différents paramètres tels que le flux de méthane, l'énergie de collision et la température de la source ont tenté d'être optimisés. Toutefois, la plupart des essais ayant été infructueux, car conduisant à la destruction des filaments de rhénium (problèmes de fuite et d'électronique), il a été décidé d'abandonner cette méthode au profit de l'impact électronique.

3.4 Longueur de la colonne GC

Les essais effectués sur deux colonnes de longueur différente, une de 30m et une de 60m, visant à raccourcir le temps d'analyse ont montré que la colonne de 30m n'apportait pas une séparation suffisante. La suite des essais a été poursuivie sur la colonne de 60m.

3.5 Facteur de concentration

Deux paramètres ont été testés afin d'augmenter le facteur de concentration: la prise d'échantillon et le volume de reprise final.

Les essais ont été effectués en partant d'une prise de 10g et de 50g. La prise à 50g permet d'améliorer la sensibilité d'un facteur 5, mais dans le cas du saumon il est nécessaire de faire une purification sur silice avant la purification par GPC à cause de sa forte teneur en matière grasse. Les essais ont cependant été effectués pour la plupart avec une prise de 10g.

Le volume de reprise final avant l'injection a été le deuxième paramètre visant à améliorer la sensibilité. Les essais ont été effectués en reprenant les échantillons de brochet dans 100µl et 50µl. La reprise dans 50µl permet d'augmenter la sensibilité d'un facteur 2.

3.6 Optimisation MSMS

Les fragments filles ont été déterminés après fragmentation des ions parents caractéristiques les plus abondants. La première transition est utilisée pour la quantification et la deuxième transition sert de confirmation. Les deux transitions sont nécessaires pour permettre la quantification.

Le Tableau 4 de la page suivante représente les différentes transitions utilisées pour la fragmentation. Les composés sont repartis en 6 groupes selon leur temps de rétention et leur nombre de chlore. Ces groupes représentent les 6 fonctions MRM.

Tableau 4: Tableau récapitulatif des temps de rétention (t_R) et des transitions MS/MS

PCB, PCDD, PCDF	Masse [g/mol]	Formule	t _R [min]	Trans 1	Trans 2
PCB 81	289.9224	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	27.36	290>220	292>220
PCB 77	289.9224	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	27.89	290>220	292>220
PCB 123	323.8834	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	28.45	324>254	326>256
PCB 118	323.8834	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	28.60	324>254	326>256
PCB 114	323.8834	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	28.99	324>254	326>256
PCB 105	323.8834	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	29.78	324>254	326>256
DF083	303.9016	C ₁₂ H ₄ OCl ₄	30.64	305.9>242.9	303.9>240.9
DD048	319.8965	C ₁₂ H ₄ O ₂ Cl ₄	30.89	319.9>257.9	321.9>258.9
PCB 126	323.8834	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	31.21	324>254	326>256
PCB 167	357.8444	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	31.69	360>290	358>288
PCB 156	357.8444	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	32.66	360>290	358>288
PCB 157	357.8444	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	32.89	360>290	358>288
DF094	337.8627	C ₁₂ H ₃ OCl ₅	33.54	339.9>276.9	337.9>274.8
PCB 169	357.8444	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	34.29	360>290	358>288
DF114	337.8627	C ₁₂ H ₃ OCl ₅	34.37	339.9>276.9	337.9>274.8
DD054	353.8576	C ₁₂ H ₃ O ₂ Cl ₅	34.40	355.9>292.9	353.9>290.8
PCB 189	391.8054	C ₁₂ H ₃ Cl ₇	35.57	394>324	396>326
DF118	371.8237	C ₁₂ H ₂ OCl ₆	36.89	373.9>310.8	375.9>312.8
DF121	371.8237	C ₁₂ H ₂ OCl ₆	36.98	373.9>310.8	375.9>312.8
DD066	387.8186	C ₁₂ H ₂ O ₂ Cl ₆	37.72	389.9>326.8	391.9>328.9
DD067	387.8186	C ₁₂ H ₂ O ₂ Cl ₆	37.81	389.9>326.8	391.9>328.9
DF130	371.8237	C ₁₂ H ₂ OCl ₆	37.98	373.9>310.8	375.9>312.8
DD070	387.8186	C ₁₂ H ₂ O ₂ Cl ₆	38.43	389.9>326.8	391.9>328.9
DF124	371.8237	C ₁₂ H ₂ OCl ₆	38.98	373.9>310.8	375.9>312.8
DF131	405.7847	C ₁₂ HOCl ₇	40.76	407.9>344.8	409.9>346.8
DD073	421.7796	C ₁₂ HO ₂ Cl ₇	42.47	423.9>360.8	425.9>362.8
DF134	405.7847	C ₁₂ HOCl ₇	43.43	407.9>344.8	409.9>346.8
DD075	455.7407	C ₁₂ O ₂ Cl ₈	48.68	459.8>396.9	457.8>394.8
DF135	439.7457	C ₁₂ O ₂ Cl ₈	49.00	443.8>380.8	441.9>378.7

3.7 Limites de détection

Les limites de détection (LOD) ont été déterminées à partir des courbes de calibrations effectuées avec les standards des 29 substances à analyser.

