



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

**GESTION DURABLE  
DE LA MER DU NORD**



26108

V.L.I.Z. (VZW)  
VLAAMS INSTITUUT VOOR DE ZEE  
FLANDERS MARINE INSTITUUT  
Oostende - Belgium

**Université de Liège  
Département de Chimie Physique  
Laboratoire de spectrométrie de Masse**

**DEVELOPPEMENT DE METHODES D'ANALYSE  
DES HYDROCARBURES ET MICROPOLLUANTS  
ORGANIQUES EN MILIEU MARIN**

**Programme S.S.T.C. "Gestion durable de la Mer du Nord"**

Contrat de recherche MN/DD/85

**RAPPORT FINAL**

JANVIER 2001

Houziaux J.-S., assistant de recherche  
De Pauw, E., Chargé de cours, Directeur

1	INTRODUCTION.....	1
2	SYNTHÈSE DU RAPPORT D'ACTIVITÉS DE LA PREMIÈRE ANNÉE.....	1
3	OBJECTIFS FIXÉS POUR LA SECONDE ANNÉE.....	2
4	OPTIMISATIONS SUR LA MÉTHODE D'ANALYSE DES TISSUS BIOLOGIQUES ET VALIDATION.....	2
4.1	OPTIMISATION DE LA COLONNE DE GPC.....	2
4.2	VALIDATION DE LA MÉTHODE.....	2
4.2.1	Validation sur échantillons de contrôle qualité « Home made ».....	2
4.2.2	Exercice d'inter-calibration Quasimeme.....	3
4.3	REMPLACEMENT DE LA COLONNE DE GPC PAR L'INTÉGRATION D'UNE COLONNE "HCDS" AU « POWER-PREP ».....	8
4.3.1	Etude de comparaison GPC / HCDS sur deux matrices grasses.....	9
4.3.2	Validation de la colonne HCDS sur échantillons de contrôle qualité « home made ».....	12
4.3.3	Conclusion.....	12
5	IMPLÉMENTATION D'UNE MÉTHODE DE DÉTERMINATION LIPIDIQUE.....	13
5.1	DESCRIPTION DE LA MÉTHODE SELON SMEDES.....	13
5.2	TESTS AU LABORATOIRE.....	15
5.3	RÉSULTATS D'INTERCALIBRATION QUASIMEME.....	15
6	DÉVELOPPEMENT ET IMPLÉMENTATION D'UNE TECHNIQUE D'ANALYSE DANS LES SÉDIMENTS.....	15
6.1	DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DE RÉFÉRENCE.....	15
6.1.1	Désavantages de la méthode:.....	16
6.1.2	Résultats obtenus :.....	16
6.2	MÉTHODE 2 : REMPLACEMENT DES COLONNES MANUELLES PAR LE « POWER-PREP ».....	16
6.2.1	Exercice d'inter-calibration "Ontario/2000".....	17
6.2.2	Exercice d'inter-calibration "Umea/2000).....	17
6.2.3	Analyse des résultats.....	17
6.2.4	Conclusion des essais:.....	22
6.3	MÉTHODE 3 : REMPLACEMENT DES LAVAGES ACIDES PAR UNE ÉTAPE DE GPC SEMI-AUTOMATISÉE.....	23
6.4	CONCLUSIONS SUR L'ANALYSE DES SÉDIMENTS.....	24
7	ANALYSES RÉALISÉES SUR ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	24
7.1	ANALYSES DE MAMMIFÈRES MARINS.....	25
7.1.1	Cachalots <i>Physeter macrocephalus</i> .....	25
7.1.2	Marsouins communs <i>Phocoena phocoena</i> .....	29
7.2	ANALYSES D'ASTERIES <i>ASTERIAS RUBENS</i> .....	31
7.2.1	Observations analytiques.....	31
7.2.2	Patterns de contamination.....	31
7.2.3	Patterns TEQ.....	33
7.3	DIVERS ORGANISMES AQUATIQUES.....	34
7.3.1	Observations chez diverses espèces de poissons.....	34
7.3.2	Observations dans des échantillons de crevettes.....	36
7.4	CONCLUSIONS SUR LES ANALYSES RÉALISÉES.....	37
8	ETUDE DE MÉTHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE.....	37
9	CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	39

## 1 Introduction.

Le laboratoire de spectrométrie masse de l'Université de Liège dispose de l'expérience et de l'équipement nécessaire à l'analyse de micropolluants organiques. Dans le cadre de l'appel à propositions du programme "Gestion durable de la Mer du Nord", les objectifs étaient de développer des méthodes d'analyse des micropolluants organiques et la recherche de biomarqueurs.

En concertation avec les laboratoires intéressés par notre projet, nous avons commencé par mettre au point des méthodes d'analyses des dioxines, furannes (2,3,7,8-PCDD/F) et PCB coplanaires dans les matrices marines. D'une part, ces composés dits "dioxin-like" présentent une toxicité importante à faible concentration, dont les effets chez les animaux sont diversifiés (effets sur les systèmes endocrinien, reproducteur, immunitaire, etc.). D'autre part, on sait que les organismes marins, en particulier les mammifères, présentent des niveaux très élevés en ces contaminants. Enfin, il existait un manque évident de données pour ce qui concerne la Mer du Nord, entre autres au niveau des produits de la pêche (poissons, crustacés et mollusques), qui concernent directement la santé humaine. Notre objectif majeur était de mettre au point une méthode fiable, rapide et peu onéreuse, permettant de faire ces mesures dans différents organismes vivants.

Au cours de la première année de ce travail est survenue la "crise de la dioxine". Cet évènement a mis en avant les craintes des consommateurs vis-à-vis de ces composés et les risques liés à leur ingestion. Dans ce cadre, notre laboratoire a reçu, avec la méthode mise au point dans le cadre du présent projet, un agrément pour les mesures dans les graisses d'origine animale. Par la suite (novembre 2000), le laboratoire a été audité par l'organisme BELTEST en vue de mesures dans ce type d'échantillon.

Par ailleurs, une demande existe pour l'analyse de ces composés "dioxin-like" dans le cadre de l'étude de leur répartition en Mer du Nord. Dans cette optique, nous avons également entrepris la mise au point de méthodes d'analyse dans les sédiments et certains organismes benthiques (Astéries).

Nous avons tout d'abord mis au point et optimisé des techniques de préparation d'échantillon (homogénéisation, extraction, purification) rapides et automatisées. Etant donné les ordres de grandeurs recherchés (de l'ordre du  $10^{-12}$  g / g de produit), la mesure est réalisée par spectrométrie de masse de haute-résolution ("HRMS"). Le laboratoire a également porté ses efforts sur le développement de méthodes d'analyse alternatives, rapides et moins coûteuses, susceptibles d'être utilisées lors d'un programme de monitoring à plus grande échelle. Il s'agit d'une part de méthodes biochimiques de détection des composés "dioxin-like" (tests d'immuno-affinité), et d'autre part de la spectrométrie de masse en tandem ("MS-MS").

## 2 Synthèse du rapport d'activités de la première année.

En raison du manque de données sur les composés "dioxin-like" en Mer du Nord, il avait été décidé de focaliser nos travaux sur ceux-ci. Nous avons mis au point une méthode de d'analyse des PCDD/Fs et cPCBs dans les matrices biologiques grasses qui peut être résumée en 5 étapes :

1. Cryo-homogénéisation et lyophilisation.
2. Extraction par technique « Accelerated Solvent Extraction », en abrégé « ASE », automatisée, en lieu et place du Soxhlet.
3. Pré-purification par Gel Permeation Chromatography « GPC » semi-automatisée.

4. Purification par élution automatisée sur trois colonnes chromatographiques successives (robot "Power-Prep" à colonnes jetables (silice, alumine, charbon) , FMS, USA), en lieu et place de deux colonnes préparées au laboratoire.

5. Concentration finale et analyse par GC/HRMS (colonne DB5-MS 30m).

Quelques échantillons ont fait l'objet d'analyses qui se sont avérées concluantes.

### **3 Objectifs fixés pour la seconde année.**

1. Terminer l'optimisation de la méthode d'analyse d'échantillons biologiques et valider la méthode.

3. Implémenter au laboratoire une technique de détermination lipidique.

4. Mettre au point une méthode d'analyse d'échantillons de sédiments.

5. Réaliser des analyses sur différents types de matrices biologiques.

6. Etudier la possibilité d'appliquer des méthodes d'analyse alternatives plus rapides et moins coûteuses.

### **4 Optimisations sur la méthode d'analyse des tissus biologiques et validation.**

#### ***4.1 Optimisation de la colonne de GPC.***

Nous avons décrit dans notre premier rapport la mise au point d'un système de pré-purification par « Gel Permeation Chromatography », « GPC ». Un système de chromatographie en basse pression semi-automatisé a été implémenté au laboratoire.

Suite à nos essais, une compression supplémentaire de la phase de la colonne GPC (70 g de « Bio-Beads S-X3 », Bio-Rad, USA) a été réalisée, en ajustant les plongeurs à une hauteur de 39cm (diamètre interne : 2,5 cm). De cette manière, le volume mort en tête de colonne a été complètement supprimé. Le chargement de l'échantillon (jusqu'à 4,2 g de graisse dans 10 ml de solvant) à 5 ml/mn a été maintenu. Les taux de réapparition du standard interne sont compris entre 60 et 100 %. La colonne permet ainsi de traiter au moins une soixantaine d'échantillons de graisses animales de toutes origines sans changement de phase.

En outre, la technique de GPC est intéressante dans la mesure où l'élution des micro-polluants organiques ciblés est indépendante de la matrice. C'est la raison pour laquelle nous envisageons de l'utiliser pour le traitement d'échantillons de sédiments (cf point 6.3)

#### ***4.2 Validation de la méthode.***

##### **4.2.1 Validation sur échantillons de contrôle qualité « Home made ».**

La méthode d'analyse décrite (GPC/Powerprep/GC-HRMS) a été validée pour l'analyse de PCDD/Fs dans les graisses animales. Pour ce faire, un échantillon de contrôle de la qualité ("QC") a été réalisé au laboratoire, par dopage de 500 g de graisse de bœuf avec une quantité connue de PCDD/Fs. Cette graisse dopée a été homogénéisée puis aliquotée en une centaine d'ampoules contenant chacune environ 4g de graisse. Ces échantillons de « QC » sont analysés régulièrement avec les échantillons de denrées alimentaires, afin de suivre l'évolution de la précision des résultats rendus. Pour ce faire, les résultats de QC (total TEQ / g graisse) sont inclus dans une carte de contrôle dans laquelle apparaissent les intervalles de confiance à 95 et 99 %.

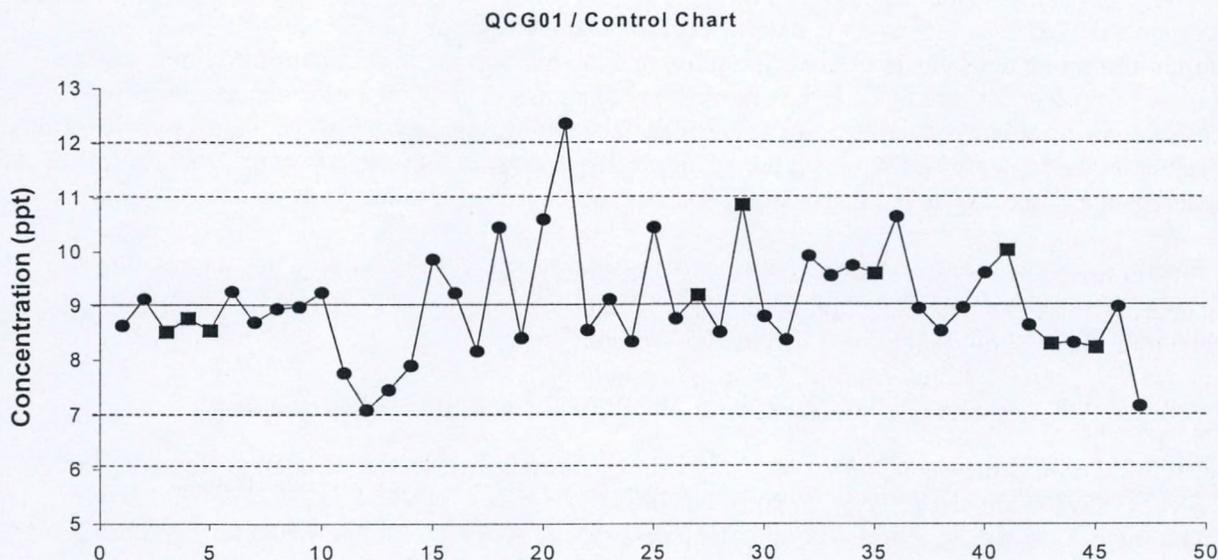


Fig. 1 : Carte de contrôle de l'échantillon de contrôle qualité « QCG01 ». Chacun des points représente une la valeur totale (exprimée en pg TEQ/ g graisse) obtenue lors de la mesure. Les intervalles de confiance à 95% et 99% sont représentés. ● : pré-purification de l'échantillon par GPC ; ■ : pré-purification de l'échantillon par colonne HCDS sur « Power-Prep ».

La figure 1 reprend l'ensemble des résultats de reproductibilité obtenus sur l'échantillon de contrôle « QCG01 », exprimé en pg TEQ / g graisse, avec cette méthode. Quelques points ont été réalisés sur colonne HCDS plutôt qu'en GPC (cf point 3.3). On constate une erreur de mesure toujours inférieure à 20 % sur le TEQ des aliquots. Une seule mesure sort de l'intervalle de confiance à 95 %, ce phénomène ne s'est pas reproduit. En tenant compte du fait que ces analyses sont réalisées à des moments différents, c'est-à-dire incluses dans des séries d'échantillons réels, et par des opérateurs différents, on constate donc une très bonne reproductibilité de la méthode de purification testée.

Par conséquent, la méthode de purification et d'analyse GC-HRMS peut être considérée comme validée. Cependant, il n'existe pas encore de matériaux certifiés pour les matrices animales. Par conséquent, il nous est impossible d'apprécier la qualité de l'extraction avec ce type d'échantillon de contrôle qualité. Ce problème a pu être résolu par la participation à un exercice d'inter-calibration « Quasimeme ».

#### 4.2.2 Exercice d'inter-calibration Quasimeme.

##### *4.2.2.1 Objet de l'exercice Quasimeme.*

"Quasimeme" est un projet soutenu par la Communauté Européenne, qui a pour objet le support aux laboratoires européens en matière de qualité des résultats d'analyse. Ce projet propose des exercices annuels permettant aux laboratoires d'évaluer leurs performances analytiques, entre autres pour les dioxines, furannes et cPCBs.

#### Principe d'évaluation des performances :

- Des échantillons, homogénéisés en grandes quantités, sont analysés par des laboratoires de référence, ce qui permet d'assigner des valeurs de concentrations en contaminants ou de paramètres mesurés, assortis d'une marge d'erreur "acceptable". Les laboratoires participants voient leurs performances jugées par comparaison avec cette marge erreur sous forme d'un "z-score" : plus le "z-score" est faible, plus le résultat est acceptable. Un "z-score" inférieur à 2 donne un résultat « satisfaisant », un "z-score" compris entre 2 et 3 donne un résultat « discutable », un "z-score" supérieur à 3 donne un résultat « à rejeter ».
- Cependant, certaines valeurs obtenues par les laboratoires de référence présentent une trop grande incertitude : pour ces valeurs, aucun "z-score" n'est assigné, seule une valeur "indicative" permet au participant de se situer par rapport aux laboratoires de référence.

Pour plus d'information sur ces exercices, consulter le site web : <http://quasimeme.marlab.ac.uk>

L'exercice "BT-3" inclut l'analyse de 2,3,7,8-PCDD/Fs et cPCBs, ainsi que les déterminations lipidiques selon Bligh and Dyer (1959) et Smedes (1999), sur deux échantillons de tissus frais homogénéisés (animaux provenant de zones contaminées). Cet exercice nous permet donc de tester l'ensemble de notre méthode, y compris les phases de lyophilisation et d'extraction au cours desquelles on pourrait craindre des pertes. Nous avons participé à l'exercice 2000 (round 20). Le rapport de cet exercice est présenté en annexe I. Notre laboratoire est repris sous le n° de code Q309A.

#### 4.2.2.2 Résultats.

6 laboratoires, sur 10 inscrits, ont rendu leurs résultats.

Il est important de noter que pour cet exercice en particulier, l'analyse des données ne fait pas appel à des résultats de laboratoires "de référence", étant donné le faible nombre de laboratoires réalisant ces mesures et susceptibles de participer aux exercices Quasimeme (Wells, Com.Pers.). Les valeurs assignées le sont sur base des résultats pour lesquels l'erreur de mesure entre les différents participants est jugée suffisamment faible.

Nous avons rendu un résultat pour chaque congénère ainsi que pour la détermination de « lipides totaux » selon Smedes (résultats : cf point 5). *La détermination de « lipides totaux » suivant Bligh and Dyer (1959) n'a pas été réalisée.*

"QPL005BT" est un échantillon de moule, "QPL006BT" un échantillon de maquereau. Les patterns obtenus sont présentés dans les figures 2 à 5. Pour chaque échantillon, 40 g de tissus ont été prélevés pour l'analyse.

Sur 20 valeurs assignées, nous avons rendu 18 résultats (pas de *lipides selon Bligh and Dyer* dans les deux échantillons) (tableau I). Une valeur (QPL 006 BT, HpCDD) présente un Z-score de 2,44 : résultat "discutable", légèrement supérieur à l'erreur acceptable (fig. 5). En ce qui concerne les 3 PCBs coplanaires, nos résultats satisfont tous aux exigences de l'exercice.

Par conséquent, 94 % (17/18) de nos résultats rendus sont acceptables ce qui nous place second en termes de performances (tableau I). On peut donc considérer la méthode comme excellente.

Lab code	N Obs [Z]<2	% [z]<2 Possible	Lab Code	N Obs Total	% [z]<2 Actual
Q311 A	19	95	Q311A	20	95
Q251A	18	90	Q309A	18	94
Q309A	17	85	Q251A	20	90
Q412A	16	80	Q127A	8	88
Q127A	7	35	Q412A	20	80
Q242A	4	20	Q242A	6	67

Tableau I : classement des participants à l'exercice Quasimeme BT3, round 20 (1999 - 2000). ; code du laboratoire : Q309A.

N Obs [Z]<2 : Nombre d'observations de chaque laboratoire jugées satisfaisantes

% [z]<2 Possible : Nombre de données satisfaisantes en % du nombre total de déterminants avec valeurs assignées

N Obs Total : Nombre d'observations soumise par chaque laboratoire pour lesquelles des valeurs ont été assignées

% [z]<2 Actual : Pourcentage du nombre d'observations soumise jugées satisfaisantes.

Pour ce qui concerne les valeurs indicatives (15 valeurs non assignées sur un total de 35), nous obtenons deux résultats surévalués dans l'échantillon QPL 005 BT (moules), la 2,3,7,8-TCDF et la 2,3,4,7,8-PeCDF (fig 3). Une étude des chromatogrammes montre clairement que cette légère surestimation vient d'une co-élution sur la colonne de GC utilisée (DB5 MS 30 m) (fig. 6 et 7), en raison de la présence en grandes quantités d'isomères chloro-substitués aux positions autres que 2,3,7,8 dans les tetra- et pentachloro-furannes. On distingue la présence des pics parasites ; ceux-ci ne peuvent être résolus, ce qui induit une erreur de quantification. De telles observations d'isomères non-2,3,7,8 chlorosubstitués dans les congénères les moins chlorés ont déjà été signalées dans la littérature pour d'autres invertébrés.

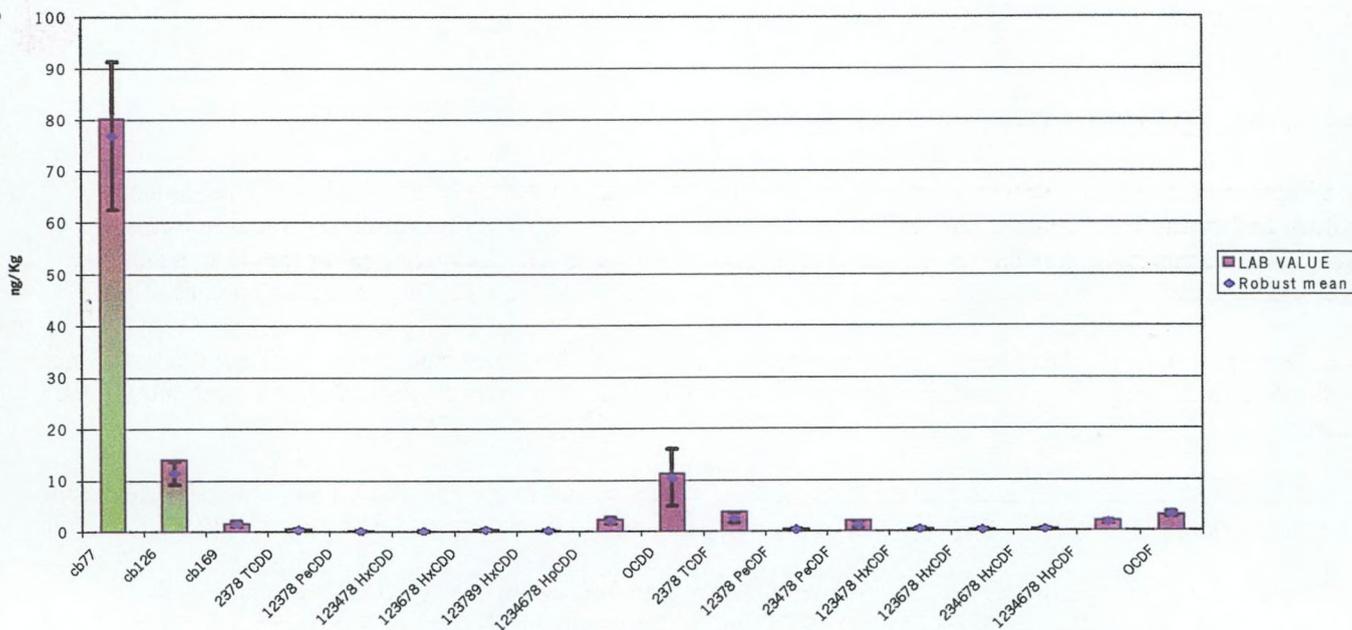


Fig. 2 : Pattern complet mesuré dans l'échantillon QPL005BT (moules). Histogramme : valeurs rendues par notre laboratoire. Points : valeurs moyennes de l'exercice assorties de l'écart-type. En vert dégradé : valeurs assignées pour lesquelles notre résultat est jugé satisfaisant. En bordeau : valeurs indicatives de l'exercice. Les résultats sont exprimés en ng / Kg Poids frais.

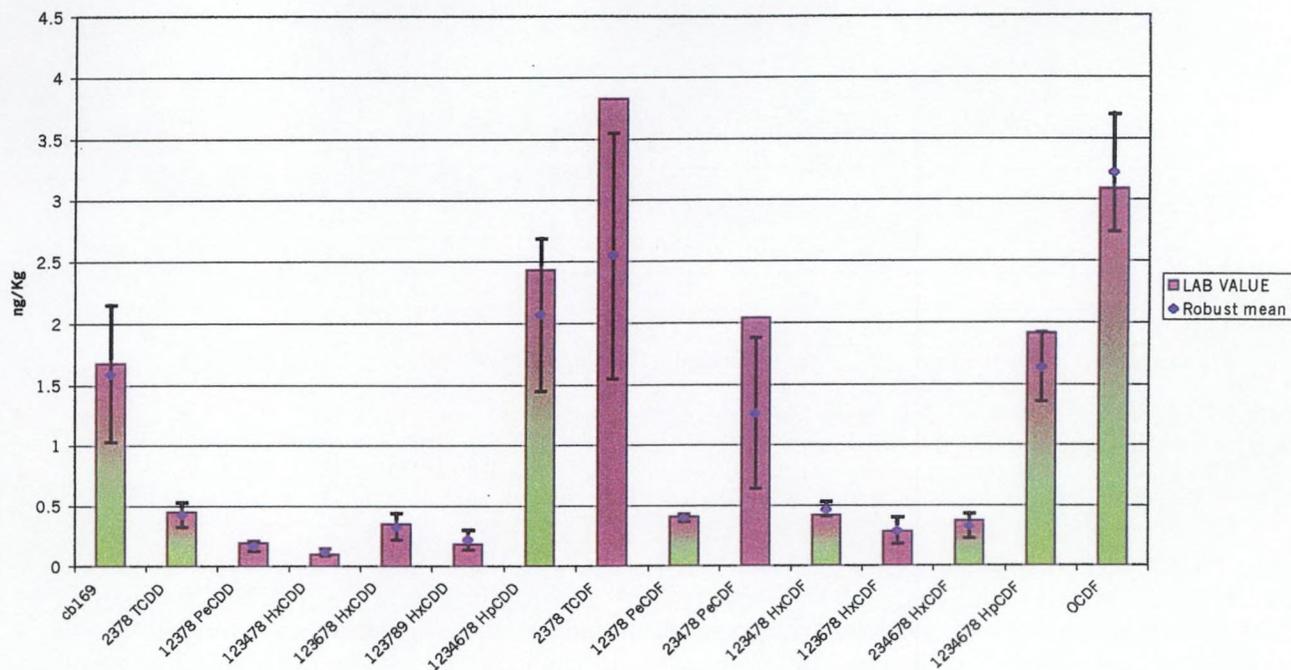


Figure 3 : Pattern obtenu après retrait des valeurs élevées (PCB 77, PCB 126, OCDD) dans QPL005BT. Histogramme : valeurs rendues par notre laboratoire. Points : valeurs moyennes de l'exercice assorties de l'écart-type. En vert dégradé : valeurs assignées pour lesquelles notre résultat est jugé satisfaisant. En bordeaux : valeurs indicatives de l'exercice. Les résultats sont exprimés en ng / Kg Poids frais.

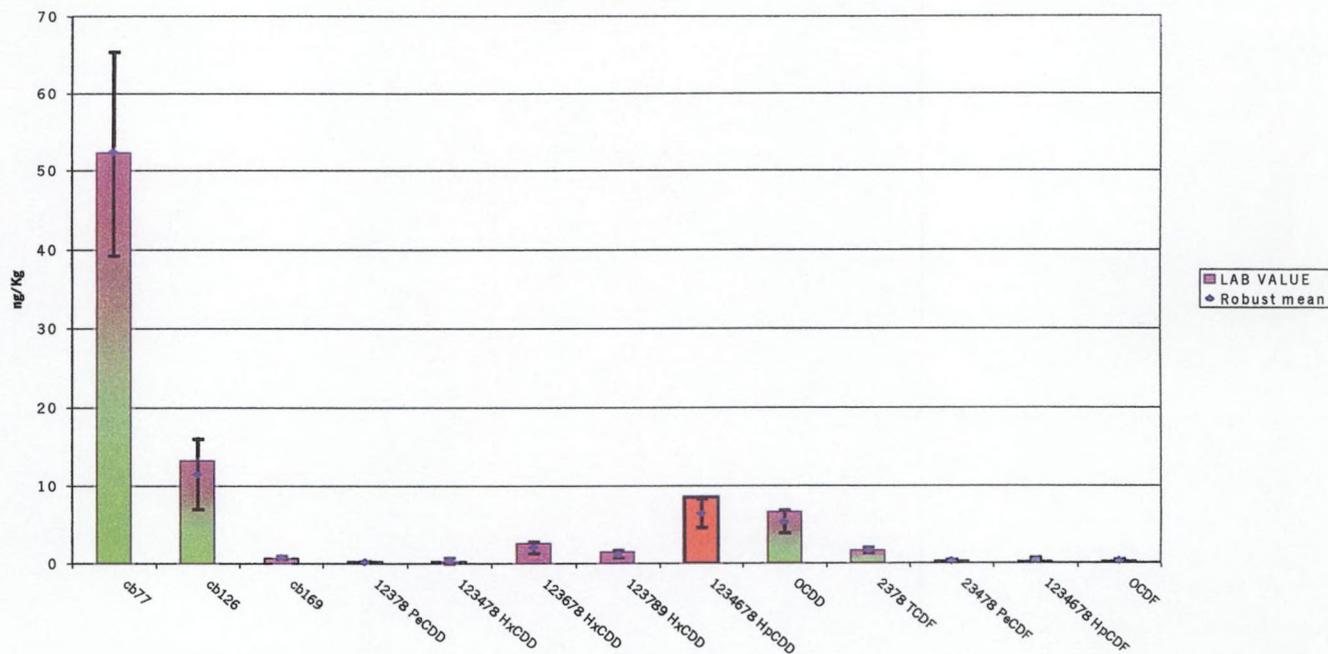


Fig. 4 : Pattern complet mesuré dans l'échantillon QPL006BT (maquereau). Histogramme : valeurs rendues par notre laboratoire. Points : valeurs moyennes de l'exercice assorties de l'écart-type. En vert dégradé : valeurs assignées pour lesquelles notre résultat est jugé satisfaisant. En rouge : valeur assignée pour laquelle notre laboratoire obtient une valeur « discutable ». En bordeaux : valeurs indicatives de l'exercice. Les résultats sont exprimés en ng / Kg Poids frais.

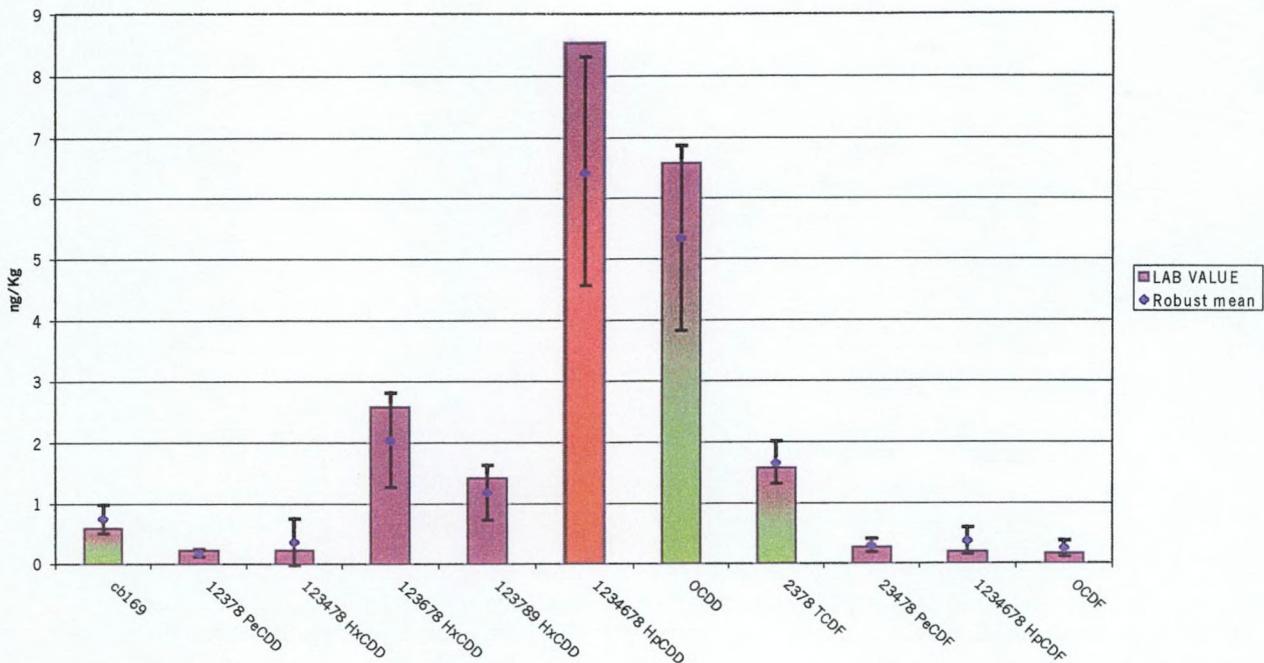


Figure 5 : Pattern obtenu après retrait des valeurs élevées (PCB 77, PCB 126) dans QPL006BT. Histogramme : valeurs rendues par notre laboratoire. Points : valeurs moyennes de l'exercice assorties de l'écart-type. En vert dégradé : valeurs assignées pour lesquelles notre résultat est jugé satisfaisant. En rouge dégradé : valeur assignée pour laquelle notre laboratoire obtient une valeur « discutable ». En bordeaux : valeurs indicatives de l'exercice. Les résultats sont exprimés en ng / Kg Poids frais.

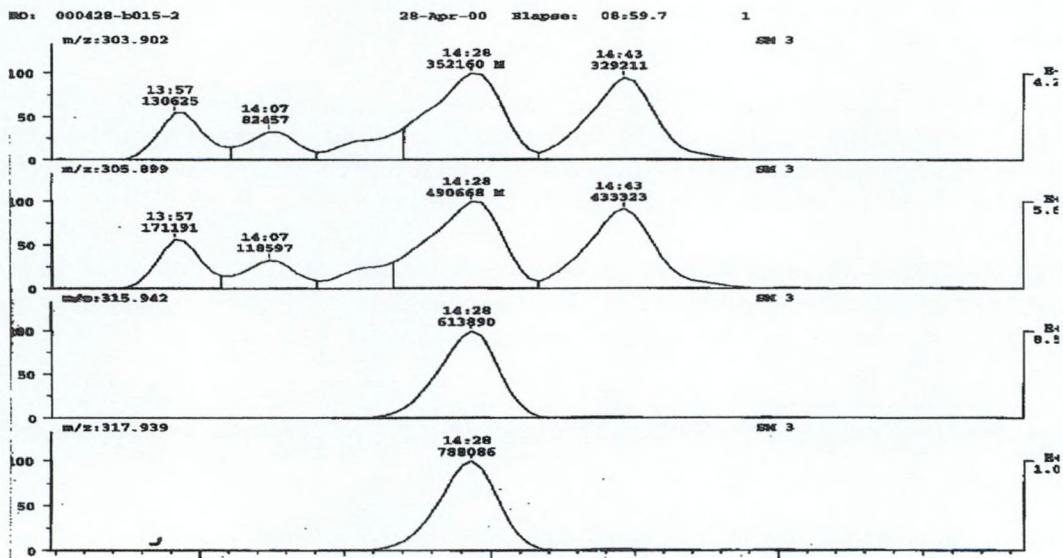


Figure 6 : Chromatogramme GC-HRMS d'éluion des TCDF dans l'échantillon QPL005BT (moules), sur colonne DB5 MS 30 m. Les deux fenêtres supérieures représentent les  $^{12}\text{C}$  TCDF natifs de l'échantillons (2 masses suivies) ; les deux fenêtres inférieures représentent la  $^{13}\text{C}$  TCDF (standard interne). Le pic à 14'28 est la 2,3,7,8-TCDF recherchée dans les 4 fenêtres. On constate une co-élution au niveau de la  $^{12}\text{C}$  2,3,7,8-TCDF, ainsi que la présence d'autres isomères.

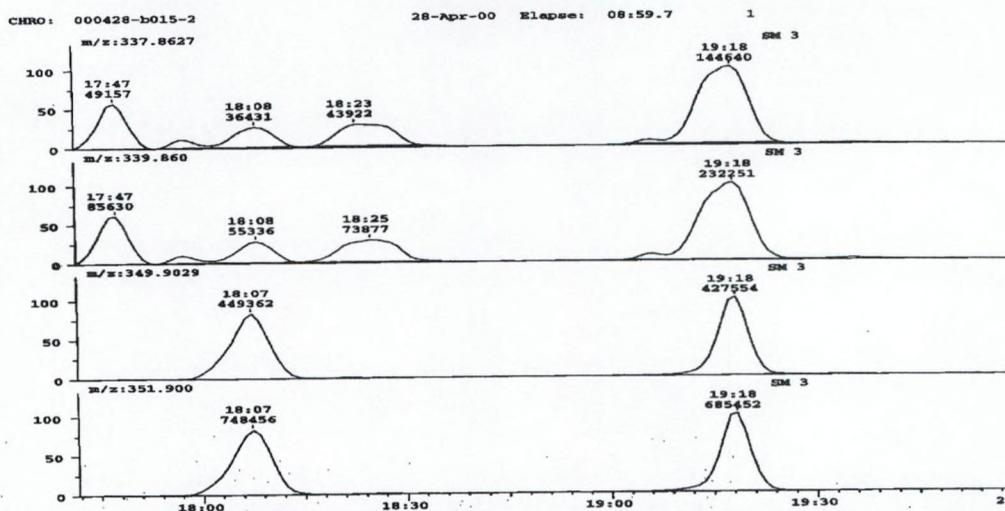


Figure 7 : Chromatogramme GC-MS d'élution des PeCDF dans l'échantillon QPL005BT (moules), sur colonne DB5 MS 30 m. Les deux fenêtres supérieures représentent les  $^{12}\text{C}$  PeCDF natifs de l'échantillon (2 masses suivies) ; les deux fenêtres inférieures représentent les  $^{13}\text{C}$  PeCDF (standard interne). La 1,2,3,7,8-PeCDF (« PeCDF1 ») sort à 18'07, la 2,3,4,7,8-PeCDF (« PeCDF2 ») à 19'18. On constate une co-élution (épaulement) au niveau de la  $^{12}\text{C}$  2,3,4,7,8-PeCDF, ainsi que la présence d'autres isomères.

Ces résultats corroborent nos observations sur les astéries (cf point 6.2) et indiquent que, étant donné l'importante contribution de ces congénères au TEQ (TEF élevé, concentrations importantes), pour tout échantillon d'invertébré, il conviendrait idéalement d'utiliser une colonne plus adaptée à la séparation de ces isomères, en l'occurrence une colonne SP 23-31 60m (HRGC), plus polaire. Cette colonne présente cependant les désavantages majeurs suivants : d'une part, un bruit de fond important apparaît pour les congénères plus chlorés, ce qui a un effet négatif sur les limites de détection. De plus, ces mêmes congénères sortent difficilement de la colonne, ce qui entraîne un élargissement des pics. D'autre part cette colonne se dégrade très rapidement (une trentaine d'échantillons environ).

Un bon compromis, pour ce type d'analyse, pourrait donc résider dans l'utilisation de la colonne DB5 MS 30 m pour les congénères les plus chlorés, tandis qu'une séparation sur SP 23 31 serait appliquée pour les congénères tétra- et pentachlorés. Cependant, le changement de colonne nécessaire accroît les délais de remise de résultats. Cette option devrait faire l'objet de prochaines recherches au laboratoire.

Exception faite de l'imprécision d'analyse sur ces deux congénères, dans ce type d'échantillon (invertébrés), qui nécessitera les aménagements proposés, l'ensemble des résultats obtenus montre donc que la méthode de préparation d'échantillon développée donne d'excellents résultats, ce qui complète notre validation sur « home made » QC.

#### 4.3 Remplacement de la colonne de GPC par l'intégration d'une colonne "HCDS" au « Power-Prep ».

La technique de GPC semi-automatisée peut être considérée comme simple et idéale en pré-purification de matrices grasses avant chromatographie automatisée sur "Power-Prep". Cependant, elle reste déconnectée de ce système, et une concentration de l'échantillon par évaporation rotative est nécessaire afin de changer de solvant (solvant de GPC : acétate d'éthyle / cyclohexane 1/1 ; solvant de chargement au "Power-Prep" : hexane).

FMS (USA) a cette année mis sur la marché une alternative séduisante : la colonne "HCDS", « High Capacity Disposable Silica ». Il s'agit d'une colonne de Silice modifiée (28g Si acide, 16 g Si basique, 6 g Si neutre) préparée par ce fournisseur et jetable. Ceci assure d'une part la reproductibilité, toujours sujette à caution pour la préparation de ce type de colonne au laboratoire, et d'autre part la simplicité, puisque la colonne est livrée en emballage sous vide et s'intègre directement au robot. En outre, le surcoût que représente ce type de matériel est compensé par la suppression de main d'oeuvre (moins d'opérations et de vaisselle). Enfin, un gain de temps très appréciable est réalisé en supprimant l'étape de changement de solvant.

En outre, cette colonne fait également l'objet d'études par FMS afin de développer également l'extraction intégrée (par chauffage d'une colonne similaire) : il serait alors théoriquement possible d'introduire un échantillon sec directement sur le système, ce qui permettrait de rendre un résultat dans les 48 heures.

Nous avons donc décidé d'étudier la possibilité de remplacer la colonne de GPC par cette colonne "HCDS" pour les matrices biologiques grasses nécessitant une pré-purification.

#### 4.3.1 Etude de comparaison GPC / HCDS sur deux matrices grasses

Cette étude a fait l'objet d'un poster présenté lors du "Workshop on the analysis of PCBs in marine matrices", Oostende, 5-7/4/2000, organisé par Quasimeme (Annexe 2).

Pour cette approche, deux matrices ont été comparées : un extrait de filets de maquereau (*Scomber scombrus*) issu du marché alimentaire belge (3 individus homogénéisés) et un extrait de lard de cachalot (*Physeter macrocephalus*, 1 individu, « Cachalot 4 », cf point 6.1.1). 3 analyses ont été réalisées pour chaque matrice et chaque technique, sur 4 g de graisse extraite.