Tableau 5: Tableau récapitulatif des limites de détection pour un facteur de concentration de 200

PCB, PCDD, PCDF	OMS-TEF ₀₅	LOD Std [µg/l]	LOD ₍₂₀₀₎ [pg/g]	LOD ₍₂₀₀₎ -TEF [pg/g]
PCB 81	0.0003	1	5	0.0015
PCB 77	0.0001	1	5	0.0005
PCB 123	0.00003	1	5	0.00015
PCB 118	0.00003	1	5	0.00015
PCB 114	0.00003	1	5	0.00015
PCB 105	0.00003	1	5	0.00015
DF083	0.1	2	10	1
DD048	1	2	10	10
PCB 126	0.1	1	5	0.5
PCB 167	0.00003	2	10	0.0003
PCB 156	0.00003	1	5	0.00015
PCB 157	0.00003	2	10	0.0003
DF094	0.03	5	25	0.75
PCB 169	0.03	2	10	0.003
DF114	0.3	5	25	7.5
DD054	1	5	25	25
PCB 189	0.00003	2	10	0.0003
DF118	0.1	5	25	2.5
DF121	0.1	5	25	2.5
DD066	0.1	5	25	2.5
DD067	0.1	5	25	2.5
DF130	0.1	5	25	2.5
DD070	0.1	12.5	62.5	6.25
DF124	0.1	5	25	2.5
DF131	0.01	5	25	0.25
DD073	0.01	12.5	62.5	0.625
DF134	0.01	12.5	62.5	0.625
DD075	0.0003	50	250	0.015
DF135	0.0003	50	250	0.015

La colonne LOD Std représente les valeurs limites de sensibilité de l'appareil. La colonne LOD₍₂₀₀₎ montre les valeurs limites de sensibilité pour une prise d'échantillon de 10g et une reprise finale dans 50µl. La colonne LOD₍₂₀₀₎-TEF indique les valeurs limites de sensibilité en tenant compte du facteur de toxicité OMS-TEF₀₅.

Les teneurs maximales autorisées dans la chair musculaire des poissons à l'état frais étant de 4.0 pg/g pour la somme des dioxines et furanes et de 8.0 pg/g pour la somme des dioxines, furanes et PCB de type dioxine, il est à noter que la limite de détection n'est pas atteinte pour les dioxines DD48 et DD54.

Pour la dioxine DD70 et la furanes DF116, la limite de détection est juste suffisante.

Tableau 6: Tableau récapitulatif des limites de détection pour un facteur de concentration de 1000

PCB, PCDD, PCDF	OMS-TEF ₀₅	LOD Std [µg/l]	LOD ₍₁₀₀₀₎ [pg/g]	LOD ₍₁₀₀₀₎ -TEF [pg/g]
PCB 81	0.0003	1	1	0.0003
PCB 77	0.0001	1	1	0.0001
PCB 123	0.00003	1	1	0.00003
PCB 118	0.00003	1	1	0.00003
PCB 114	0.00003	1	1	0.00003
PCB 105	0.00003	1	1	0.00003
DF083	0.1	2	2	0.2
DD048	1	2	2	2
PCB 126	0.1	1	1	0.1
PCB 167	0.00003	2	2	0.00006
PCB 156	0.00003	1	1	0.00003
PCB 157	0.00003	2	2	0.00006
DF094	0.03	5	5	0.15
PCB 169	0.03	2	2	0.0006
DF114	0.3	5	5	1.5
DD054	1	5	5	5
PCB 189	0.00003	2	2	0.00006
DF118	0.1	5	5	0.5
DF121	0.1	5	5	0.5
DD066	0.1	5	5	0.5
DD067	0.1	5	5	0.5
DF130	0.1	5	5	0.5
DD070	0.1	12.5	12.5	1.25
DF124	0.1	5	5	0.5
DF131	0.01	5	5	0.05
DD073	0.01	12.5	12.5	0.125
DF134	0.01	12.5	12.5	0.125
DD075	0.0003	50	50	0.003
DF135	0.0003	50	50	0.003

La colonne LOD₍₁₀₀₀₎ montre les valeurs limites de sensibilité pour une prise d'échantillon de 50g avec une reprise finale dans 50µl. La colonne LOD₍₁₀₀₀₎-TEF indique les valeurs limites de sensibilité en tenant compte du facteur de toxicité OMS-TEF₀₅. Il est à noter qu'avec un facteur de concentration de 1000 il est possible de détecter toutes les substances en dessous de la valeur maximale autorisée de 8 pg/g.

La méthode n'ayant pas été totalement optimisée au niveau de la préparation de l'échantillon et validée, les LOD, qui correspondent à des limites de sensibilité et représentées dans le Tableau 5 et le Tableau 6, ne sont valables que pour des facteurs de concentrations de 200 et de 1000. Les limites de quantification (LOQ) seront établies au moment de la validation de la méthode avec également de nouvelles LOD.

Toutes les limites de sensibilité ont été déterminées à l'aide du programme MassLynx 4.1 SCN627.

3.8 Rendement d'extraction

Des rendements d'extraction indicatifs ont été effectués à partir de deux prises de 10g d'échantillons de brochet et de deux prises de 10g d'échantillons de brochet dopé aux concentrations de 100, 250 et 500 µg/l. Les résultats sont visibles dans le Tableau 7 ci-dessous. Les chromatogrammes peuvent être consultés à l'Annexe 4.