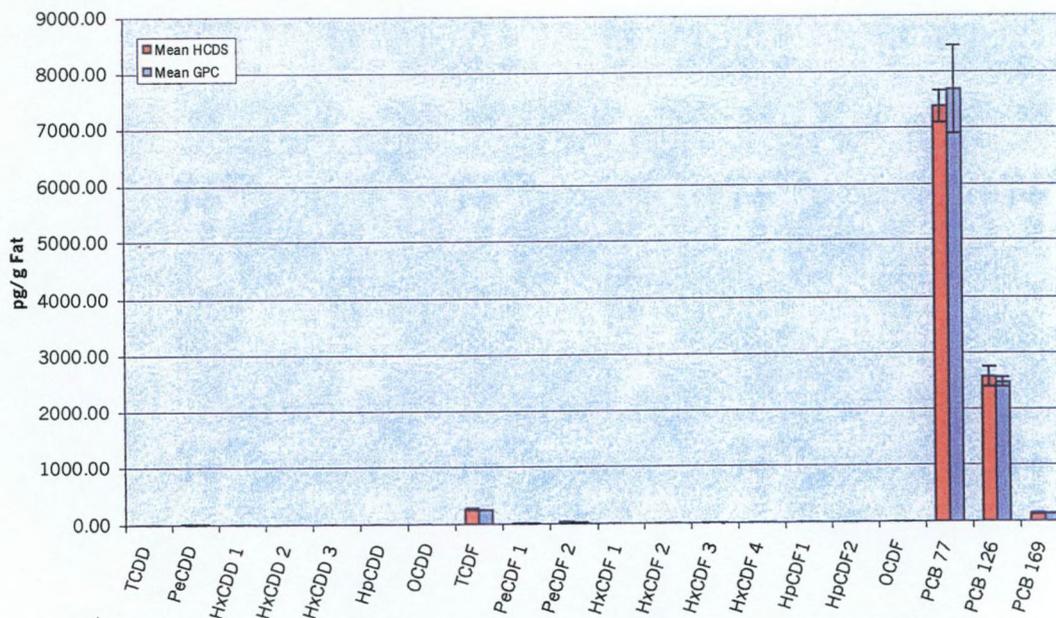


Figure 8 : Comparaison des patterns obtenus en PCDD/Fs et cPCBs lors de l'analyse d'un extrait de muscle de maquereaux (3 individus homogénéisés, 50 g de graisse extraite, analyses sur 4g) avec pré-purification par colonne HCDS (rouge) et GPC (bleu) (triplicates). Les valeurs présentées représentent les moyennes obtenues pour chaque technique, assorties des écarts-type. Résultats exprimés en pg / g de graisse extraite.

Les résultats sont très satisfaisants (fig 8 à 12). Les deux techniques donnent des résultats similaires. On remarquera cependant une plus grande erreur sur le PCB 77 dans les analyses HCDS du maquereau (fig. 8). Les taux de réapparition du standard interne (60 à 100 %) sont par ailleurs similaires pour les deux techniques.

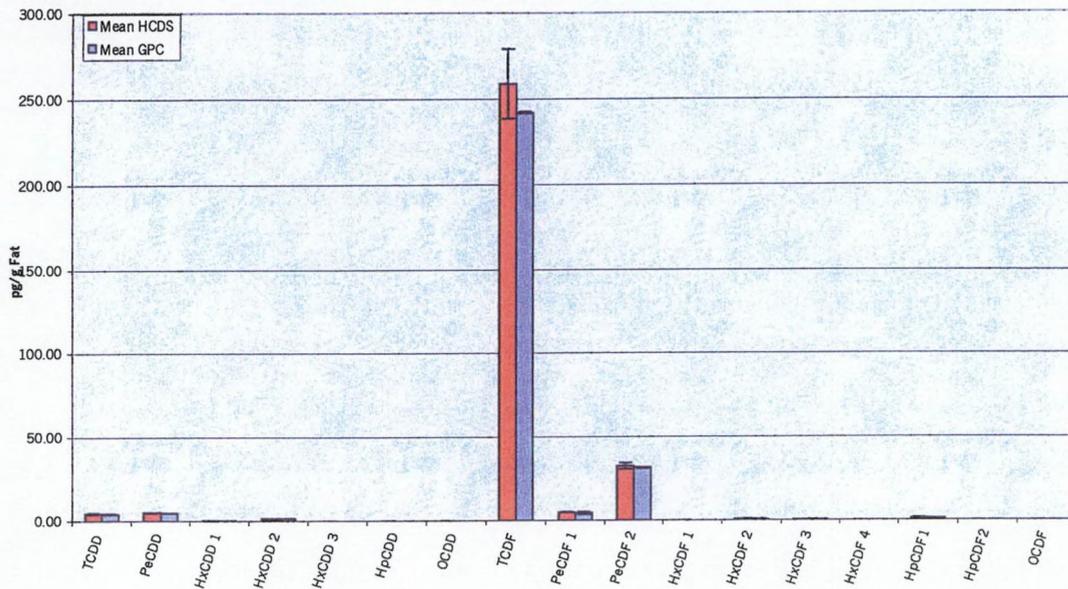


Figure 9 : Comparaison des patterns obtenus en PCDD/Fs lors de l'analyse d'un extrait de muscle de maquereaux (3 individus homogénéisés, 50 g de graisse extraite, analyses sur 4g) avec pré-purification par colonne HCDS (rouge) et GPC (bleu) (triplicates). Les valeurs présentées représentent les moyennes obtenues pour chaque technique, assorties des écarts-type. Résultats exprimés en pg / g de graisse extraite.

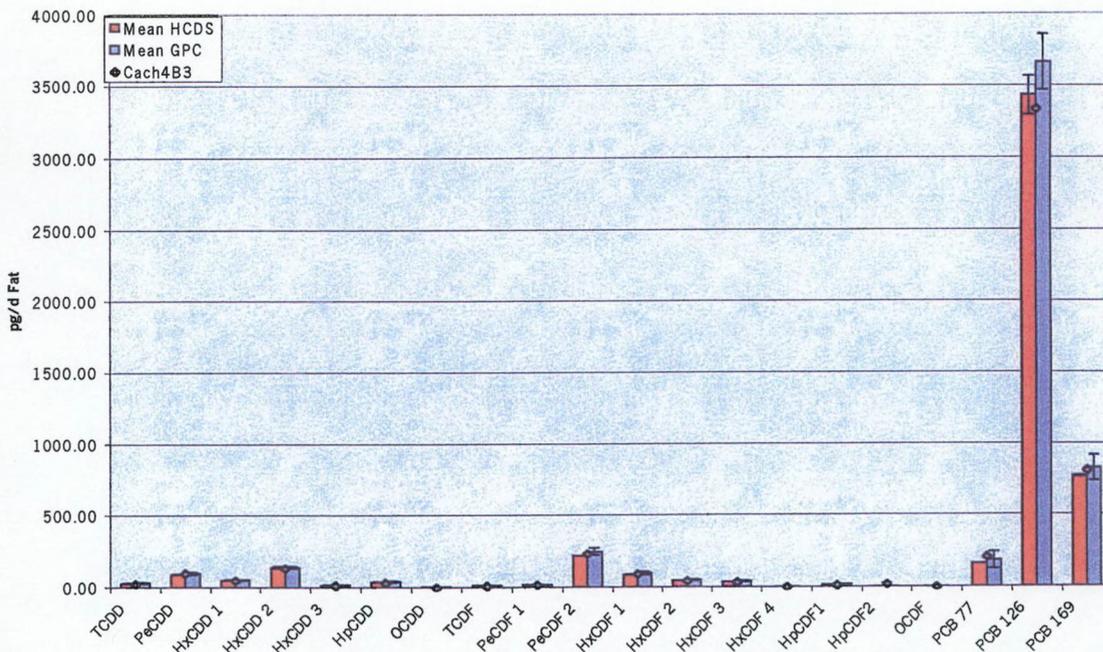


Fig. 10 : Comparaison des patterns obtenus en PCDD/Fs et cPCBs lors de l'analyse d'un extrait lard de cachalot (30 g de graisse extraite, analyses sur 4 g) avec pré-purification par colonne HCDS (rouge) et GPC (bleu) (triplicates). Les valeurs présentées représentent les moyennes obtenues pour chaque technique, assorties des écarts-type. Une extraction sur un second prélèvement de lard du même individu (« cach4B3 », 5 g de graisse extraite, analyse sur 0.78 g) a également été réalisée. Résultats exprimés en pg / g de graisse extraite

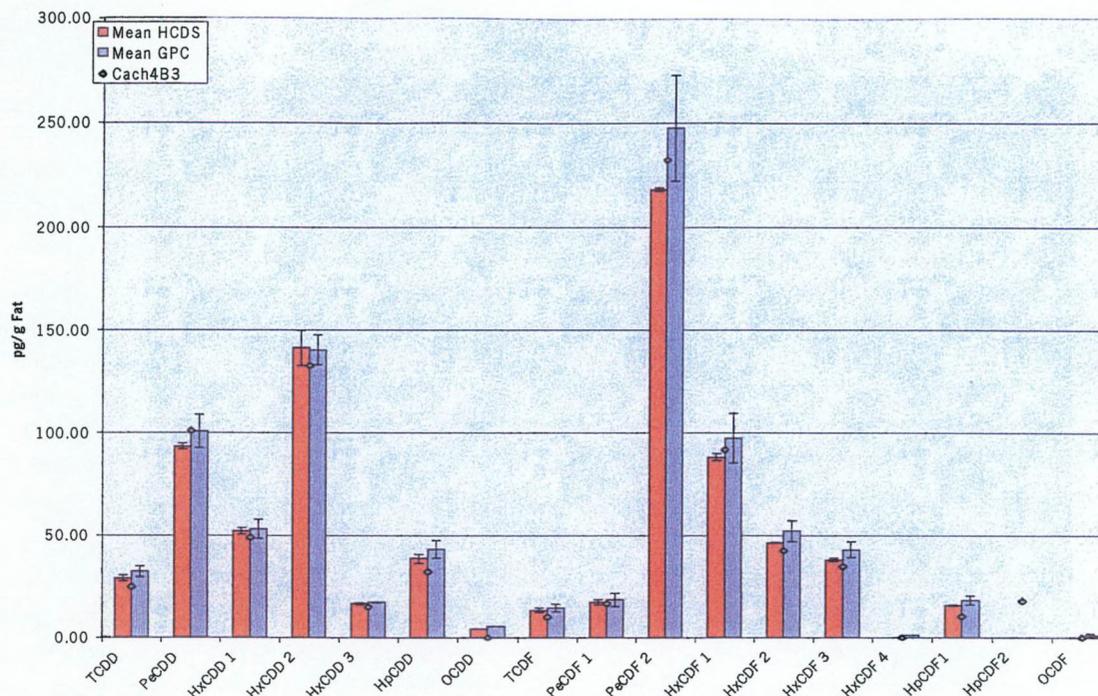


Fig. 11 : Comparaison des patterns obtenus en PCDD/Fs lors de l'analyse d'un extrait lard de cachalot (30 g de graisse extraite, analyses sur 4 g) avec pré-purification par colonne HCDS (rouge) et GPC (bleu) (triplicates). Les valeurs présentées représentent les moyennes obtenues pour chaque technique, assorties des écarts-type. Une extraction sur un second prélèvement de lard du même individu (« cach4B3 », 5 g de graisse extraite, analyse sur 0.78g) a également été réalisée. Résultats exprimés en pg / g de graisse extraite

Cependant, pour les échantillons de maquereau, nous avons pu constater certains problèmes sur la colonne HCDS : purification insuffisante ne permettant pas l'injection en GC/HRMS. Plusieurs essais complémentaires ont dû être réalisés, en raison d'une surcharge de la colonne. Aucun problème de ce type n'est survenu pour le cachalot. Il semble donc que, dans certains cas, la capacité de la colonne HCDS, dans sa forme actuelle, ne permette pas de travailler sur de grandes quantités d'extrait gras. La GPC devrait donc idéalement être maintenue en activité, afin de pouvoir traiter ce type d'échantillon particulier, lorsque les niveaux attendus sont bas.

Afin de vérifier la validité des mesures de concentrations réalisées, il nous paraissait nécessaire de réaliser une seconde analyse : nous avons fait un prélèvement complémentaire de lard de cachalot (n°4), qui a fait l'objet d'une préparation suivant la méthode par GPC. En raison des niveaux présents dans cet échantillon, 0.78 g de cet extrait ont été purifiés au lieu de 4g, afin de vérifier l'exactitude du résultat avec une quantité de matériel restreinte.

On peut constater (fig. 10, fig. 11) que les résultats obtenus sont compris dans les intervalles définis par les deux séries d'échantillons passées respectivement sur HCDS et GPC, ou légèrement sous-estimés, à l'exception de l'HpCDF2, détectée en faibles quantités dans cet échantillon. Les concentrations en PCDD/Fs mesurées dans cet échantillon doivent donc être considérées comme relativement précises et fiables.

#### 4.3.2 Validation de la colonne HCDS sur échantillons de contrôle qualité « home made ».

Par ailleurs, une validation a également été réalisée sur des échantillons de type "Contrôle Qualité" préparés au laboratoire. Quelques mesures sur « QCG 01 » montrent que les résultats obtenus sont en accord avec les mesures réalisées en GPC (cf point 3.2.1, Fig.1). Sur un second échantillon de contrôle qualité réalisé au laboratoire (« QCG02 »), une étude de répétabilité (mesures successives par le même opérateur) a été effectuée pour les colonnes HCDS (Fig. 12). Les résultats obtenus indiquent une excellente répétabilité, avec une déviation inférieure à 10 %. Sur ce type d'échantillon, nous n'avons jamais observé de problème de surcharge de la colonne, comme c'était le cas pour le maquereau. En termes de reproductibilité, on constate la similitude entre la GPC et l'HCDS, avec des résultats toujours dans l'intervalle de confiance à 99% à une exception près (point 21). Par conséquent, la colonne HCDS peut également être considérée comme validée pour ce type d'échantillon.

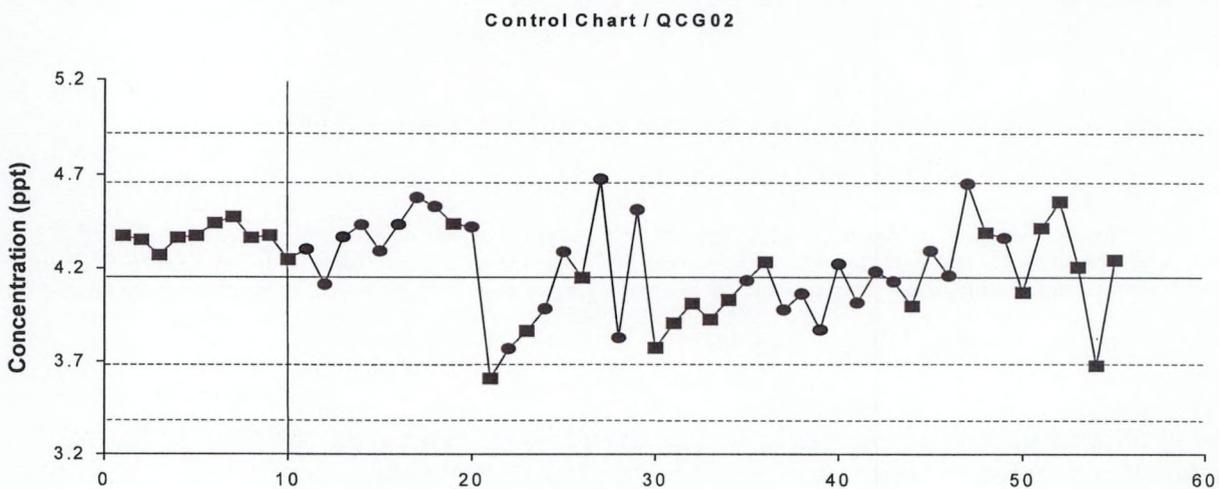


Fig. 12 : Carte de contrôle de l'échantillon de contrôle qualité « QCG02 ». Chacun des points représente la valeur totale (exprimée en TEQ) obtenue lors de la mesure sur un aliquot de « QCG 02 ». Les intervalles de confiance à 95% et 99% sont représentés. ● : pré-purification de l'échantillon par GPC ; ■ : pré-purification de l'échantillon par colonne HCDS sur « Power-Prep ». Points 1 à 10 : mesures de répétabilité.

Au niveau des blancs (non illustré), on constate généralement une légère diminution du niveau de background lors de l'utilisation de la colonne HCDS. La colonne HCDS (jetable, à utilisation unique) est directement intégrée au schéma Power-Prep, tandis que la GPC fait appel à une injection sur colonne (réutilisable), une collecte de fraction et une concentration avant injection au Power-prep : cette diminution observée, très minime, est donc logique.

#### 4.3.3 Conclusion

En conclusion, la colonne "HCDS" remplace avantageusement la colonne de GPC en renforçant le niveau d'automatisation et la rapidité de la purification. La reproductibilité des résultats ne semble pas améliorée, bien que les niveaux de blancs soient très légèrement inférieurs avec cette technique. Cette technique peut être considérée comme validée sur échantillons de graisse alimentaire, avec une erreur inférieure à 20 %. La GPC devra cependant être conservée pour d'éventuels échantillons (certains poissons gras ?) posant problème sur la colonne de Silice.

## 5 Implémentation d'une méthode de détermination lipidique.

L'expression des résultats d'analyse de micro-polluants lipophiles dans les matrices biologiques constitue aujourd'hui encore un sujet de controverses. En effet, les quantités de micro-polluants mesurées sont reportées dans la littérature sous 4 formes principales :

1. Par rapport à la quantité de tissus frais.
2. Par rapport à la quantité de tissus secs.
3. Par rapport à la quantité de lipides extraits.
4. Par rapport à la quantité de lipides totaux mesurée en sus de l'analyse proprement dite.

La quantité de lipides extraits introduit une erreur dans la mesure ; en effet, bien que celle-ci soit généralement plus faible que l'erreur analytique, elle varie suivant les techniques et les solvants utilisés par les laboratoires. Cette expression des résultats tend à disparaître pour cette raison, bien qu'elle soit utilisée lors d'analyses de denrées alimentaires, les normes régissant leur commercialisation étant exprimées en termes de "graisse" sans plus de détail.

En réalité, le mode d'expression du résultat sera fonction du but poursuivi. Une estimation de charge corporelle, par exemple, passe par une expression en poids frais de tissus.

On peut donc considérer que les résultats à inclure dans les bases de données environnementales devraient être exprimés en "poids sec" et "lipides totaux", éventuellement en poids frais, afin de pouvoir être exploités au mieux. L'implémentation d'une technique de détermination lipidique est primordiale pour les mesures dans l'environnement.

Diverses techniques sont actuellement bien connues pour la détermination lipidique, comme l'extraction suivant Bligh and Dyer (1959). Toutes les méthodes utilisées jusqu'à ce jour sont cependant très lourdes à mettre en oeuvre. D'autre part, les modifications introduites par les laboratoires sur ces techniques afin de les alléger génèrent une incertitude sur les résultats (Smedes, 1999).

En conséquence, nous avons choisi d'implémenter une technique simple, fiable et reproductible, actuellement utilisée pour les tests de comparaison de laboratoires par Quasimeme, la méthode dite "de Smedes" (Smedes, 1999). De plus, cette méthode a été développée dans la perspective de l'interdiction prochaine des solvants chlorés, et n'en utilise donc pas. Selon Quasimeme, cette méthode est, pour cette raison également, appelée à devenir le prochain standard international en matière de détermination lipidique.

### **5.1 Description de la méthode selon Smedes.**

(Mode opératoire fourni par Quasimeme pour l'exercice BT3; annotations entre crochets : adaptations de notre laboratoire):

#### **TOTAL LIPID EXTRACTION ACCORDING TO SMEDES**

##### **Instruments and chemicals.**

- Balance with a precision of 0.1 mg
- Ultra Turrax
- Centrifuge capable of holding 100 ml tubes or glass jar at a speed of  $\pm 2000$  rpm <sup>1</sup>
- Heated waterbath with condensers.
- Evaporation flasks in suitable shape and size [tubes "turbovap", Zymark, USA]
- Pipettes
- Deionised water
- Isopropanol

- Cyclohexane
- Solution of 13%(w/w) isopropanol in cyclohexane.

### Procedure

1. Carry out a dry-weight determination on a representative portion the test material to be analysed.
2. Take a portion of wet test material which does not contain more than 1 g lipid or 8 g of water.
3. Weigh test material with known moisture content in a 100ml centrifuge tube or appropriate glass jar.
4. Add 18 ml isopropanol and 20 ml cyclohexane.
5. Mix with Ultra Turrax for two minutes.
6. Add W ml of water.