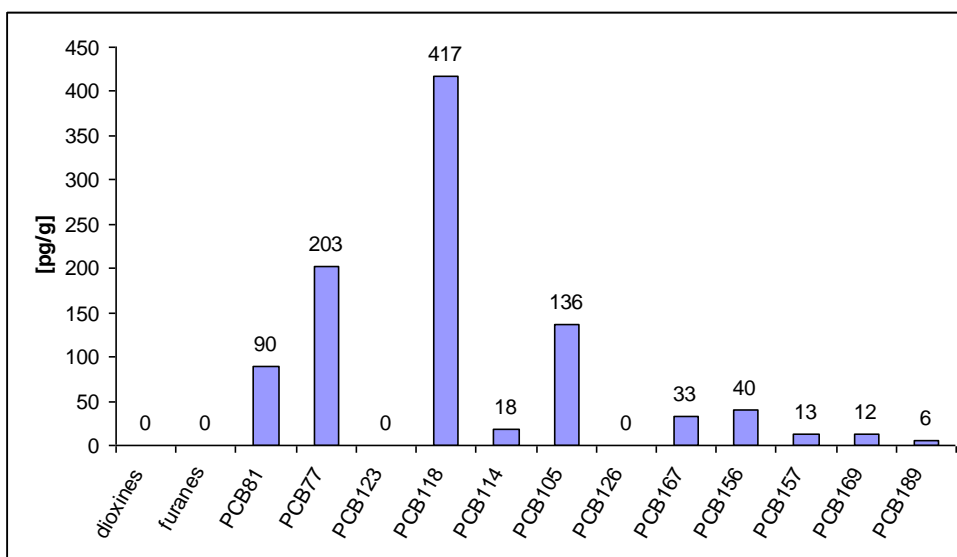
Tableau 7: Récapitulatif des rendements d'extraction

PCB, PCDD, PCDF	Moyenne concentrations dopées [pg/g]	Moyenne concentrations non dopées [pg/g]	Rendement [%]
PCB 81	994.5	112	88.3
PCB 77	1246.5	351	89.6
PCB 123	929	87	84.2
PCB 118	1929.5	1166	76.4
PCB 114	937	48.5	88.9
PCB 105	1200.5	374.5	82.6
DF083	820	0	82.0
DD048	842.5	0	84.3
PCB 126	838	36.5	80.0
PCB 167	881.5	101	78.1
PCB 156	858.5	120.5	73.8
PCB 157	757	36.5	72.1
DF094	1950	0	78.0
PCB 169	687	0	68.7
DF114	1831.5	0	73.3
DD054	1757.5	0	70.3
PCB 189	656.5	1	65.6
DF118	1767	0	70.7
DF121	1755	0	70.2
DD066	1842.5	0	73.7
DD067	1540	0.85	61.6
DF130	1685	0	67.4
DD070	1670	0	66.8
DF124	1680	0	67.2
DF131	1647	0	65.9
DD073	1579.5	0	63.2
DF134	2424	0	97.0
DD075	3571.5	0	71.4
DF135	3603	0	72.1

3.9 Essai pratique

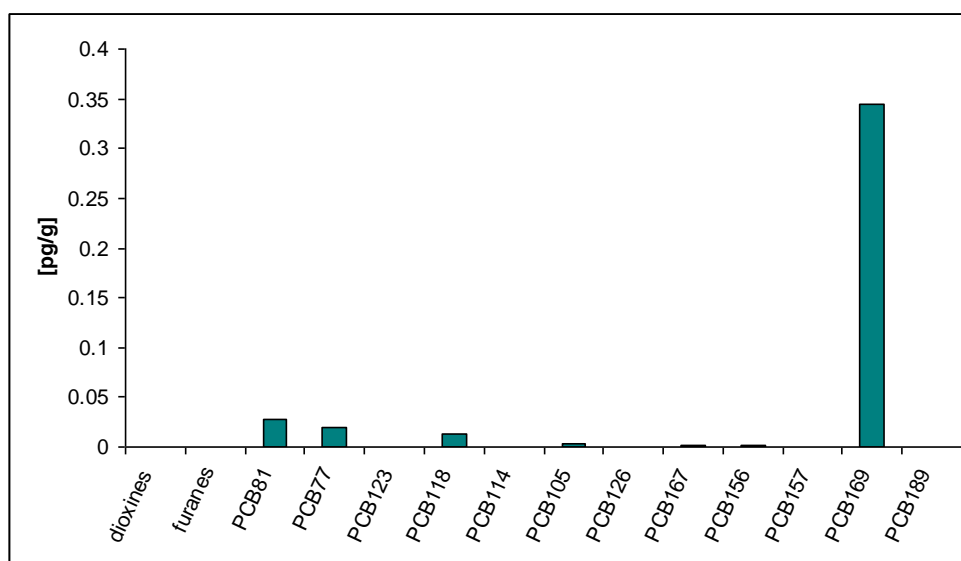
Un échantillon de 10g de brochet a été analysé et les résultats ont été comparés avec les résultats obtenus au laboratoire de Nantes en France.

Le Graphique 1 ci-dessous indique les valeurs obtenues pour les 29 substances analysées sans tenir compte du facteur de toxicité équivalent (TEF).



Graphique 1: Concentrations obtenues en [pg/g] pour l'échantillon de brochet sans le facteur TEF

Bien que les concentrations semblent élevées, il faut encore tenir compte du facteur TEF, ce qui change notablement le profil de résultat comme représenté dans le Graphique 2 ci-dessous.