W is calculated by:

$$W = 22 - [\text{sample intake (g)} * \text{moisture content (\%)}] / 100$$

7. Mix with Ultra Turrax for another minute
8. Separate the phases by centrifugation <sup>2</sup>. [5', 1500 rpm]
9. Transfer as much as possible of the organic phase to an evaporation flask (by small pipette). [*Tube à concentration "turbovap" (zymark, USA)*]
10. Filtration is optional but makes the method more robust <sup>3</sup>.
11. Add 20 ml cyclohexane containing 13%(w/w) isopropanol and mix for one minute by Ultra Turrax.
12. Centrifuge.
13. Transfer the upper phase to the flask containing the first extract and evaporate the solvent. [*Turbovap, Zymark, USA (mode "sensor")*]
14. Quantitatively transfer the residue to a weighed wide-mouth cup by using a few ml of the cyclohexane/isopropanol mixture or diethylether.
15. Evaporate in a moderately warm place to dryness (do not boil). The temperature used should be 5 - 10 °C below the boiling point of the the washing solvent. Evaporation may be assisted by a stream of nitrogen. [*overnight (16 h), 40 °C, N<sub>2</sub>*]
18. Further dry the residue for one hour at 105°C.
17. Weigh the residue and calculate the lipid content from the intake.

1 In case a centrifuge is not available, phases also separate after some time but the interface is less sharp what can result in insufficient recovery of the organic phase. One should then check whether at least 80% of the organic phase is recovered (18 ml). If not a third extraction is recommended

2 Som tissues form an emulsion, like liver, what can be prevented by replacing the W ml water by 1 N HClO<sub>4</sub>, denaturing the proteins. Also the addition of NaCl may help.

3 As using B&D In some cases the organic phase contains some tissue particles. This also depends on the applied mixing method (ultra sonic tends

to). When this is observed the extract should be filtered what can be done by passing the extract through a glass column with ±2cm pre-extracted cottonwool.

## **5.2 Tests au laboratoire.**

Nous avons appliqué cette méthode avec les aménagements propres au laboratoire pour la détermination lipidique de moules homogénéisées. Outre les divers essais de mise au point, qui se sont avérés reproductibles, deux essais sur la méthode finalisée ont été réalisés, donnant chacun un résultat de 1,4 % de lipides totaux.

Nous avons considéré que, étant donné les tests déjà réalisés par Smedes (1999), la méthode peut être jugée efficace si une inter-calibration confirmait les résultats obtenus.

## **5.3 Résultats d'intercalibration Quasimeme.**

Lors de l'exercice Quasimeme 2000 « BT3 : PCDD/Fs in biota », round 20 (cf point 3.2.2 et annexe I), une détermination lipidique selon la méthode de Smedes est intégrée aux résultats demandés. Notre laboratoire a obtenu un excellent résultat, avec des "z-scores" de respectivement -0,13 (QPL005BT) et -0,03 (QPL006BT). Cette méthode rapide et simple, manifestement robuste, sera donc dorénavant utilisée dans notre laboratoire pour les déterminations lipidiques complémentaires dans le cadre d'analyses de contaminants organiques dans les tissus d'organismes marins.

## **6 Développement et implémentation d'une technique d'analyse dans les sédiments.**

Le laboratoire a par ailleurs développé des techniques de préparation d'échantillon et d'analyse spécifique aux sols / sédiments. L'objectif est d'obtenir une méthode permettant l'analyse de ces deux types de matrices suivant la même méthode, en dépit de leurs spécificités respectives (p.ex. : présence d'acides humiques dans les sols ; présence de sulfures dans les sédiments). Notre laboratoire a commencé à travailler sur une méthode de référence, puis a exploré d'autres possibilités sur base de l'équipement dont il dispose.

La méthode de référence, entièrement manuelle, est basée sur une méthode reconnue pour sa fiabilité et bien décrite dans la littérature. C'est à partir de cette méthode de base, implémentée au laboratoire en 1999, que nous avons travaillé à l'élaboration d'une méthode plus rapide. Elle est donc décrite sommairement ici. La seconde exploite les potentialités de l'ASE et du "Power-prep" ; par son automatisation, elle permet un gain de temps considérable, à condition de réaliser des lavages acides de l'extrait préalablement à la purification.

La troisième est à l'étude et vise le remplacement des étapes de lavages acides par la technique de GPC.

### **6.1 Description de la méthode de référence.**

La méthode présentée est décrite dans la littérature (Oehme et al., 1993) ; elle présente l'avantage d'être particulièrement robuste et de permettre en principe l'analyse de tous types de sols et sédiments, quel que soit le taux de contamination des échantillons.

Elle consiste en :

- une étape d'extraction par Soxhlet avec du toluène pendant 24h
- une étape de purification des extraits particulièrement longue, comprenant un traitement au mercure pour éliminer les sulfures, un passage sur un ensemble de colonnes de chromatographie : colonnes multicouches remplies avec de la silice neutre, de la silice basique et du sulfate de sodium, une colonne de charbon et deux petites colonnes de silice acide et d'alumine basique (facultatives).
- Une étape d'analyse par HRGC (SP 23 31 60m) -HRMS.

### 6.1.1 Désavantages de la méthode:

- Les adsorbants doivent être préparés et conditionnés au laboratoire avant préparation des colonnes. Cette étape, fastidieuse, influence considérablement l'efficacité des colonnes et est difficile à reproduire d'une manière rigoureusement identique.
- Un traitement au mercure de l'échantillon est nécessaire pour les sédiments, afin d'en extraire les sulfures.
- La méthode est particulièrement longue et la purification d'un échantillon peut prendre jusqu'à 4 jours.
- Le coût d'une analyse est élevé suite à l'intervention humaine très importante, le coût des adsorbants et des solvants organiques utilisés en grande quantités.

La colonne de charbon a ainsi été remplacée par une colonne PGC-HPLC, ainsi que décrit dans notre premier rapport, sur base des optimisations réalisées. Cette première optimisation de la méthode, qui vise à accroître la reproductibilité de la méthode, a été très rapidement intégrée.

### 6.1.2 Résultats obtenus :

Sur sol rural non contaminé, cette méthode a montré une efficacité réelle.

Des essais ont été réalisés sur un sol d'inter-calibration, issu d'une région industrielle et présentant de très hauts niveaux en de nombreux composés organiques. Dans ce cas, très particulier, la méthode n'a pas permis d'éliminer toutes les interférences présentes. Cependant, l'analyse HRMS a pu être réalisée, à 13.000 de résolution.

Différentes optimisations ont été apportées à la méthode :

#### *a. Optimisations sur l'extraction :*

1. Remplacement du Soxhlet par l'ASE : nos résultats indiquent que l'ASE donne des rendements d'extraction plus élevés. Les conditions optimisées sont :  $t^{\circ}$  : 180 °C ; P : 1500 psi ; nombre de cycles : 2 \* 5 minutes, avec pré-chauffage de la cellule. Solvant : Toluène.
2. Adjonction de cuivre dans la cellule d'extraction : cette méthode, utilisée en SFE, a été transposée à l'ASE afin de déterminer s'il était possible d'éliminer les sulfures de l'extrait ; en effet, ceci permettrait de supprimer l'étape de traitement de l'échantillon au mercure. Nos résultats indiquent une absence d'effet sur les rendements d'extraction, mais une efficacité au niveau de la rétention des sulfures (diminution substantielle des quantités de mercure nécessaires).

#### *b. Optimisation sur la purification :*

1. Les deux colonnes "facultatives", difficiles à mettre en oeuvre, ont été remplacées par des lavages acides (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré / hexane) préalables à la purification.
2. Ainsi que mentionné dans notre rapport intermédiaire, l'étape de la colonne de charbon devrait être complétée par des éluions complémentaires (acétate-d'éthyle / benzène 1:1 v/v) afin d'éliminer certaines interférences "tenaces" tels les PCN (polychloro-naphtalènes). Cette solution n'a pas été testée suite à l'implémentation du robot "Power-prep" au laboratoire.

### **6.2 Méthode 2 : remplacement des colonnes manuelles par le « Power-Prep ».**

Les inconvénients de la purification suivant la méthode de référence peuvent être supprimés par l'implémentation du robot « Power-Prep », décrit dans notre rapport intermédiaire : automatisation,

utilisation de colonnes jetables préalablement conditionnées, rapidité ; au niveau de la colonne de charbon, celle-ci est éluée par 3 solvants différents avant élution des PCDD/Fs et cPCBs au toluène.

Le méthode 2 consiste donc en une extraction ASE, suivie de lavages acides, puis d'une purification sur « Power-prep » avant injection en HRGC-HRMS (colonne SP 2331, 60 m).

Nous avons réalisé deux exercices d'inter-calibration ("Umea" et "Ontario") au cours desquels nous avons appliqué la procédure suivante :

1. Dopage de l'échantillon avec le standard interne dans la cellule d'extraction (avant extraction).
2. Extraction à l'ASE, toluène, 2000 PSI, 180°C, 2 cycles (adjonction de Cuivre dans la cellule d'extraction).
3. Lavages de l'extrait à l'acide sulfurique concentré.
4. Purification sur Power-Prep (3 colonnes : silice, alumine, charbon).
5. Analyse HRMS avec séparation des isomères sur colonne HRGC (60 m) de type SP 23-31.

Un essai préalable à ces exercices a été réalisé sur l'échantillon fortement contaminé cité précédemment : nous avons pu éliminer les interférences, probablement en raison des éluions successives sur colonne de charbon.

#### **6.2.1 Exercice d'inter-calibration "Ontario/2000"**

Les analyses ont été réalisées sur 5 échantillons de sédiments fournis par l'organisateur à plus de 60 participants.

Sur 5 échantillons, 2 étaient constitués du même matériel ("sample 4" et "sample 6" : "LSBRM9801").

L'organisateur ne nous pas encore fourni de résultat analysé, à l'exception de cet échantillon. Nous avons donc mis ces premiers résultats sous forme de graphiques (fig. 13 et 14 ). Les valeurs d'erreur standard ont été calculées par l'organisateur en excluant les valeurs aberrantes. L'octachloro-dibenzo-furanne (OCDF) n'a pas été analysée par notre laboratoire.

#### **6.2.2 Exercice d'inter-calibration "Umea/2000).**

Trois échantillons de sols / sédiments ont été envoyés aux participants (au nombre de 67). Les résultats de cet exercice ont été communiqués aux participants. Nos performances sont détaillées dans les figures 15 à 20.

#### **6.2.3 Analyse des résultats.**

Tous nos résultats sont dans la gamme de concentration attendue.

##### **a. PCDD/Fs.**

Outre certaines imprécisions ponctuelles dans l'un ou l'autre échantillon, on remarque plus particulièrement une surestimation généralement faible des congénères suivants :

- 2,3,7,8 TCDD (sauf Ontario : limite supérieure de l'écart-type).
- 1,2,3,6,7,8-HxCDD (sauf Umea, sample B).
- 1,2,3,7,8-PeCDF (sauf Umea, sample B)
- 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (sauf Umea, sample C)

A l'inverse, la 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF est systématiquement sous-évaluée.

Au niveau de la méthode de préparation d'échantillon, les taux de recouvreance des standards internes sont compris entre 30 et 80 %, valeurs non optimales mais qui doivent nous permettre de rendre un résultat acceptable. D'autre part, les interférences sont éliminées en HRMS. Par conséquent, la méthode de purification nous donne un résultat acceptable.

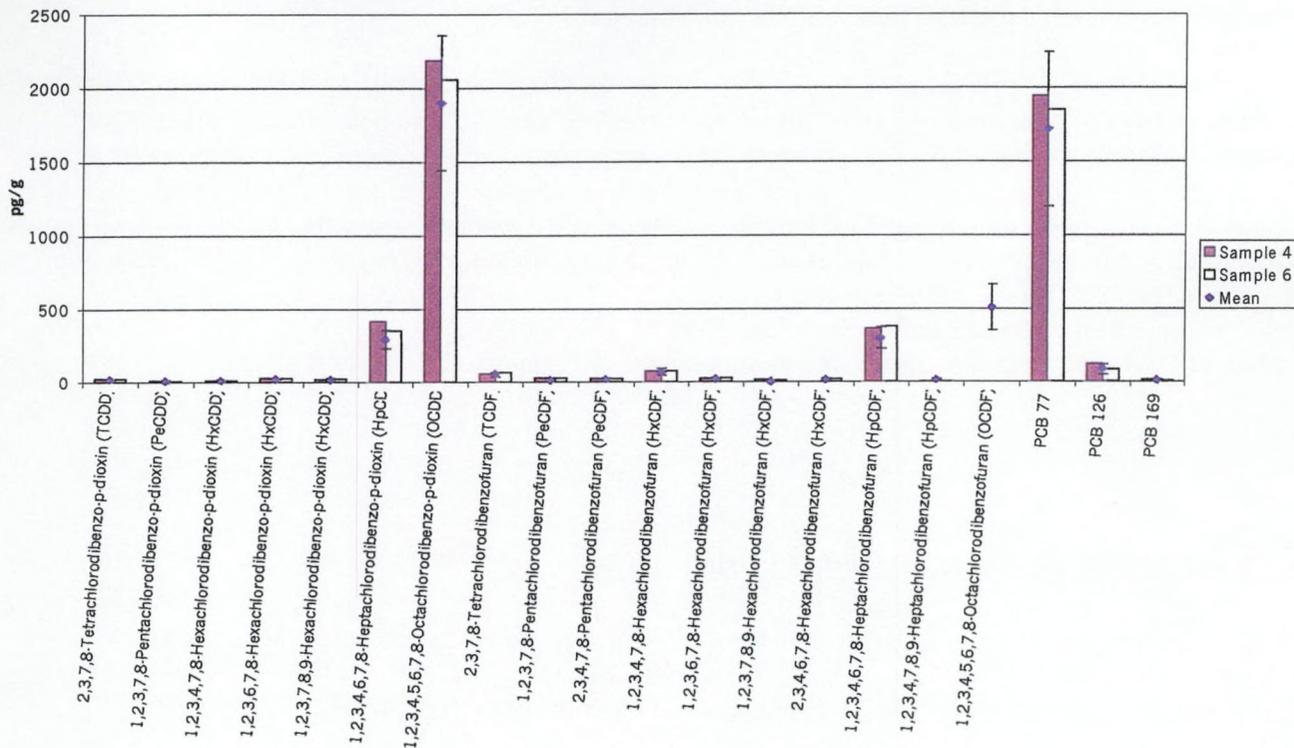


Fig. 13 : Résultats de l'inter-calibration « Ontario / 2000 » (pattern complet). Histogrammes : Valeurs mesurées dans les échantillons « sample4 » et « sample6 ». Points : Valeurs moyennes de l'échantillon LSBRM9801 et écarts-types calculés par l'organisateur. Concentrations exprimées en pg/g PS. OCDF : non analysé.

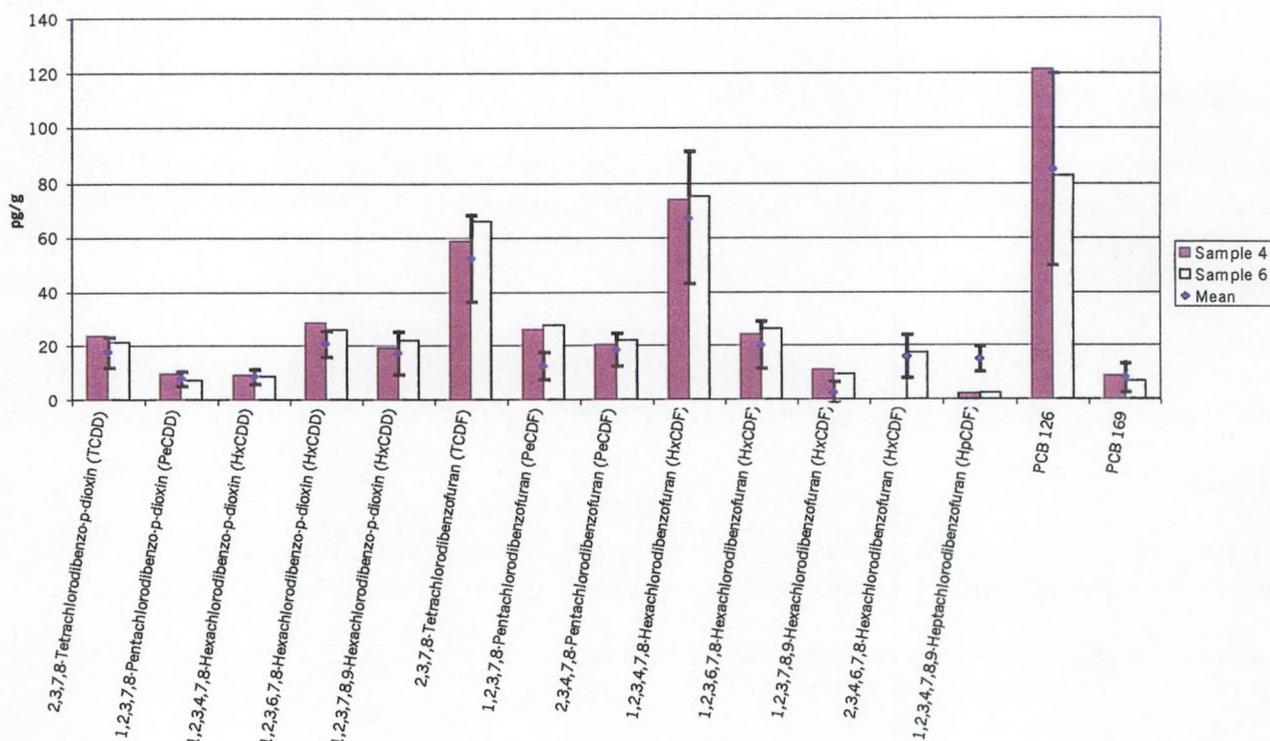


Fig. 14 : Résultats de l'inter-calibration « Ontario / 2000 » (retrait des valeurs élevées : PCB77, HpCDD, OCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF). Histogrammes : Valeurs mesurées dans les échantillons « sample4 » et « sample6 ». Points : Valeurs moyennes de l'échantillon LSBRM9801 et écarts-types calculés par l'organisateur. Concentrations exprimées en pg/g PS. OCDF : non analysé.

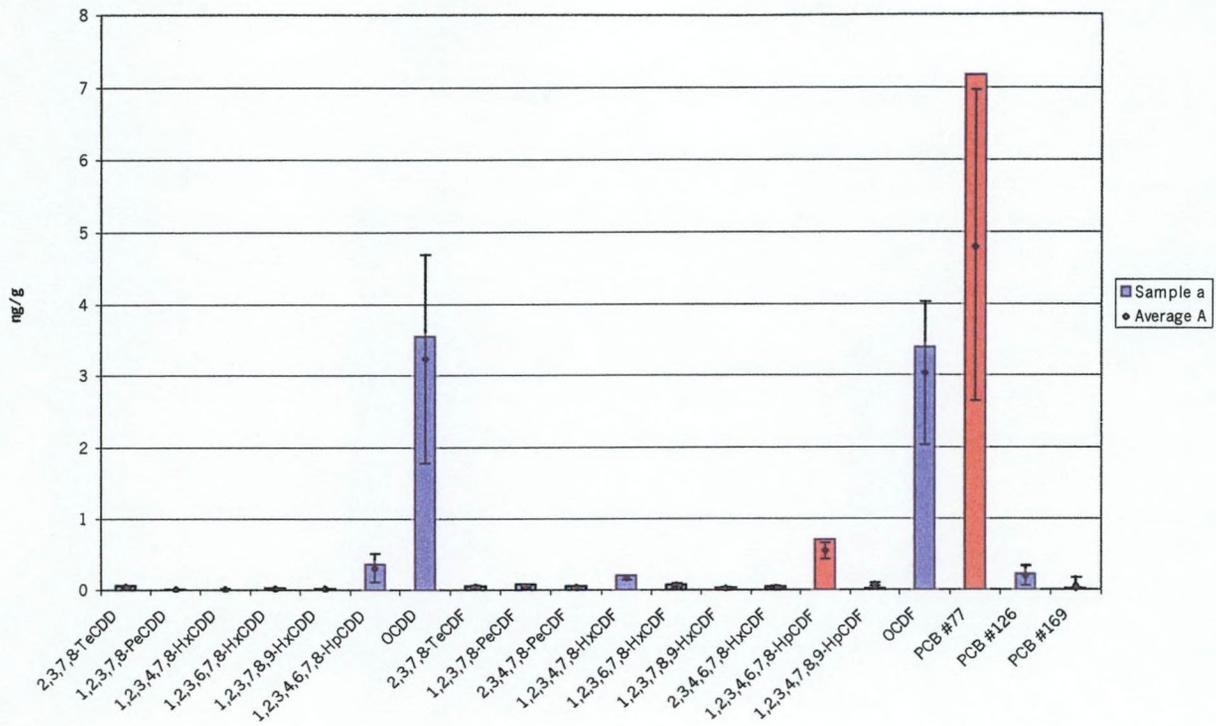


Fig. 15 : Résultats de l'inter-calibration « Umea / 2000 », Sample A (pattern complet). Histogrammes : Valeurs mesurées. Points : Valeurs moyennes de l'échantillon et écarts-types calculés par l'organisateur. Concentrations exprimées en ng/g PS. En rouge : valeurs hors de l'intervalle.