Graphique 2: Concentrations obtenues en [pg/g] pour l'échantillon de brochet en tenant compte des facteurs TEF

D'après le Graphique 1 et le Graphique 2, aucune dioxines et furanes n'ont été détectés dans l'échantillon de brochet, c'est pourquoi le résultat n'a pas été détaillé pour chaque composé.

Les résultats obtenus par le laboratoire de Nantes sont donnés pour la somme des dioxines et furanes et pour la somme des cPCB, le détail pour chacune des 29 substances n'a pas été fourni donc une comparaison de chaque composé n'a pas pu être effectuée. Les valeurs obtenues par le laboratoire de Nantes ainsi que les valeurs obtenues pour l'essai de brochet sont représentées dans le Tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8: Comparaison des résultats obtenus pour les dioxines, furanes et cPCB

	Somme des dioxines et furanes [pg/g]	Somme des cPCB [pg/g]
Laboratoire de Nantes	0.08	0.74
Laboratoire cantonal de Genève	0	0.41

Il est à noter que les résultats obtenus sont inférieurs de 45% aux résultats fournis par le laboratoire de Nantes. Cela peut s'expliquer par l'appareillage utilisé, en effet le laboratoire de Nantes dispose d'un GC-MS haute résolution ce qui permet d'atteindre des limites de détection beaucoup plus basses. Cependant les teneurs maximales autorisées étant de 4.0 pg/g pour la somme des dioxines et furanes et de 8.0 pg/g pour la somme des dioxines, furanes et PCB de type dioxine, la sensibilité de la méthode analytique est donc plus que suffisante puisqu'il est possible de détecter les cPCB à une concentration de 0.41 [pg/g].

4 Conclusion & perspectives

Dans l'ensemble, la méthode proposée en partant d'une prise d'échantillon de 10g purifiée par GPC et injectée sur une colonne de 60m en splitless pulsé à 3 μ l à 80°C, une température initiale de 80°C augmentée de 40°C/min jusqu'à 170°C, puis de 5°C/min jusqu'à 320°C et maintenu à cette température pendant 20min avec une ionisation par impact électronique avec une énergie de 70 eV fournit la séparation nécessaire pour l'analyse des cPCB, dioxines et furanes.

En termes de perspectives, il reste encore à faire la validation complète avant de pouvoir l'utiliser en routine.

Si cette méthode s'avère adéquate pour la chair des poissons, il est tout à fait envisageable de l'adapter à d'autres matrices comme les produits carnés, les œufs ou encore les produits laitiers.

Une amélioration dans la méthode peut être apportée en utilisant un autre type d'injecteur, le PTV (vaporiseur à température variable) qui permettrait dans le cadre de ce projet, d'injecter des volumes plus importants, 20 μ l d'échantillon par exemple dans le cadre de notre méthode. L'échantillon est injecté à froid dans un liner contenant de la laine de verre et grâce au programme de température, le solvant est évaporé puis la totalité de l'échantillon concentré est injecté dans la colonne après une augmentation rapide de la température de l'injecteur [12], [13].

Cette technique permettrait d'apporter une sensibilité encore 10x plus élevée et répondrait ainsi à la demande importante d'avoir des limites de détection toujours plus faibles en analyse environnementale, pharmaceutique et analyse des denrées alimentaires.

5 Bibliographie

- [1] Organisation mondiale de la Santé, Les dioxines et leurs effets sur la santé, Aide mémoire N°225, novembre 2007.
- [2] Communication de l'Office fédérale de la santé publique, première réunion du groupe de travail à Berne "PCB dans les eaux et les poissons", 02.04.08.
- [3] A. Pichard *et al.*, INERIS, version n°2, p1-70, 2005.
www.ineris.fr/index.php?module=doc&action=getFile&id=2454
- [4] R.E. Alcock et K.C. Jones, Dioxins in the environment, *Environmental. Science and Technology*, review, 30, p.3133-3143, 1996.
- [5] E. De Pauw *et al*, Dioxine: de la crise à la réalité, Editions de l'ULG, p.9-31, 2000
- [6] Office fédéral de la santé publique, PCB et dioxines dans les denrées alimentaires, p.1-7, 2008.
- [7] Convention de Stockholm signée le 22 mai 2001
- [8] Journal officiel de l'Union Européenne, Règlement (CE) No 1881/2006 de la commission du 19 décembre portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, L364, p17-20, 2006
- [9] Office fédéral de la santé publique, Dioxine und PCB in Schweizer Lebensmitteln, p.1-32, 2008
- [10] D. A. Skoog *et al*, Principes d'analyse instrumentale, 5^e édition De Boeck, p.255-261, 2003
- [11] Waters Corporation, Chromatographie en phase gazeuse & spectrométrie de masse, Description de l'instrument et fonctionnalités, Formation, p.1-46, 2007
- [12] W. Engewald *et al*, Programmed temperature vaporisers-based large volume injection in capillary gas chromatography, Elsevier, Review, Journal of Chromatography A, 842, p.143-161, 1998
- [13] E. Hoh, K. Mastovska, Large volume injection techniques in capillary gas chromatography, Elsevier, Review, Journal of Chromatography A 1186, p.2-15, 2008
- [14] E. Eljarrat, D. Barceló, Congener-specific determination of dioxins and related compounds by gas chromatography coupled to LRMS, HRMS, MS/MS and TOFMS, Journal of Mass Spectrometry, 37, p.1105-1117, 2002
- [15] C. Pirard *et al*, New strategy for comprehensive analysis of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls by gas chromatography coupled with mass spectrometry, Elsevier, Journal of Chromatography A, 998, p.169-181, 2003

- [16] J.-F. Focant *et al*, Fast clean-up for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls analysis of high-fat-content biological samples, Elsevier, Journal of Chromatography A, 925, p.207-221, 2001
- [17] C. Naert, C. Van Peteghem, Development and application of a simplified clean-up procedure for the determination of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in horse fat by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), Food Additives and Contaminants, 24(9), p.1018-1025, 2007.
- [18] L. Luosujärvi *et al*, Gas chromatography/mass spectrometry of polychlorinated biphenyls using atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization microchips, Rapid Communications in Mass spectrometry, 22, p.425-431, 2008
- [19] J. Dmitrovic, S. C. Chan, Determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry after sample clean-up by solid-phase extraction, Elsevier, Journal of Chromatography B, 778 p.147-155, 2002
- [20] H. Kotsas, K. Pekari, Determination of polychlorinated biphenyls in serum using gas chromatography–mass spectrometry with negative chemical ionization for exposure estimation, Elsevier, Journal of Chromatography B, 791, p.117-125, 2003

6 Annexe

- Annexe 1 Journal officiel de l'Union Européenne
- Annexe 2 Les courbes de calibrations sont disponibles au Service de la consommation et des affaires vétérinaires
- Annexe 3 Méthode GPC disponible au Service de la consommation et des affaires vétérinaires
- Annexe 4 Chromatogrammes des essais de brochet non dopés et dopés
- Annexe 5 Tous les chromatogrammes sont disponibles au Service de la consommation et des affaires vétérinaires
- Annexe 6 Feuilles de calculs Excel

Signature:

Jessica Muller

Annexe 1 : Journal officiel de l'Union Européenne

20.12.2006

FR

Journal officiel de l'Union européenne

L 364/21

Denrées alimentaires ⁽¹⁾		Teneurs maximales (mg/kg de poids à l'état frais)
3.4.3	Aliments pour bébés et préparations à base de céréales en conserve destinés aux nourrissons et enfants en bas âge, à l'exclusion des produits séchés et en poudre ⁽²⁾ ⁽²⁹⁾	50
3.4.4	Préparations pour nourrissons et préparations de suite en conserve (y compris le lait pour nourrissons et le lait de suite), à l'exclusion des produits séchés et en poudre ⁽⁸⁾ ⁽²⁹⁾	50
3.4.5	Aliments diététiques en conserve destinés à des fins médicales spéciales ⁽⁹⁾ ⁽²⁹⁾ , spécifiquement pour les nourrissons, à l'exclusion des produits séchés et en poudre	50

Section 4: 3-monochloro-propane-1,2-diol (3-MCPD)

Denrées alimentaires ⁽¹⁾		Teneurs maximales (µg/kg)
4.1	Protéine végétale hydrolysée ⁽³⁰⁾	20
4.2	Sauce de soja ⁽³⁰⁾	20

Section 5: Dioxines et PCB ⁽³¹⁾

Denrées alimentaires		Teneurs maximales	
		Somme des dioxines (OMS-PCDD/F-TEQ) ⁽³²⁾	Somme des dioxines et PCB de type dioxine (OMS-PCDD/F-PCB- TEQ) ⁽³²⁾
5.1	Viandes et produits à base de viande (à l'exclusion des abats comestibles) provenant des animaux suivants ⁽⁶⁾ : — bovins et ovins — volailles — porcs	3,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾ 2,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾ 1,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾	4,5 pg/g de graisses ⁽³³⁾ 4,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾ 1,5 pg/g de graisses ⁽³³⁾
5.2	Foies des animaux terrestres visés au point 5.1 ⁽⁶⁾ et produits dérivés de ces foies	6,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾	12,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾
5.3	Chair musculaire de poisson et produits de la pêche et produits dérivés, à l'exclusion des anguilles ⁽²⁵⁾ ⁽³⁴⁾ . La teneur maximale s'applique aux crustacés, à l'exception de la chair brune de crabe et à l'exception de la tête et de la chair du thorax du homard et des crustacés de grande taille semblables (<i>Nephropidae</i> et <i>Palinuridae</i>).	4,0 pg/g de poids à l'état frais	8,0 pg/g de poids à l'état frais
5.4	Chair musculaire d'anguille (<i>Anguilla anguilla</i>) et produits dérivés	4,0 pg/g de poids à l'état frais	12,0 pg/g de poids à l'état frais
5.5	Lait cru ⁽⁶⁾ et produits laitiers ⁽⁶⁾ , y compris matière grasse butyrique	3,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾	6,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾

Annexe 1 : Journal officiel de l'Union Européenne

L 364/22

FR

Journal officiel de l'Union européenne

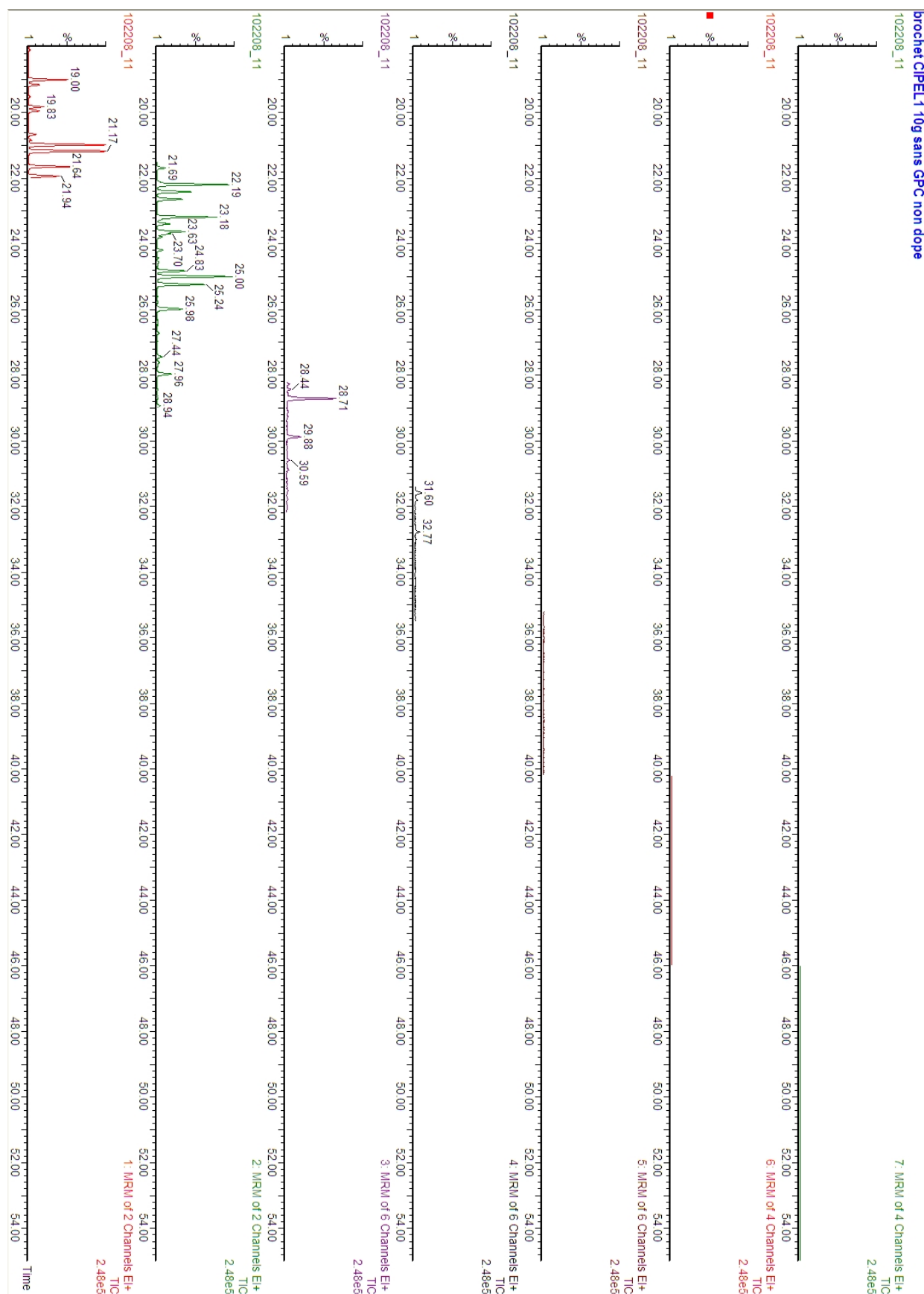
20.12.2006

Denrées alimentaires		Teneurs maximales	
		Somme des dioxines (OMS-PCDD/F-TEQ) ⁽¹²⁾	Somme des dioxines et PCB de type dioxine (OMS-PCDD/F-PCB-TEQ) ⁽¹²⁾
5.6	Ceufs de poule et ovoproducts ⁽⁶⁾	3,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾	6,0 pg/g de graisses ⁽³³⁾
5.7	Graisses des animaux suivants: — bovins et ovins — volailles — porcs	3,0 pg/g de graisses 2,0 pg/g de graisses 1,0 pg/g de graisses	4,5 pg/g de graisses 4,0 pg/g de graisses 1,5 pg/g de graisses
5.8	Graisses animales mélangées	2,0 pg/g de graisses	3,0 pg/g de graisses
5.9	Huiles et graisses végétales	0,75 pg/g de graisses	1,5 pg/g de graisses
5.10	Huiles marines (huile de corps de poisson, huile de foie de poisson et huiles d'autres organismes marins destinés à être consommés par l'homme)	2,0 pg/g de graisses	10,0 pg/g de graisses