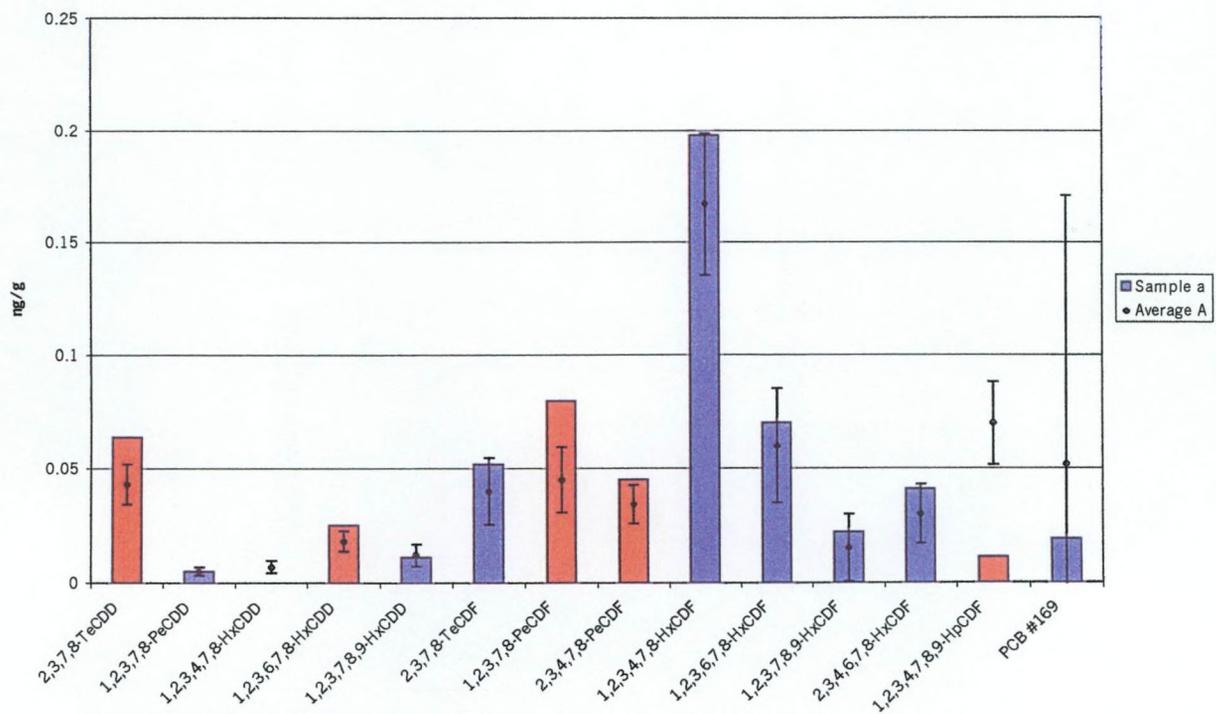


Fig. 16 : Résultats de l'inter-calibration « Umea / 2000 », Sample A (Valeurs élevées retirées : HpCDD, OCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, OCDF, PCB77). Histogrammes : Valeurs mesurées. Points : Valeurs moyennes de l'échantillon et écarts-types calculés par l'organisateur. Concentrations exprimées en ng/g PS. En rouge : valeurs hors de l'intervalle.

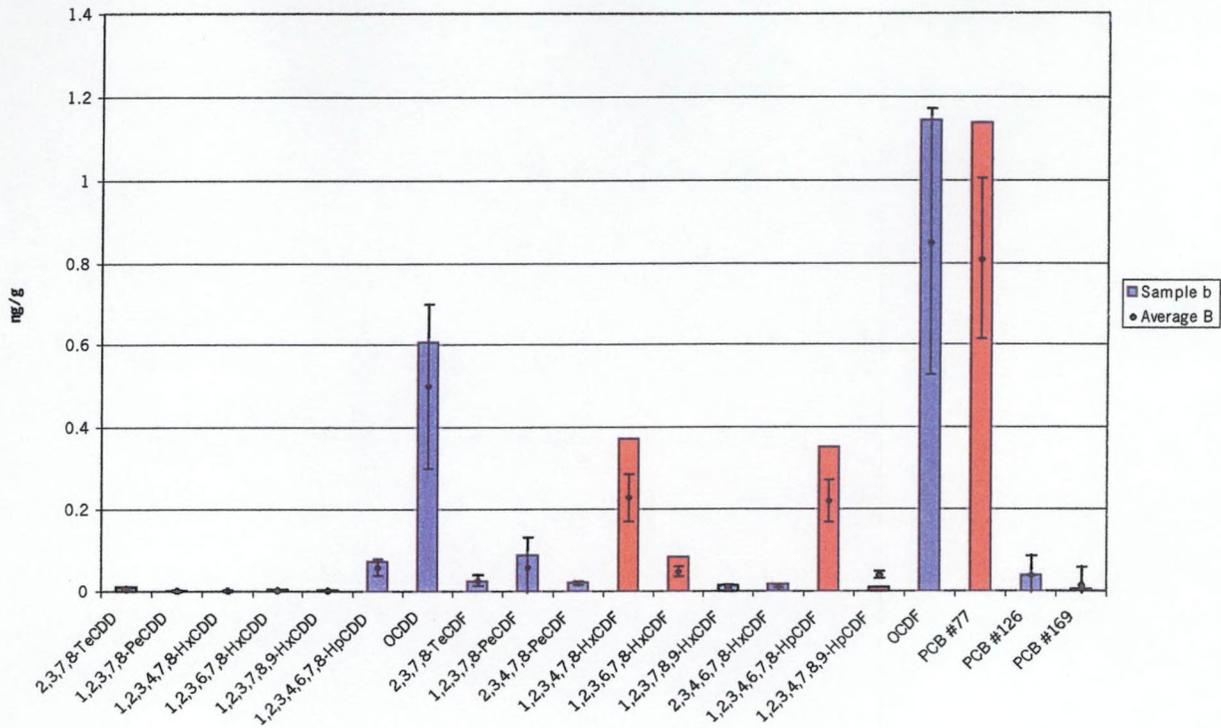


Fig. 17 : Résultats de l'inter-calibration « Umea / 2000 », Sample B (pattern complet). Histogrammes : Valeurs mesurées. Points : Valeurs moyennes de l'échantillon et écarts-types calculés par l'organisateur. Concentrations exprimées en ng/g PS. En rouge : valeurs hors de l'intervalle.

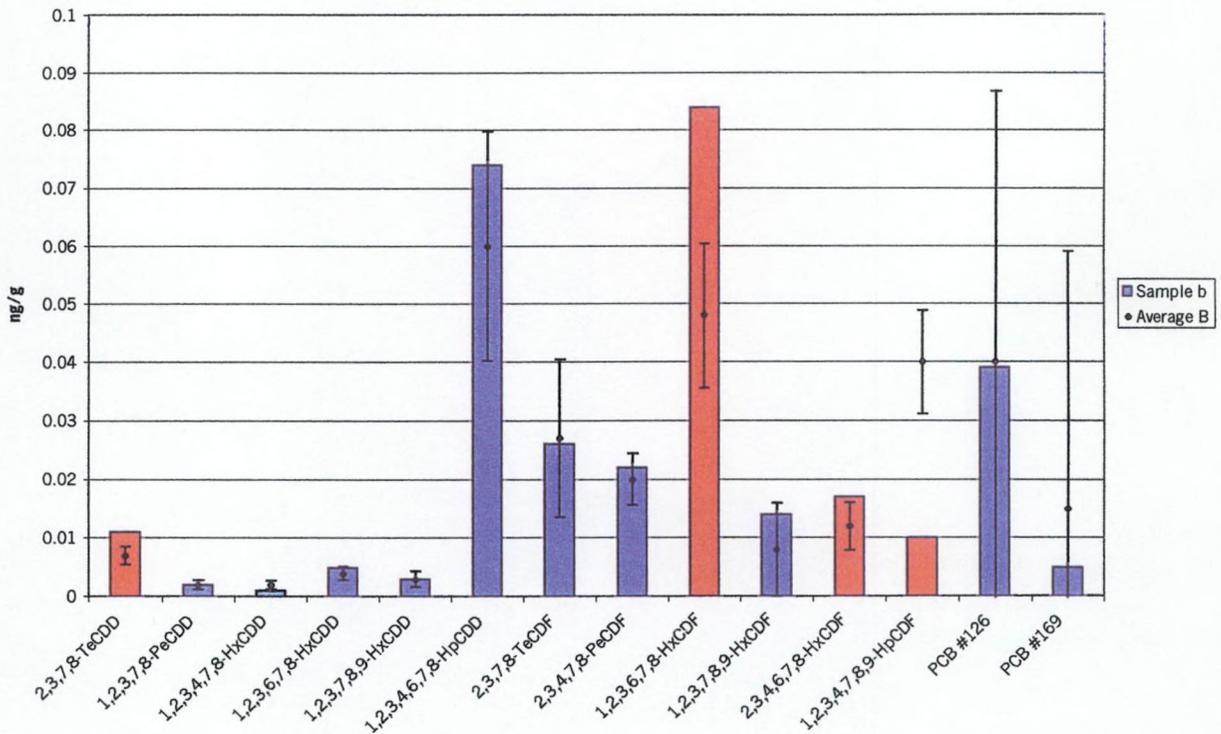


Fig. 18 : Résultats de l'inter-calibration « Umea / 2000 », Sample B (Valeurs élevées retirées : HpCDD, OCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, OCDF, PCB77). Histogrammes : Valeurs mesurées. Points : Valeurs moyennes de l'échantillon et écarts-types calculés par l'organisateur. Concentrations exprimées en ng/g PS. En rouge : valeurs hors de l'intervalle.

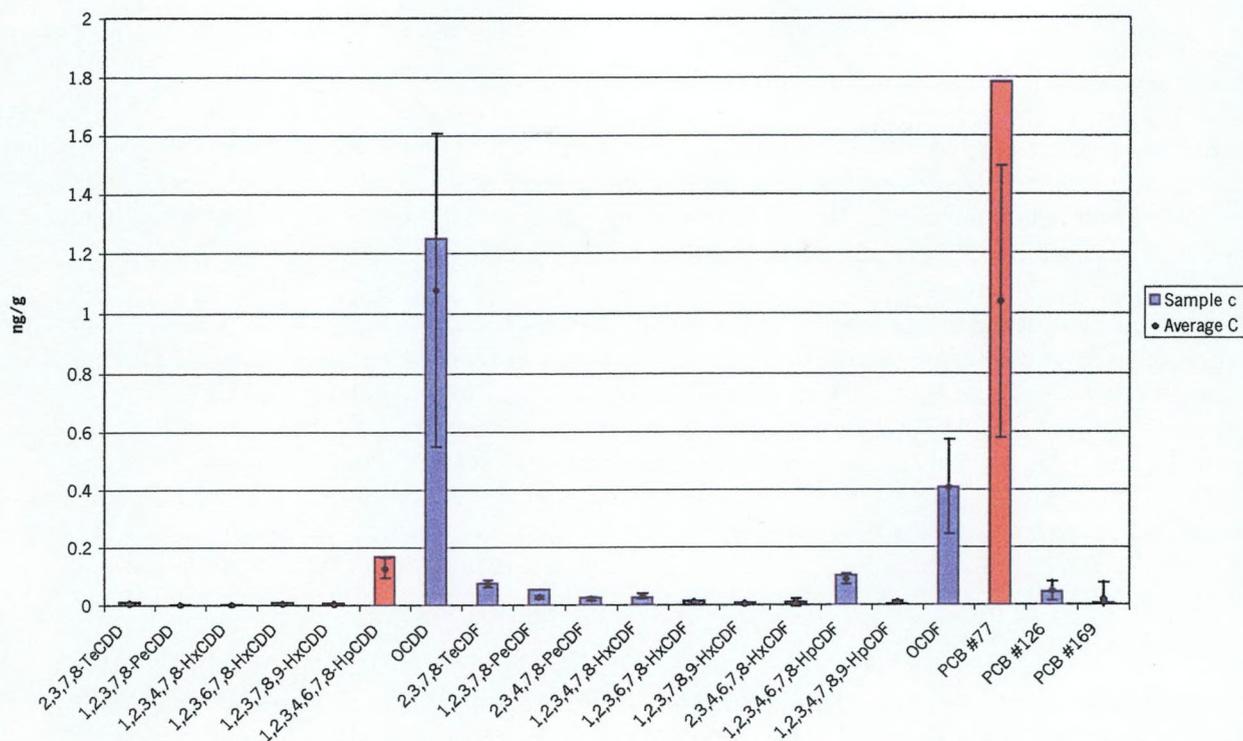


Fig. 19 : Résultats de l'inter-calibration « Umea / 2000 », Sample C (pattern complet). Histogrammes : Valeurs mesurées. Points : Valeurs moyennes de l'échantillon et écarts-types calculés par l'organisateur. Concentrations exprimées en ng/g PS. En rouge : valeurs hors de l'intervalle.

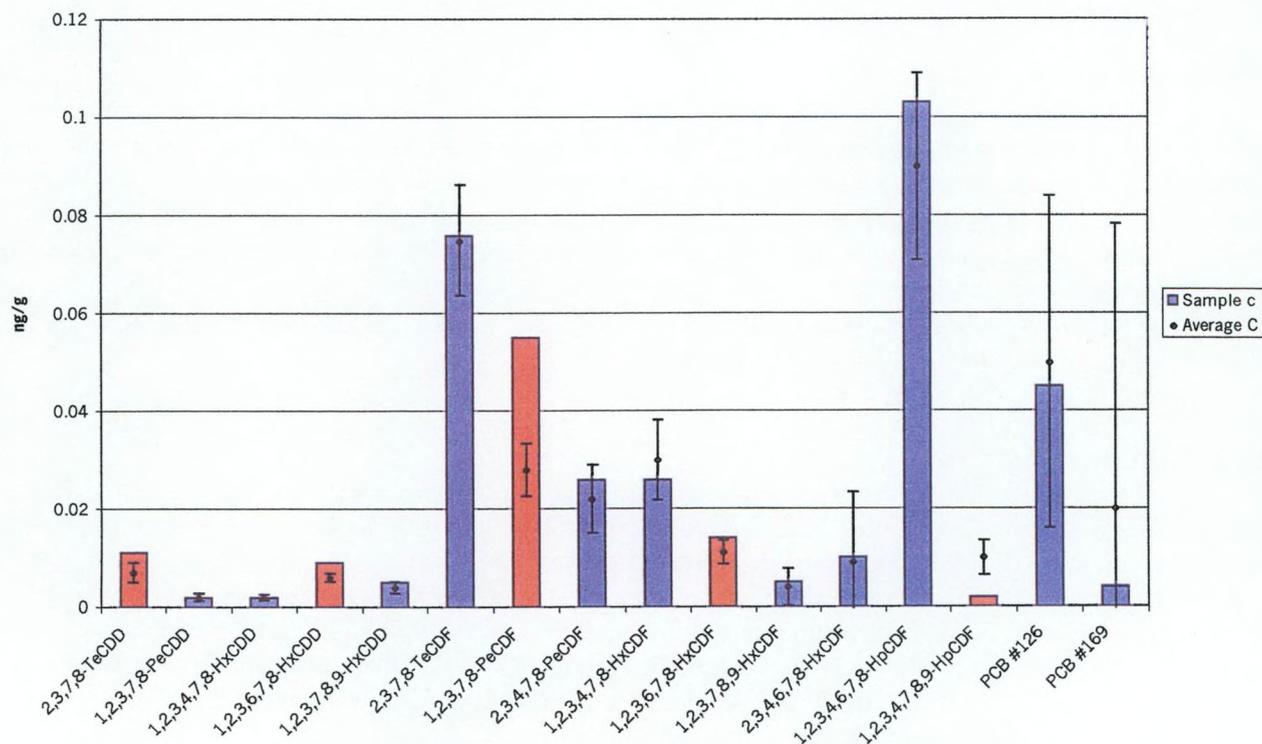


Fig. 20 : Résultats de l'inter-calibration « Umea / 2000 », Sample C (Valeurs élevées retirées : HpCDD, OCDD, OCDF, PCB77). Histogrammes : Valeurs mesurées. Points : Valeurs moyennes de l'échantillon et écarts-types calculés par l'organisateur. Concentrations exprimées en ng/g PS. En rouge : valeurs hors de l'intervalle.

Deux phénomènes peuvent concourir à l'imprécision de mesure relevée :

Etant donné le caractère plus ou moins systématique des erreurs et les taux de recouvrance, il apparaît qu'un problème de calibration de la colonne GC pour certains congénères pourrait être en cause : les facteurs de réponses utilisés sur la colonne SP 23 31 sont ceux obtenus sur la colonne DB 5 MS. Cependant, l'erreur présumée devrait être faible. Ceci serait donc à vérifier lors des prochaines analyses.

D'autre part, il a été observé très récemment par certains auteurs qu'en ASE, sur échantillons de sols et sédiments, une différence d'efficacité d'extraction apparaît entre composés marqués (standard interne) et natifs, tant pour des PAH (sur matériaux certifiés) (Lundstedt et al., 2000) que pour les PCDD/Fs (Henkelmann, 1999) . Le mécanisme de ce phénomène n'est pas encore expliqué, mais serait lié au mode de dopage sur l'échantillon dans la cellule d'extraction : les composés dopés doivent en intégralité traverser l'échantillon. Il s'agirait soit d'un phénomène de chromatographie (partition entre la matrice et le solvant), soit d'un problème de « channeling » (voies préférentielles) ou de tassement de l'échantillon, au sein de la cellule. En conséquence, leur extraction quantitative serait plus longue que pour les composés natifs, équitablement répartis dans la cellule. En effet, lorsque le dopage est réalisé sur une matrice inerte sous l'échantillon, ce phénomène disparaît.

La mauvaise extraction des composés marqués conduit, lors du calcul de quantification, à une surestimation de la quantité de PCDD/Fs natifs dans l'échantillon. Ce phénomène avait déjà été remarqué dans notre laboratoire en SFE (données non publiées), et une solution avait été apportée en aérant l'échantillon avec du sable dans la cellule d'extraction. Diverses solutions devront être testées afin de déterminer si ce type de problème pourrait être responsable des imprécisions observées.

Un nouvel exercice d'intercalibration "Umea" est en cours, qui nous renseignera sur l'efficacité des aménagements prévus.

#### **b. PCBs**

Une erreur est observée systématiquement sur le PCB 77. Ce congénère pose un problème de contamination à tous les laboratoires pratiquant ces analyses, ainsi qu'en atteste l'erreur de mesure : ce congénère semble omni-présent dans les laboratoires. D'autre part, les problèmes mentionnés plus haut pourraient également intervenir. Pour les autres (126 et 169), nos résultats sont dans le "range" attendu. On remarquera que l'erreur sur ces deux congénères est également très importante entre les laboratoires.

Les taux de recouvrances sont satisfaisants ; aucune interférence n'apparaît en GC : la méthode de purification est donc satisfaisante pour les cPCBs également.

#### **6.2.4 Conclusion des essais:**

Les résultats des deux exercices d'inter-calibration réalisés en 2000 sont satisfaisants dans la mesure où notre méthode de préparation d'échantillon donne les résultats escomptés en termes de recouvrance du standard interne et d'élimination des interférences. Une incertitude existe pour certains congénères, qui pourrait être liée d'une part à une calibration insuffisante de la colonne de GC, d'autre part à un problème d'extraction du standard. Une prochaine inter-calibration internationale (printemps 2001), ainsi qu'une inter-calibration au niveau national sur 30 échantillons (été 2001) permettront de vérifier l'effet des mesures prises afin d'accroître la précision des mesures dans ces matrices.