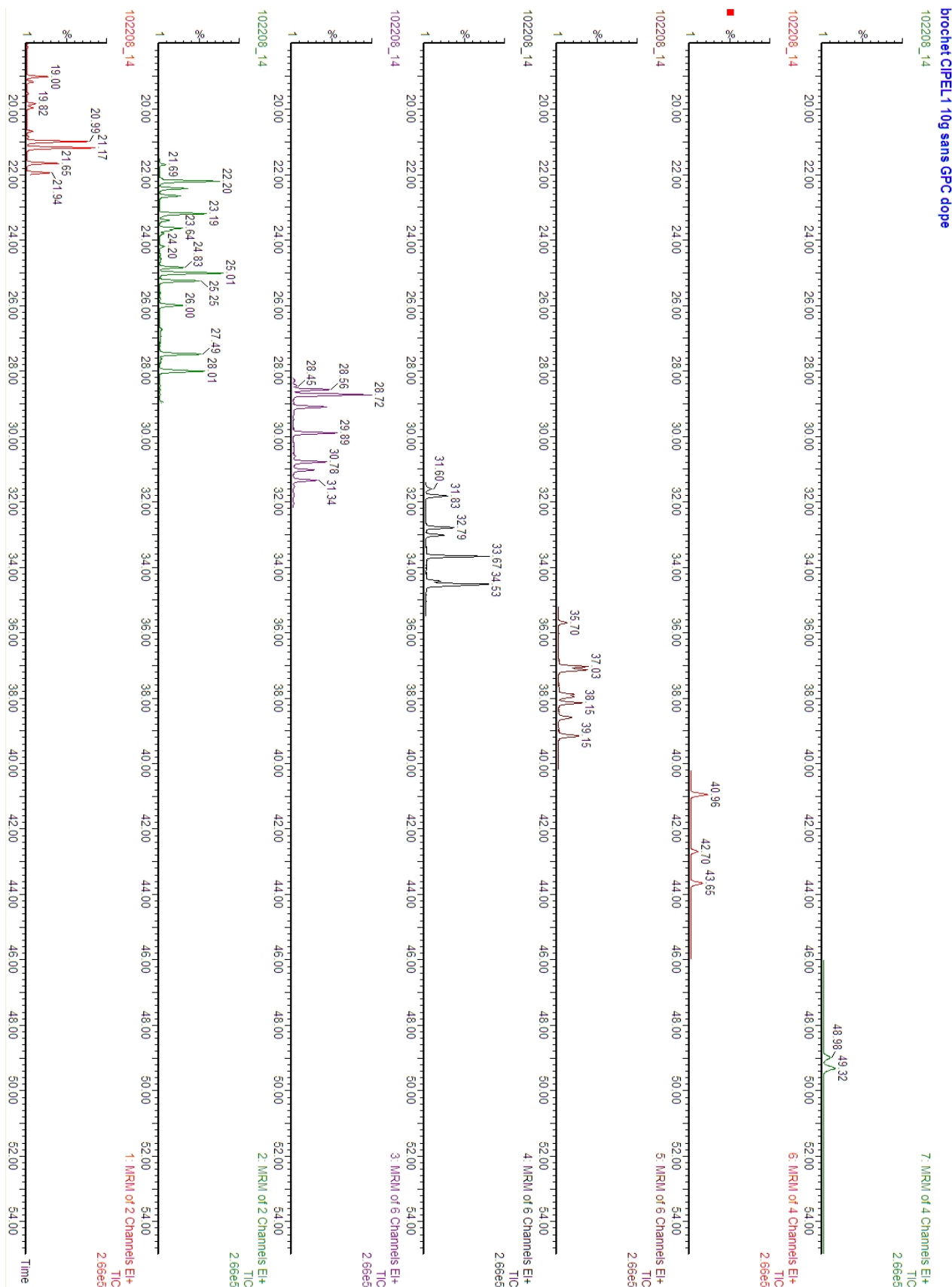
Section 6: Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Denrées alimentaires		Teneurs maximales (µg/kg de poids à l'état frais)
6.1	Benzo(a)pyrène ⁽³⁵⁾	
6.1.1	Huiles et graisses (à l'exclusion du beurre de cacao) destinées à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2,0
6.1.2	Viandes fumées et produits de viande fumés	5,0
6.1.3	Chair musculaire de poissons fumés et produits de la pêche fumés ⁽²⁵⁾ ⁽³⁶⁾ , à l'exclusion des mollusques bivalves. La teneur maximale s'applique aux crustacés fumés, à l'exception de la chair brune de crabe et à l'exception de la tête et de la chair du thorax du homard et des crustacés de grande taille semblables (<i>Nephropidae</i> et <i>Palinuridae</i>)	5,0
6.1.4	Chair musculaire de poissons ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ non fumés	2,0
6.1.5	Crustacés et céphalopodes non fumés ⁽²⁶⁾ . La teneur maximale s'applique aux crustacés, à l'exception de la chair brune de crabe et à l'exception de la tête et de la chair du thorax du homard et des crustacés de grande taille semblables (<i>Nephropidae</i> et <i>Palinuridae</i>)	5,0
6.1.6	Mollusques bivalves ⁽²⁶⁾	10,0
6.1.7	Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge ⁽³⁾ ⁽²⁹⁾	1,0
6.1.8	Préparations pour nourrissons et préparations de suite, y compris le lait pour nourrissons et le lait de suite ⁽⁸⁾ ⁽²⁹⁾	1,0
6.1.9	Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales ⁽⁹⁾ ⁽²⁹⁾ spécifiquement pour les nourrissons	1,0

Annexe 4 : Chromatogrammes des essais de brochet non dopés



Annexe 4 : Chromatogrammes des essais de brochet dopés



Annexe 6 : Feuille de calcul

Dibenzo-p-dioxine

	2,3,7,8-TCDD DD048	1,2,3,7,8-PeCDD DD054	1,2,3,4,7,8-HxCDD DD066	1,2,3,6,7,8-HxCDD DD067	1,2,3,7,8,9-HxCDD DD070	1,2,3,4,6,7,8- HpCDD DD073	OCDD DD075	Somme Dioxne	Somme dioxine OMS- TEF05
Brochet CIPeL3 10g dans 50µl (essai)	pg/g 0.0	pg/g 0.0	pg/g 0.0	pg/g 0.0	pg/g 0.0	pg/g 0.0	pg/g 0.0	pg/g 0.0	pg/g 0.0
Brochet CIPeL3 50g dans 50µl (dopé 200ppb)	10.3	20.8	24.4	24.4	27.7	15.6	34.1	157.3	38.9
WHO₀₅-TEF	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.0003		
Brochet CIPeL3 10g dans 100µl (dopé à 100ppb)	868.0	1800.0	1973.0	1572.0	1780.0	1695.0	3817.0	13505.0	3218.6
Brochet CIPeL3 10g dans 100µl (dopé à 100ppb)	817.0	1715.0	1712.0	1508.0	1560.0	1464.0	3326.0	12102.0	3025.6
Moyenne	842.5	1757.5	1842.5	1540.0	1670.0	1579.5	3571.5	12803.5	3122.1
Brochet CIPeL3 10g dans 100µl (non dopé)	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	1.7	0.2
Brochet CIPeL3 10g dans 100µl (non dopé)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Moyenne	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.9	0.1
Rendement	84.3	70.3	73.7	61.6	66.8	63.2	71.4		
dioxines furanes	0	0	0	dioxines furanes	0	0	0		
PCB81	90	90	90	PCB81	0.027	0.027			
PCB77	203	203	203	PCB77	0.0203	0.0203			
PCB123	0	0	0	PCB123	0	0			
PCB118	417	417	417	PCB118	0.01251	0.01251			
PCB114	18	18	18	PCB114	0.00054	0.00054			
PCB105	136	136	136	PCB105	0.004065	0.004065			
PCB126	0	0	0	PCB126	0	0			
PCB167	33	33	33	PCB167	0.000975	0.000975			
PCB156	40	40	40	PCB156	0.0012	0.0012			
PCB157	13	13	13	PCB157	0.00039	0.00039			
PCB169	12	12	12	PCB169	0.345	0.345			
PCB189	6	6	6	PCB189	0.000165	0.000165			

Annexe 6 : Feuille de calcul

Dibenzofurane

2,3,7,8-TCDF DF083	1,2,3,7,8-PeCDF DF094	2,3,4,7,8-PeCDF DF114	1,2,3,4,7,8-HxCDF DF118	1,2,3,6,7,8-HxCDF DF121	2,3,4,6,7,8-HxCDF DF130	1,2,3,7,8,9-HxCDF DF124	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF DF131	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF DF134	OCDF DF135	Somme Furane	Somme Furane OMS-TEF	Somme Dioxine + Furane	Somme WHO05-TEQ Dioxine + Furane
pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g		pg/g	pg/g
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11.9	28.4	26.5	29.5	25.4	31.8	19.3	22.1	8.2	15.4	218.5	20.9	375.8	59.8
0.1	0.03	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.0003				
844.0	2008.0	1919.0	1908.0	1800.0	1765.0	1789.0	1790.0	1685.0	3603.0	19111.0	1482.4	32616.0	4701.0
796.0	1892.0	1744.0	1626.0	1710.0	1605.0	1571.0	1504.0	3164.0		15612.0	1357.4	27714.0	4383.1
820.0	1950.0	1831.5	1767.0	1755.0	1685.0	1680.0	1647.0	2424.5	3603.0	19163.0	1420.4	31966.5	4542.6
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.2
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.1
82.0	78.0	73.3	70.7	70.2	67.4	67.2	65.9	97.0	72.1				

Annexe 6 : Feuille de calcul

cPCB

cPCB 081	cPCB 077	cPCB 123	cPCB 118	cPCB 114	cPCB 105	cPCB 126	cPCB 167	cPCB 156	cPCB 157	cPCB 169	cPCB 189	Somme cPCB	Somme WHO05-TEQ cPCB	Somme WHO05-TEQ PCDD/PCDF/PCB
pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g	pg/g
90.0	203.0	0.0	417.0	18.0	135.5	0.0	32.5	40.0	13.0	11.5	5.5	966.0	0.41	0.41
449.0	491.0	272.5	477.0	215.0	291.0	192.5	185.5	188.5	165.0	153.5	159.0	3239.5	24.10	83.91
0.0003	0.0001	0.00003	0.00003	0.00003	0.00003	0.1	0.00003	0.00003	0.00003	0.03	0.00003			
1010.0	1266.0	940.0	1969.0	941.0	1241.0	865.0	904.0	881.0	784.0	718.0	703.0	12222.0	108.72	4809.69
979.0	1227.0	918.0	1890.0	933.0	1160.0	807.0	859.0	836.0	730.0	656.0	610.0	11605.0	101.03	4484.11
994.5	1246.5	929.0	1929.5	937.0	1200.5	836.0	881.5	858.5	757.0	687.0	656.5	11913.5	104.88	4647.44
118.0	366.0	87.0	1227.0	50.0	383.0	36.0	108.0	132.0	44.0	0.0	2.0	2553.0	3.73	3.90
106.0	336.0	87.0	1105.0	47.0	366.0	37.0	94.0	109.0	29.0	0.0	0.0	2316.0	3.82	3.82
112.0	351.0	87.0	1166.0	48.5	374.5	36.5	101.0	120.5	36.5	0.0	1.0	2434.5	3.78	3.86
88.3	89.6	84.2	76.4	88.9	82.6	80.0	78.1	73.8	72.1	68.7	65.6			