### 6.3 Méthode 3 : remplacement des lavages acides par une étape de GPC semi-automatisée.

La méthode 3 a été étudiée par l'analyse d'échantillons de sédiments de la côte belge, fournis par le réseau ICAS, en particulier le laboratoire de Biologie Marine (U.L.B., Dr P. Dubois). Un échantillon de l'exercice "Ontario" a été adjoint à cette série en tant que témoin.

Dans cette méthode de purification, nous avons remplacé les étapes de lavage acide par une étape de GPC.

Nous avons par ailleurs voulu étudier la possibilité d'accélérer le processus d'analyse en modifiant deux paramètres :

1. **Solvant d'extraction.** Nous avons voulu remplacer le toluène par de l'hexane, afin de déterminer son efficacité dans ces conditions de haute-température. L'objectif est de déterminer si ce solvant pourrait être utilisé en routine, afin d'envisager un couplage direct avec le power-prep sur colonne "HCDS", ce qui supprime une étape de changement de solvant et nous permet d'envisager une méthode de purification « universelle ».

2. **Comparaison des colonnes de GC DB5MS (30 m) - SP2331 (60 m).** Notre objectif était de déterminer dans quelle mesure l'utilisation d'une colonne DB5, connue pour ne pas séparer certains isomères non-2,3,7,8 chloro-substitués, engendrait un risque d'erreur.

#### Résultats :

Les résultats de cette étude sont détaillés en annexe 3.

- Les taux de recouvrance du standard interne sont compris entre 60 et 100 % suivant les congénères, à l'exception de un échantillon pour lequel le taux descend jusqu'à 44% minimum (ast230 DB5). Ces niveaux indiquent donc que l'implémentation de la GPC ne mène pas à une perte de congénères, même dans le cas du sédiment plus riche en matière organique de l'inter-calibration "Ontario". Il sera donc nécessaire que le laboratoire acquière plus d'expérience avec cette technique afin de savoir si des extraits "chargés" ne risquent pas de mener à une dégradation trop rapide de la colonne de GPC.
- L'analyse d'un échantillon de l'exercice d'intercalibration « Ontario » (« sample 4 ») révèle que les rendements d'extraction des congénères PCDD/Fs et cPCBs sont insatisfaisants avec l'hexane, en comparaison des résultats précédemment obtenus au toluène, mais restent cependant dans l'ordre de grandeur attendu.
- L'isomère PeCDF2 fait exception, dans la mesure où une surestimation de sa concentration est réalisée. Par parallélisme avec les résultats obtenus sur les astéries, il s'agit d'une erreur de quantification due à la mauvaise séparation obtenue, sur la colonne de chromatographie en phase gazeuse DB-5MS, entre cet isomère et d'autres isomères non-2,3,7,8 chloro-substitués. La colonne DB-5 MS 30 m. ne semble donc pas permettre une analyse précise pour les congénères tetra- et penta chlorés.
- Les quantités de sédiments analysées (de l'ordre de 5g) étaient certainement insuffisantes, puisqu'on ne retrouve pratiquement pas de PCDD/Fs dans ces échantillons de sable. Ceci est certainement lié à la nature et à la granulométrie du sédiment (sable contenant probablement très peu de matière organique). Néanmoins, nos résultats indiquent que cette fraction (grossière) des sédiments analysée présentent une contamination très faible, puisque l'extraction de l'échantillon témoin "sample4" nous permet de retrouver les ordres de grandeur attendus.

### Conclusion :

L'extraction au toluène est manifestement incontournable. Au niveau de la séparation des congénères, la colonne DB5 engendre une incertitude, ainsi que décrit précédemment. Pour ce type d'échantillon, une combinaison entre colonne SP 2331 (isomères tétra- et penta-chlorés) et colonne DB5 (isomères plus chlorés) semble idéale. Une étude de la colonne DB5 60 m est également à réaliser.

La méthode de pré-purification par GPC donne un excellent résultat en termes de recouvrement du standard interne, mais une incertitude subsiste en ce qui concerne des sédiments très riches en matière organique (risque de colmatage de la phase de GPC).

L'analyse réalisée montre néanmoins une quasi-absence de contamination de cette fraction de sédiments.

### **6.4 Conclusions sur l'analyse des sédiments.**

Au niveau de l'extraction, il est indispensable de travailler au toluène.

La méthode de purification "2" nous donne satisfaction pour la préparation d'échantillon.

Cependant, une imprécision de mesure se marque au niveau de certains congénères lors des exercices d'inter-calibration. Ce phénomène pourrait avoir deux origines. D'une part, la calibration de la colonne pourrait être insuffisante. D'autre part, des tests doivent être entrepris afin de vérifier la possibilité d'une extraction différentielle des composés marqués et natifs dans certains échantillons récemment observée par certains auteurs lors d'extractions ASE.

La colonne « DB 5 MS » 30 m ne semble pas adaptée à ce type d'échantillon, qui contient de nombreux isomères de PCDD/Fs non-2,3,7,8-chloro-substitués au niveau des congénères tétra- et penta-chlorés présentant des risques de co-élution sur cette colonne apolaire. L'utilisation de la colonne SP 2331 mène à une baisse de précision pour les congénères les plus chlorés. Ceux-ci présentant un TEF très faible, cette colonne est donc mieux adaptée. La solution idéale semble résider dans une combinaison de ces deux colonnes en fonction du degré de chloration des congénères. Une autre alternative pourrait résider dans l'utilisation d'une colonne DB5 60m.

En ce qui concerne le remplacement éventuel des lavages acide par une étape de GPC (méthode 3), les résultats obtenus sont très encourageants. Une question se pose cependant dans le cas d'échantillons très "chargés" en matière organique ; des expérimentations seront donc à réaliser en ce sens.

La méthode 2, avec optimisation de l'étape de séparation des isomères en GC, est donc la méthode choisie par le laboratoire au terme de ce travail.

Outre une nouvelle participation à l'exercice « Umea » au printemps 2001, un exercice avec un autre laboratoire belge, portant sur 30 échantillons de sols, sera réalisée en été 2001 et nous permettra également d'entreprendre une validation de la méthode.

### **7 Analyses réalisées sur échantillons biologiques.**

Deux séries de matrices très différentes ont été analysées : du lard et du foie de mammifères marins d'une part ; des astéries d'autre part.

Des analyses de divers produits de la mer destinés à l'alimentation humaine ont également été réalisées (divers poissons, crevettes grises).

## 7.1 Analyses de mammifères marins

Les échantillons de mammifères marins ont été fournis par le groupe "MARIN", et en particulier le laboratoire d'éco-toxicologie de l'Université de Liège (Prof. J.-M. Bouquegneau). Les analyses ont été réalisées dans le courant de l'année 2000. Nous ne sommes pas en mesure de donner une série de résultats complète, mais quelques résultats préliminaires. Notre objectif est ici d'apporter quelque information sur les niveaux de contamination en composés « dioxin-like ».

### 7.1.1 Cachalots *Physeter macrocephalus*.

Ces échantillons sont issus des échouages de 4 individus sur la côte belge pendant l'hiver '94-'95.

No	Lieu d'échouage	Date	Longueur	Poids	Age (courbes [Age / Longueur])	Age (Dents)	Remarque
3	Koksijde	18/11/94	14.4 m	32.5 T	26	28	Echoué vivant
4	Nieuwpoort	18/11/94	18.2 m	61.8 T	>60	>29	Mort en mer

Tableau II : caractéristiques des deux cachalots analysés au laboratoire (d'après Holsbeek et al., 1999)

Holsbeek et al. (1999) ont fait diverses analyses de métaux lourds et composés organochlorés sur ces individus. Ils observent des niveaux de pesticides organochlorés généralement plus bas que dans les autres espèces, mais des teneurs en PCBs élevées. Etant donné les questions qui se posent concernant le lien entre l'augmentation de la fréquence de ce type d'échouage et les teneurs en contaminants organiques de ces animaux, en particulier au niveau des atteintes au système immunitaire, l'analyse de composés « dioxin-like » complémentaire aux mesures d'organochlorés nous semblait intéressante.

Nos objectifs dans ces mesures étaient de :

1. Vérifier la fiabilité de la méthode développée au laboratoire sur ce type de matrice
2. Disposer d'observations en composés « dioxin-like » dans cette espèce, jamais étudiée pour ces contaminants à ce jour, afin de compléter les mesures réalisées par Holsbeek et al. (1999).

L'individu "Cachalot 4" a fait l'objet de 7 analyses au total. 6 ont été réalisées sur un même extrait homogène, par deux méthodes de pré-purification différentes (cf point 4.3). Un second prélèvement de lard a été réalisé pour une 7<sup>e</sup> analyse, afin de déterminer l'efficacité de la méthode de préparation complète. Cette analyse de reproductibilité a montré que nos résultats peuvent être considérés comme fiables pour ces matrices. La moyenne de ces 7 analyses a été prise dans les résultats qui suivent. Pour cet individu, aucun échantillon de foie n'était disponible.

Pour l'individu "cachalot 3", nous avons pu faire l'analyse d'échantillons de lard et foie, afin de comparer les patterns dans ces deux compartiments.

#### 1. Patterns de contamination.

Pour les deux individus, on constate des niveaux très élevés en cPCBs (fig 22). Pour le PCB 126 : plus de 3,5 ng/g graisse dans le lard (plus de 5,3 ng/g graisse dans le foie de "Cachalot3").

"Cachalot 4" présente une contamination en PCB 77 faible en comparaison de "cachalot 3". Pour le PCB 169, des niveaux de l'ordre de 1 ng/g graisse sont présents dans les deux individus.

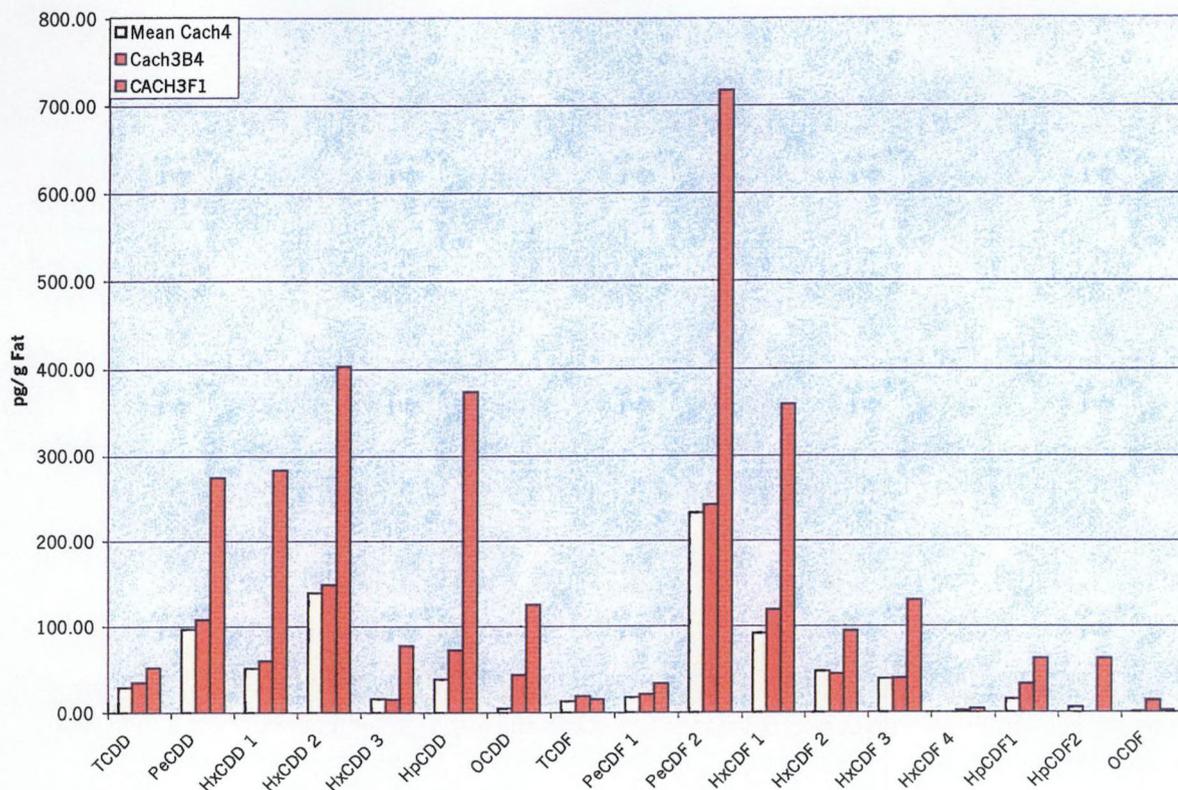


Fig. 21 : Pattern de contamination en 2,3,7,8-PCDD/Fs dans les individus cachalot 3 (« cach3B4 » : lard ; Cach3F1 : foie) et cachalot 4 (Moyenne des 7 mesures effectuées, « Mean cach 4 » : lard). Les résultats sont exprimés en pg / g graisse extraite.

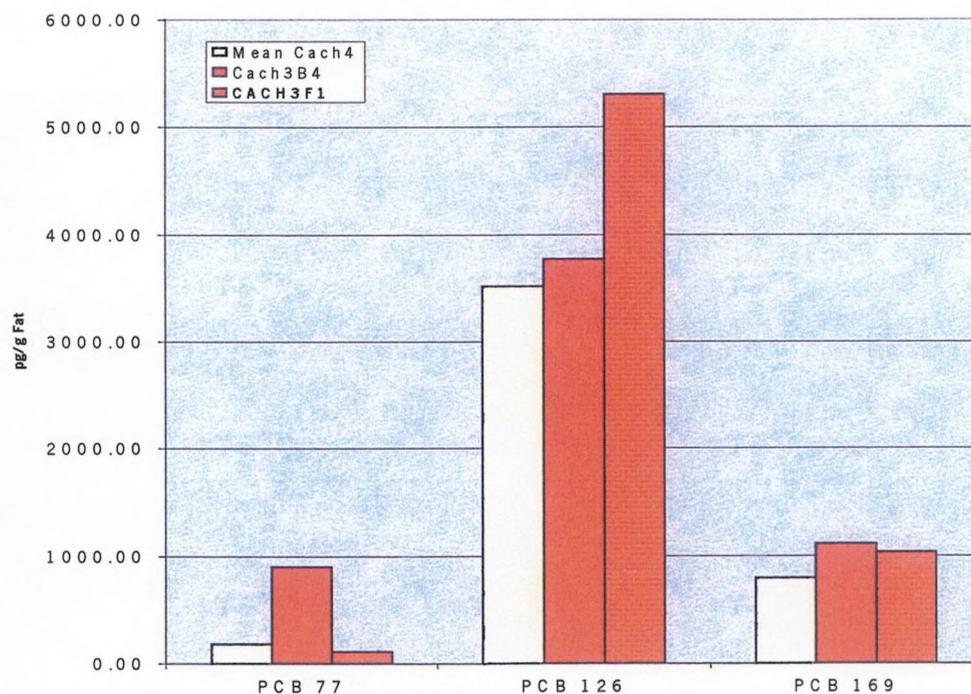


Fig. 22 : Pattern de contamination en cPCBs dans les individus cachalot 3 (« cach3B4 » : lard ; Cach3F1 : foie) et cachalot 4 (Moyenne des 7 mesures effectuées, « Mean cach 4 » : lard). Les résultats sont exprimés en pg / g graisse extraite.

Les patterns des deux individus sont quasiment identiques, ce qui pourrait indiquer une expérience de vie similaire. Cependant, ces deux individus présentent des âges très différents (cf tableau II.). Holsbeek et al. (1999) ont fait la même observation sur les composés organochlorés qu'ils ont analysés ; ils émettent l'hypothèse que ce fait est dû à leur émission massive dans l'environnement à partir des années 50-60, ce qui expliquerait l'absence de différence de niveaux de contamination entre ces individus.

Il semble que certains congénères subissent une métabolisation préférentielles chez les mammifères marins, variable suivant les espèces en raison de différences dans l'arsenal enzymatique en cytochromes P450. Boon et al. (2000) ont observé une métabolisation de la 1,2,3,7,8-PeCDF dans les microsomes de cachalots, ce qui correspond à nos observations pour ce congénère. Par contre, ils montrent une persistance du PCB 77 ; dans nos résultats, on voit que celui-ci s'accumule dans le lard est quasi absent des tissus hépatiques.

Le pattern de contamination en PCDD/Fs est particulièrement élevé pour un Cétacé si l'on se réfère à la littérature (p. ex. Ross et al., 2000 ; Jarman et al. 1996). A notre connaissance, il s'agit des plus hauts niveaux retrouvés dans un Cétacé. Jarman et al. (1996) mentionnent en outre la présence de congénères non 2,3,7,8-chloro-substitués.

## **2. Répartition des contaminants entre lard et foie.**

Nous disposons d'un seul jeu de mesures dans le lard et le foie. Par conséquent, les observations réalisées seront à confirmer.

Nos résultats d'analyse du foie de cachalot 3 mettent en lumière un pattern similaire au lard, mais à des concentrations beaucoup plus élevées lorsque celles-ci sont exprimées par gramme de graisse extraite ; cette observation vaut pour tous les congénères mesurés, à l'exception du PCB 77 qui présente une tendance à disparaître dans ce compartiment, et du PCB 169 qui semble se répartir équitablement entre les deux compartiments. Le résultat sur le PCB 77 est cependant en nette contradiction avec les observations réalisées sur les marsouins (cf infra).

Les processus métaboliques en jeu semblent différents selon les congénères "dioxin-like" considérés, ce qui correspond aux observations réalisées par d'autres auteurs.

A signaler que la PeCDF2 présente une concentration de 717 pg/g graisse dans le foie, soit 0,7 ng/g graisse!

## **3. Charge TEQ des individus.**

La charge TEQ en PCB dans le lard est d'environ 60 % du TEQ total pour les 2 individus (fig. 24), avec une nette dominance du PCB 126 (TEF = 0,1) (fig. 23), ce qui correspond aux observations généralement réalisées.

Dans le foie de Cachalot 3 cependant, le rapport est inversé, indiquant de nouveau des différences de processus métaboliques pour les différents congénères. Le phénomène est imputable à une différence dans le rapport des concentrations [Foie / Lard] pour les PeCDD et PeCDF2 d'une part, et pour le PCB 126 d'autre part. Cette plus grande concentrations des PCDD/Fs dans les tissus hépatiques est particulièrement intéressante.

La charge TEQ en PCDD/Fs est très élevée en comparaison des niveaux retrouvés chez d'autres Cétacés, y compris chez l'orque *Orcinus orca* (prédateur de petits mammifères marins) en Colombie Britannique (Jarman et al., 1996 ; Ross et al., 2000), région ayant été confrontée à un problème de contamination par les effluents de blanchisseries de papiers. Les niveaux en PCBs non ortho substitués sont quant à eux du même ordre de grandeur.

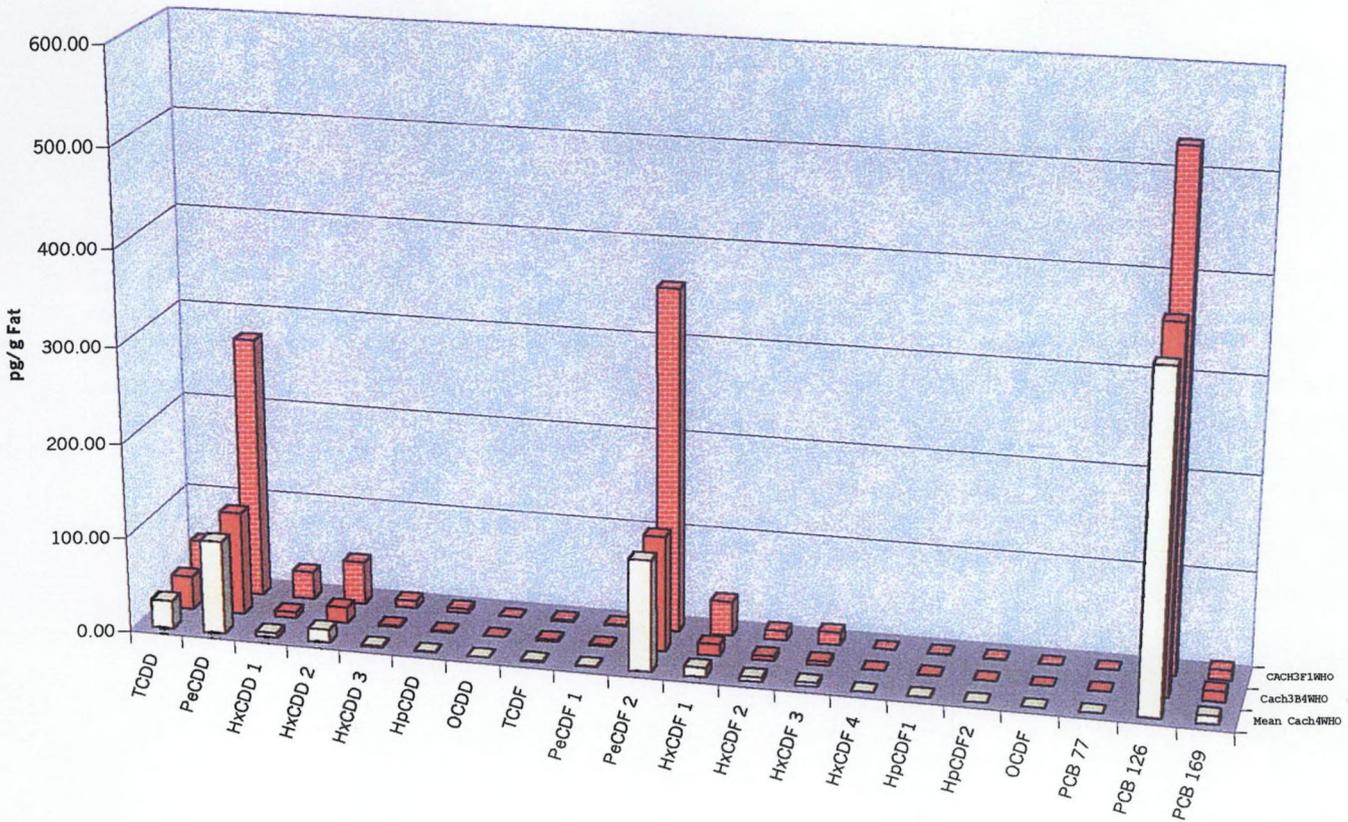


Fig. 23 : Pattern de contamination TEQ (modèle WHO-OMS) dans les individus cachalot 3 (« cach3B4 » : lard ; « Cach3F1 » : foie) et cachalot 4 (Moyenne des 7 mesures effectuées, « Mean cach 4 » : lard). Les résultats sont exprimés en pg TEQ / g graisse extraite.

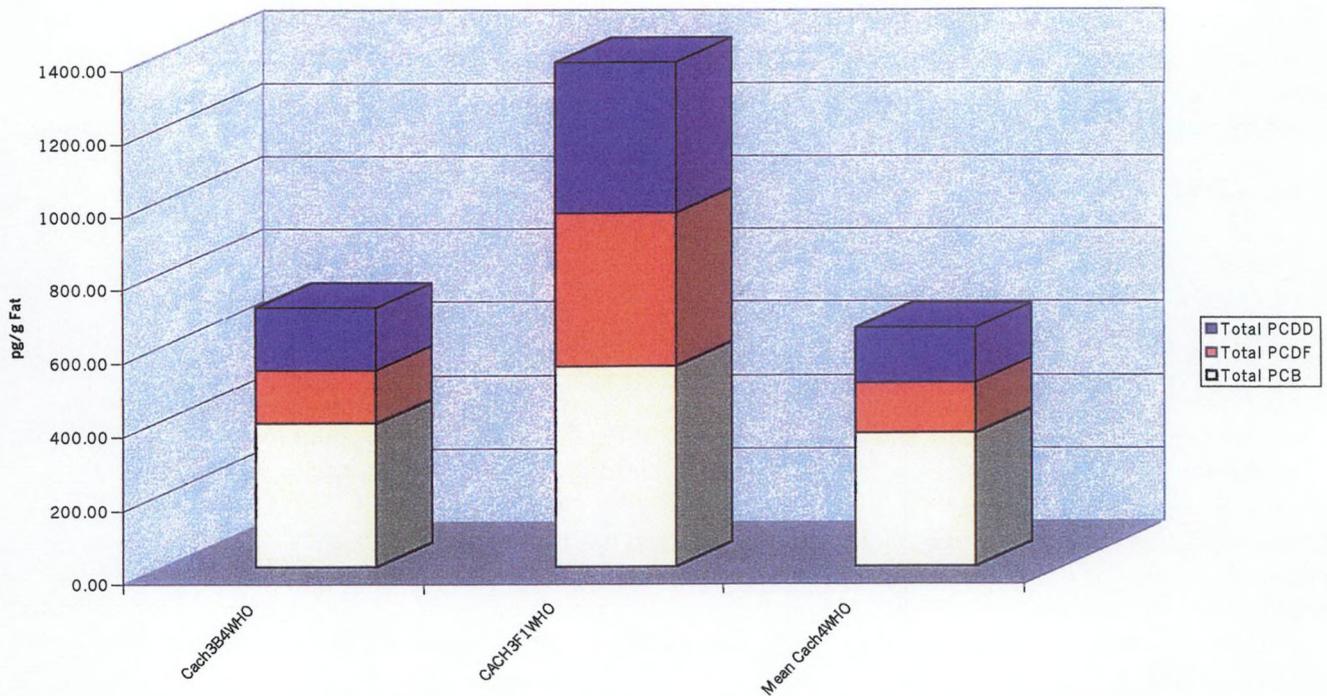


Fig. 24 : Contribution des PCDD, PCDF et cPCBs au TEQ total dans les individus cachalot 3 (« cach3B4 » : lard ; « Cach3F1 » : foie) et cachalot 4 (Moyenne des 7 mesures effectuées, « Mean cach 4 » : lard). Les résultats sont exprimés en pg TEQ / g graisse extraite.

En PCDD/Fs, on n'observe pas de différence majeure entre les contributions des PCDDs et PCDFs au TEQ total (fig 24). Les congénères les plus toxiques (présentant un TEF<sup>1</sup> élevé) sont présents en très fortes concentrations. Par conséquent, le pattern TEQ (fig. 23) met en lumière l'importante contribution des TCDD (TEF = 1), PeCDD (TEF = 1), PeCDF2 (TEF = 0,5).

On constate que le foie de "cachalot 3" présente une charge TEQ totale environ double de celle du lard : la charge toxique mesurée dans ce compartiment est de 1374 pg TEQ / g graisse , contre 701 pg TEQ / g graisse dans le lard (et 645 pg TEQ / graisse dans l'individu « Cachalot 4 »).

Nous arrivons donc à des quantités d'équivalents 2,3,7,8-TCDD de l'ordre du ng TEQ / g de graisse, probablement plus en ajoutant les PCB mono-ortho substitués (dont la charge TEQ est généralement équivalente à la charge TEQ en PCB coplanaires dans les mammifères marins). Ces niveaux peuvent être considérés comme particulièrement élevés en comparaison d'observations réalisées sur d'autres Cétacés.

Nos analyses de PCDD/Fs et cPCBs sont à notre connaissance les premières pour des individus de cette espèce. Si aucun lien de cause à effet ne peut être établi entre présence de contaminants et échouages, il semble cependant très clair qu'à de tels niveaux de contamination, étant donné la toxicité reconnue des composés « dioxin-like », les populations ne peuvent qu'être gravement affectées. L'immunosuppression est un des effets majeurs de ce type de contaminant chez les mammifères marins, qui va de pair avec des désordres dans les systèmes reproducteur et endocrinien (cf Van Loveren et al., 2000).

Enfin, de tels niveaux doivent impérativement conduire à la plus grande prudence lors du traitement des carcasses.

### **7.1.2 Marsouins communs *Phocoena phocoena*.**

Le groupe MARIN nous a également fourni trois séries d'échantillons de Marsouins issus des échouages à la côté belge. Les caractéristiques de ces trois animaux sont repris au tableau III. Il s'agit d'individus juvéniles. Pour l'individu "Mar3", nous n'avons pu faire d'analyse sur le lard.

N°	Age	Sexe	Date échoué	Location	longueur	Poids	Lard (mm)
MAR 1 (A99/939)	Juvénile	F	03/99	Dunkerke	114	22,3	21
MAR 2 (A99/762)	Juvénile	F	02/99	Middelkerke	101	25,5	25
MAR 3 (A99/724)	Juvénile	M	02/99	Lombardsijde	115	22,7	30

Tableau III : caractéristiques des trois marsouins analysés au laboratoire (groupe MARIN).

Sur base des données de la littérature, qui indiquent des niveaux relativement élevés chez les adultes, nous avons travaillé sur des quantités d'extraits de l'ordre de 0,5g de graisse.

#### **1. Patterns de contamination.**

Les patterns obtenus (fig 25) montrent une quasi absence des PCDD/Fs des échantillons de lard et quelques concentrations plus élevées dans les foies, lorsque celles-ci sont rapportées aux lipides extraits. Les PCBs sont présents à faibles niveaux. Ceci montre que les niveaux sont beaucoup plus bas qu'attendus, et que des extractions sur davantage de matériel doivent être réalisées pour une discussion sur les patterns, ce qui n'est plus possible sur ces échantillons. Les juvéniles de cette espèce, en Mer du Nord, présentent donc apparemment une contamination très faible en PCDD/Fs. D'une manière générale, Mar1 et Mar2 présentent des niveaux similaires et plus élevés que Mar3. On peut constater que les niveaux en OCDD dans le foie sont particulièrement élevés en comparaison des autres PCDD/Fs. On remarquera également la présence de la 2,3,4,7,8-PeCDF ("PeCDF2") chez l'individu "Mar1".

<sup>1</sup> Pour plus d'information sur les « Facteurs d'Equivalence Toxique », se reporter à notre premier rapport d'activités).

Pour les PCBs l'analyse révèle de légères différences de niveaux dans les lards. Il convient cependant de garder à l'esprit que l'erreur de mesure sur les PCBs peut, aux niveaux mesurés, influencer considérablement l'allure des résultats. L'individu MAR1 montre une concentration en PCB 77 nettement plus importante que les autres, en particulier dans le foie (dans ce compartiment, les niveaux sont largement au-dessus de l'erreur de mesure) ; ces derniers présentent des niveaux similaires. Nous remarquerons que pour les trois, et dans les

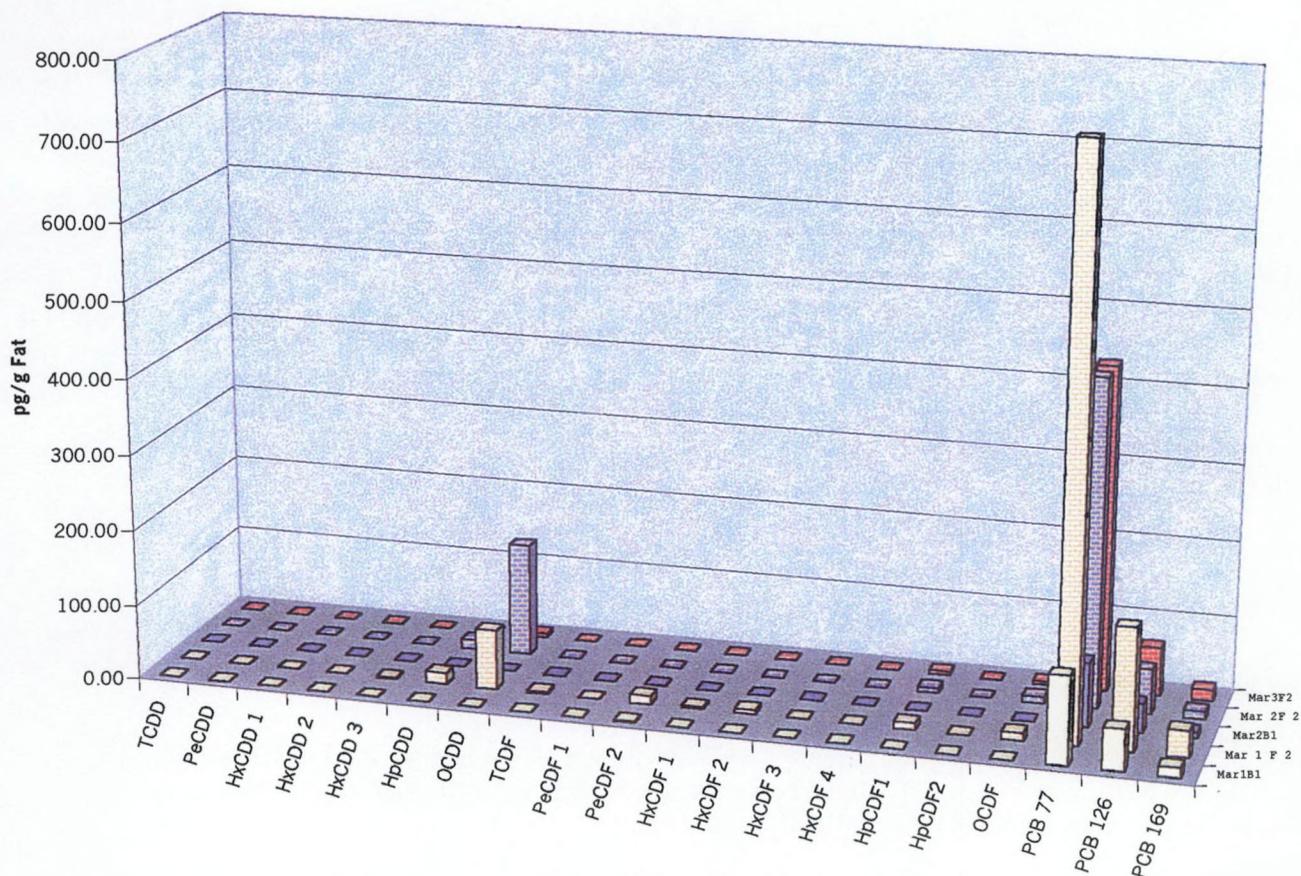


Fig. 25 : Pattern de contamination complet en 2.3.7.8-PCDD/Fs et cPCBs dans les marsouins (MarXBY : lard ; Mar XFY : foie ; X représente le n° de l'individu, Y représente le n° de l'essai). Les résultats sont exprimés en pg / g graisse extraite.

deux tissus, une décroissance de la concentration se marque vers les plus chlorés.

Sur base des mesures dans le foie, on peut donc conclure de ces résultats que Mar1 est plus contaminé, Mar2 et Mar3 présentent des niveaux similaires. Une comparaison des patterns de congénères PCDD/Fs n'est pas réalisable. Cette très faible contamination en PCDD/Fs est en accord avec les résultats obtenus par Bruhn et al. (1999) sur les jeunes marsouins en Mer du Nord, et Bergrena et al. (1999) sur les marsouins de la mer Baltique et du Kattegat/Skagerrak. D'une manière générale, ces résultats correspondent à ce qui est généralement observé chez les Cétacés.

## 2. Répartition des contaminants entre lard et foie.

Comme dans le cachalot, on observe des concentrations plus importantes dans le foie. Pour le PCB 77 cependant, Mar1 et Mar2 montrent une concentration beaucoup plus élevée que dans le lard, ce qui est contraire à l'observation sur Cachalot 3. Pour les PCBs 126 et 169, les niveaux sont trop faibles pour être interprétés. Il semble cependant que le rapport des concentrations dans le lard et le foie soit nettement plus élevé pour le PCB 77 que pour le PCB 126, et ce dans les deux échantillons Mar1 et Mar2.

### 3. Patterns TEQ.

La charge TEQ totale calculée est très faible, de l'ordre de 25 pg TEQ /g graisse dans le foie de Mar1, 5 pg TEQ/ g graisse dans les autres échantillons, ce qui correspond bien avec les résultats d'autres auteurs. Ceux-ci ont mis en évidence une contribution majeure de PCB mono-ortho substitués (non mesurés ici) dans le TEQ. La charge TEQ que nous mesurons est essentiellement le fait des PCBs coplanaires, en particulier le PCB 126.

Nous avons travaillé sur des quantités de graisse de l'ordre de 0.5g, quantité manifestement insuffisante pour ces animaux. Une discussion sur les patterns de contamination des jeunes marsouins en Mer du Nord nécessitera une extraction sur davantage de matériel.

## 7.2 Analyses d'asteries *Asterias rubens*.

### 7.2.1 Observations analytiques

L'analyse détaillée des résultats est reprise dans l'annexe 3, qui est le rapport d'essai fourni au Laboratoire de Biologie Marine de l'ULB. On retiendra :

- Les astéries présentent d'importantes concentrations de PCDD/Fs non 2,3,7,8-chlorosubstitués. Ceci n'avait à notre connaissance jamais été observé précédemment. Au niveau analytique, les remarques concernant l'échantillon QPL005BT de l'exercice Quasimeme (cf point 4.2.2) sont donc également d'application pour ce qui concerne la colonne de GC utilisée : la colonne DB5MS 30 m engendre un risque d'incertitude lors de la quantification des furannes moins chlorés.
- Les pourcentages de lipides déterminés par l'extraction ASE correspondent aux valeurs moyennes obtenues pour ces organismes avec la méthode de détermination lipidique "Bligh and Dyer". Néanmoins, la nature exacte de l'extrait n'est pas connue et une détermination lipidique additionnelle est donc souhaitable afin que le résultat puisse faire l'objet de comparaisons avec d'autres travaux.

En ce qui concerne la présence d'isomères non 2,3,7,8 chloro-substitués, des observations similaires ont été faites par certains auteurs sur d'autres organismes, en particulier des Crustacés. Ces résultats semblent indiquer que les invertébrés accumulent les PCDD/Fs non nécessairement 2,3,7,8 chloro-substitués, à l'inverse des vertébrés. Les connaissances dans ce domaine sont encore très sommaires, étant donné l'intérêt que suscitent les seuls 2,3,7,8 chloro-substitués pour leurs effets toxiques dans les niveaux trophiques supérieurs.

Par conséquent, l'analyse de tout échantillon d'invertébré pose manifestement le même problème que les échantillons inorganique au niveau de la colonne de GC. Il sera donc important d'étudier cet aspect dans nos prochains travaux.

### 7.2.2 Patterns de contamination.

Les résultats présentés en annexe 3 ont été transcrits sous forme graphique afin de mettre en valeur la répartition des congénères dans ces animaux (fig. 26 à 29.). En ce qui concerne les PCDD/Fs, il s'agit à notre connaissance des premières observations jamais réalisées dans un Echinoderme.

Nous avons repris deux résultats jugés satisfaisants, Ast-SO1-2 et Ast-230. Etant donné les incertitudes en ce qui concerne la précision de l'analyse, les valeurs obtenues sur la PeCDF2 sont à considérer comme indicatives pour des études ultérieures.

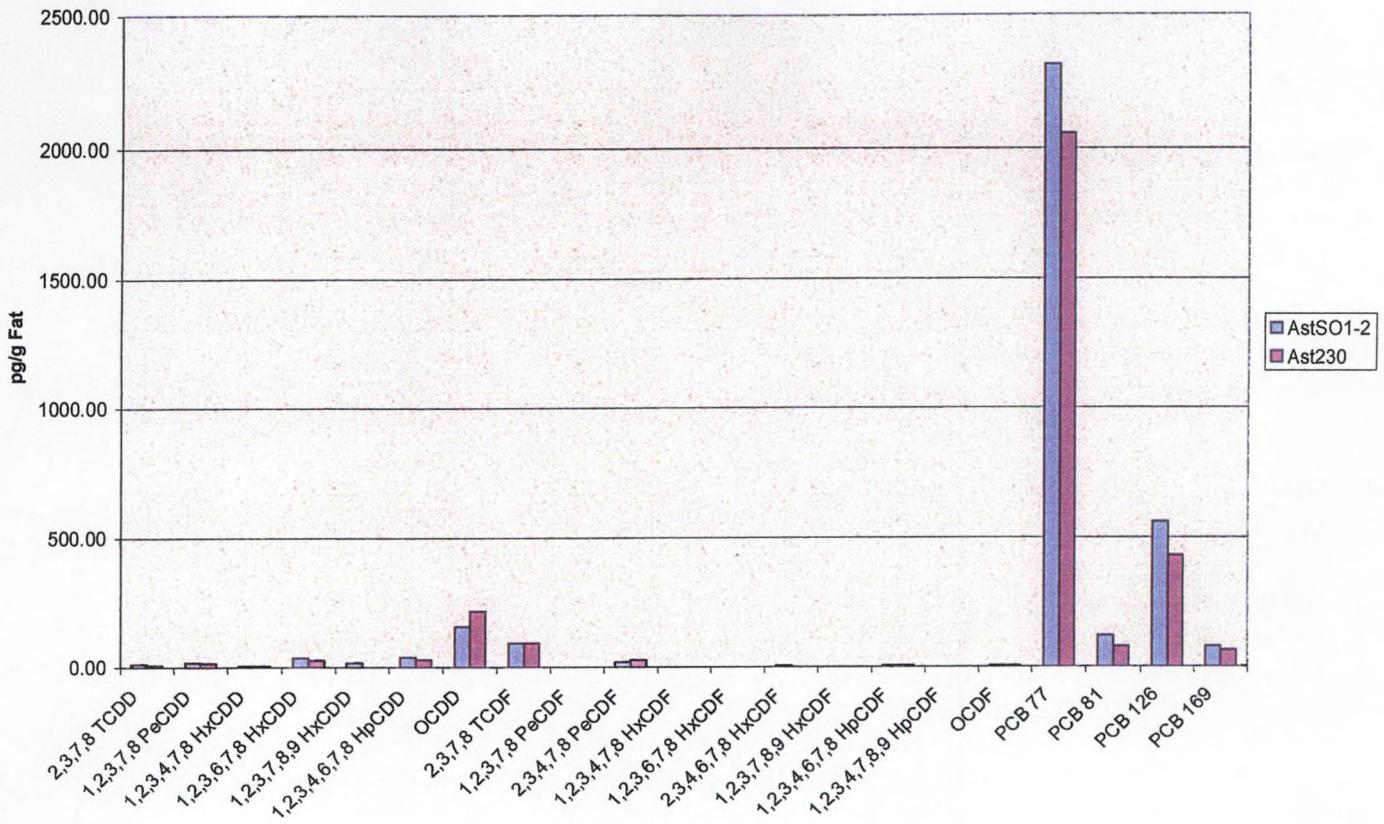


Fig. 26 : Pattern de contamination complet en 2,3,7,8-PCDD/Fs et cPCBs dans les astéries des stations SO1 et 230 (côte belge). Les résultats sont exprimés en pg / g graisse extraite.

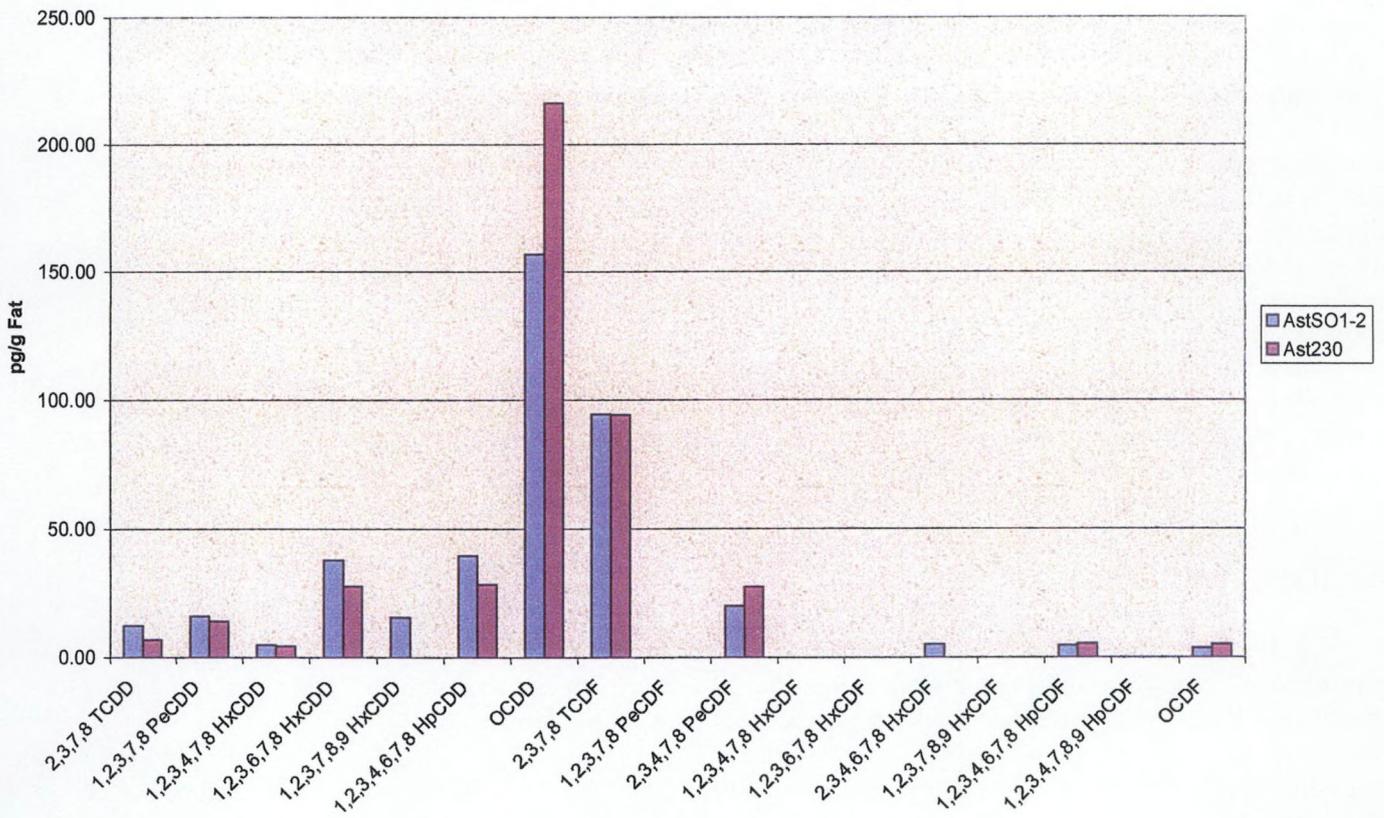


Fig. 27 : Pattern de contamination en 2,3,7,8-PCDD/Fs dans les astéries des stations SO1 et 230 (côte belge). Les résultats sont exprimés en pg / g graisse extraite.

On observe (fig 26) des niveaux importants en PCB77 et PCB 126 dans les deux astéries analysées. En ce qui concerne les PCDD/Fs (fig 27), les dioxines dominent les patterns (tous les congénères présents), avec une forte contamination en OCDD, à l'exception des TCDF et 2,3,4,7,8-PeCDF, qui sont aussi les plus toxiques parmi les furannes

### 7.2.3 Patterns TEQ.

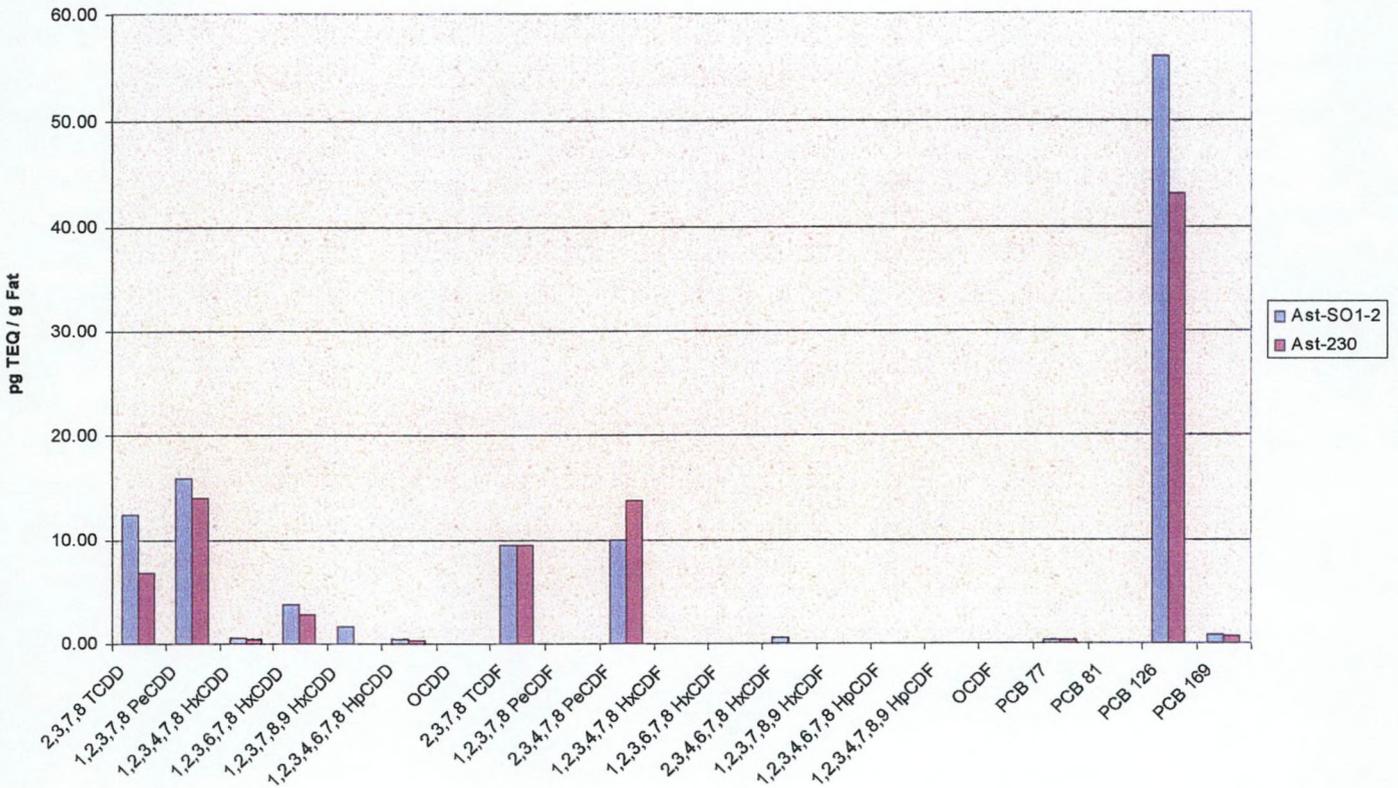


Fig. 28 : Pattern de contamination TEQ en 2,3,7,8-PCDD/Fs et cPCBs dans les astéries des stations SO1 et 230 (côte belge). Les résultats sont exprimés en pg TEQ / g graisse extraite.

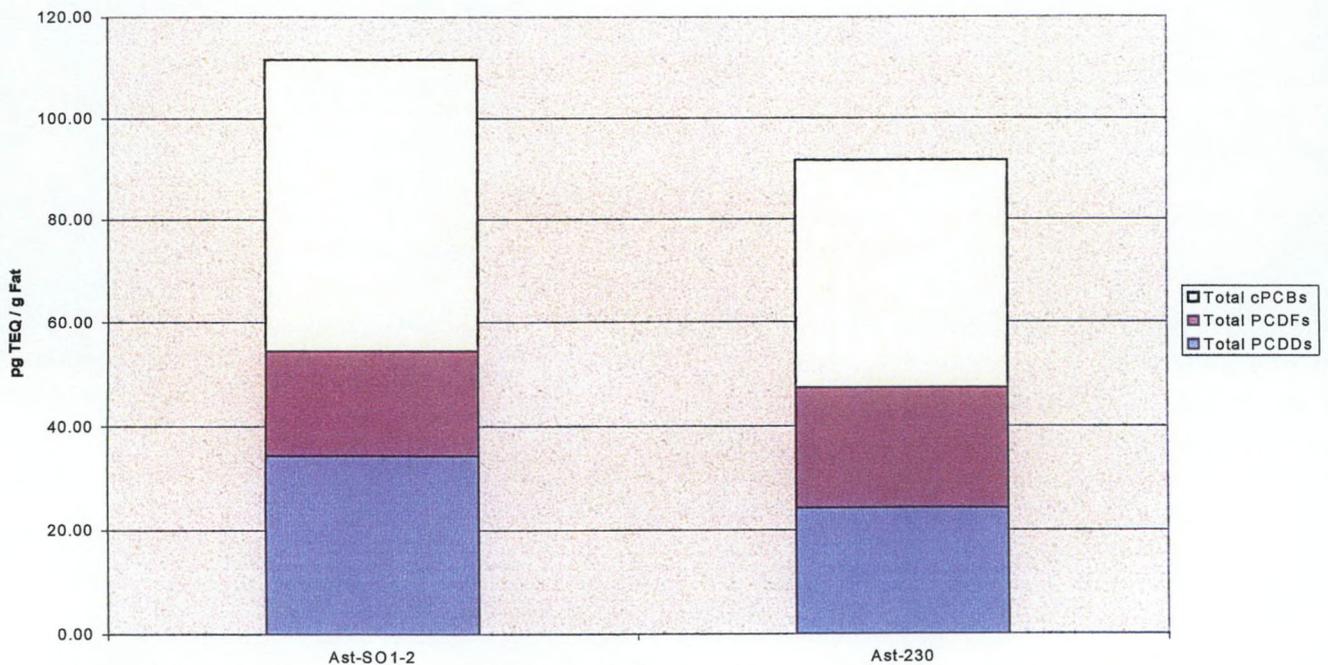


Fig. 29 : contribution des PCDD, PCDF et cPCB à la charge TEQ totale dans les astéries des stations SO1 et 230 (côte belge). Les résultats sont exprimés en pg TEQ / g graisse extraite.

### 7.3 Divers organismes aquatiques.

Le laboratoire a également réalisé quelques analyses ponctuelles dans des poissons et des crevettes. Il s'agit d'animaux issus du marché alimentaire belge, dont l'origine nous est inconnue.

#### 7.3.1 Observations chez diverses espèces de poissons.

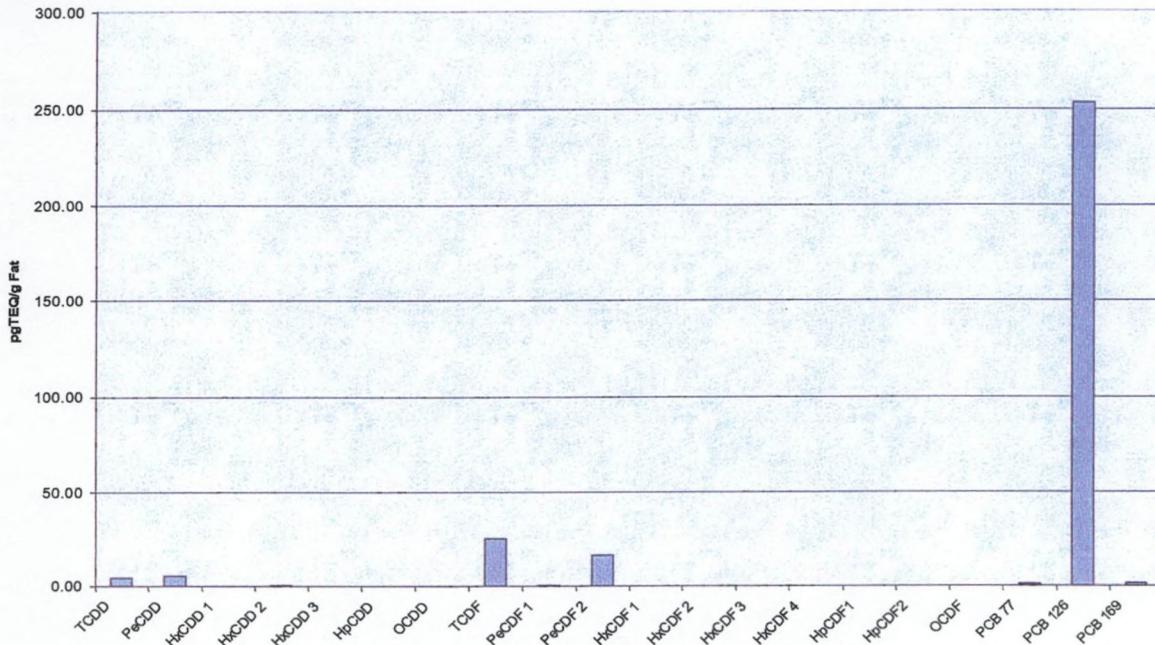


Fig 30 : pattern TEQ en PCDD/Fs et cPCBs mesurés dans un extrait de maquereau (pattern de contamination en pg/g graisse : cf fig. 8 et 9, point 3.3.1). Résultats exprimés en pg TEQ / g graisse.

Un échantillon de maquereau a fait l'objet d'une étude comparative entre la GPC et la colonne HCDS en pré-purification (cf Point 3.3.1.). Les PCBs sont présents en concentrations très élevées, décroissantes avec le degré de chloration (fig. 8). Les dioxines et furannes moins chlorés dominent le pattern PCDD/Fs (fig. 9). En termes de TEQ, le PCB 126 est le contributeur majeur (fig. 30). Les TCDD, PeCDD, TCDF et PeCDF2 sont les contributeurs majeurs du TEQ total en PCDD/Fs, largement inférieur au TEQ total en cPCBs. D'après les valeurs retrouvées dans la littérature, la contamination observée en PCB 126 dans ces trois individus semble exceptionnellement haute.

Nous avons également analysé les muscles de trois autres espèces :

2 anguilles *Anguilla anguilla*, truite *Salmo sp.*, et roussette *Scyliorhinus canicula* (éla-smobranche).

Les patterns de contamination retrouvés chez ces différentes espèces sont relativement différents (fig. 31). Les cPCBs sont largement majoritaires, à l'exception de la roussette dans laquelle on trouve une importante concentration en OCDD. Parmi les PCDD/F, les congénères moins chlorés sont présents et contribuent d'une manière significative au TEQ (fig. 32). Le PCB 126 est le contributeur majeur dans tous les cas, ce qui engendre une nette dominance des PCBs par rapport aux PCDD/Fs dans le TEQ total. Les valeurs de TEQ total oscillent entre 5 pg TEQ / g graisse (roussette), 25 pg TEQ / g graisse (anguilles) et 35 pg TEQ / g graisse (truite). Nous nous trouvons donc dans tous les cas au-dessus des valeurs recommandées par les normes dans les denrées alimentaires. Les anguilles en particulier, dont la teneur en graisse dans le muscle est de l'ordre de 20 à 30 %, posent donc de sérieuses questions de santé publique.

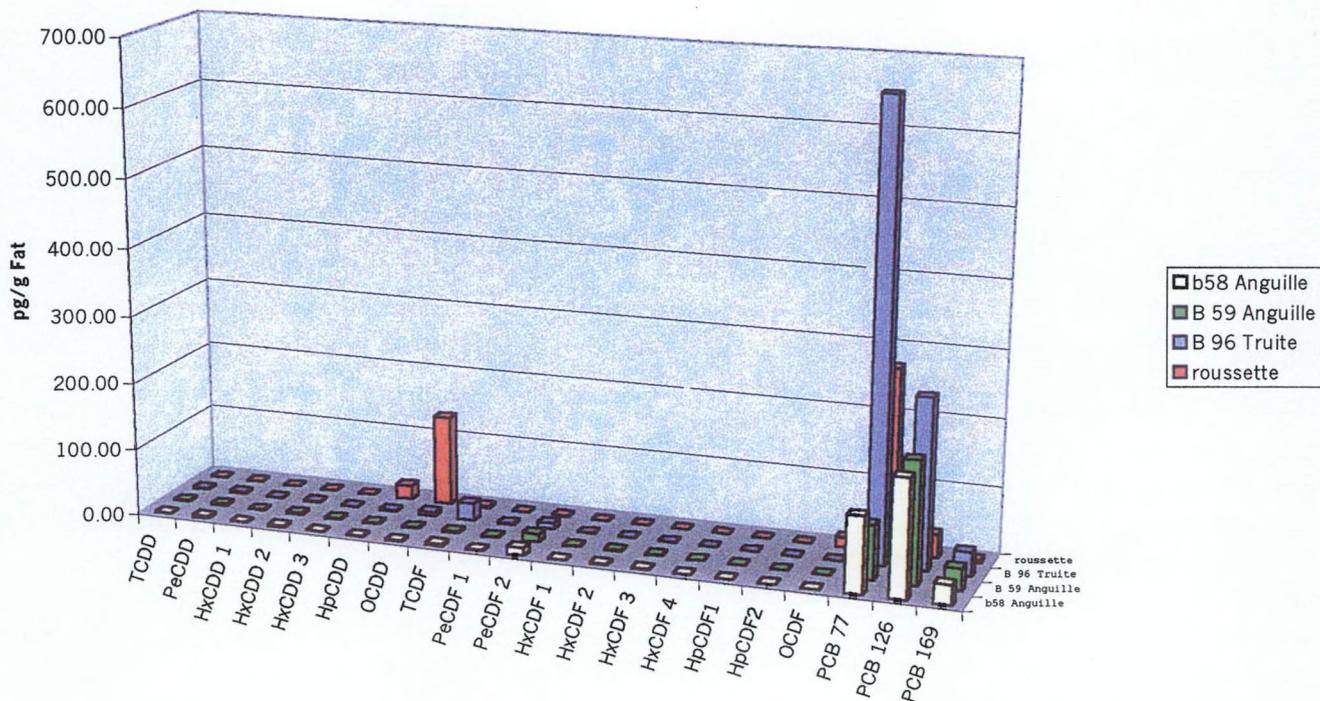


Fig. 31 : Pattern de contamination en PCDD/Fs et cPCBs dans trois espèces de poissons analysées au laboratoire : roussette *Scyliorhinus canicula* ; anguille *Anguilla anguilla* (2 échantillons) ; truite *Salmo sp.* Résultats exprimés en pg / g graisse.

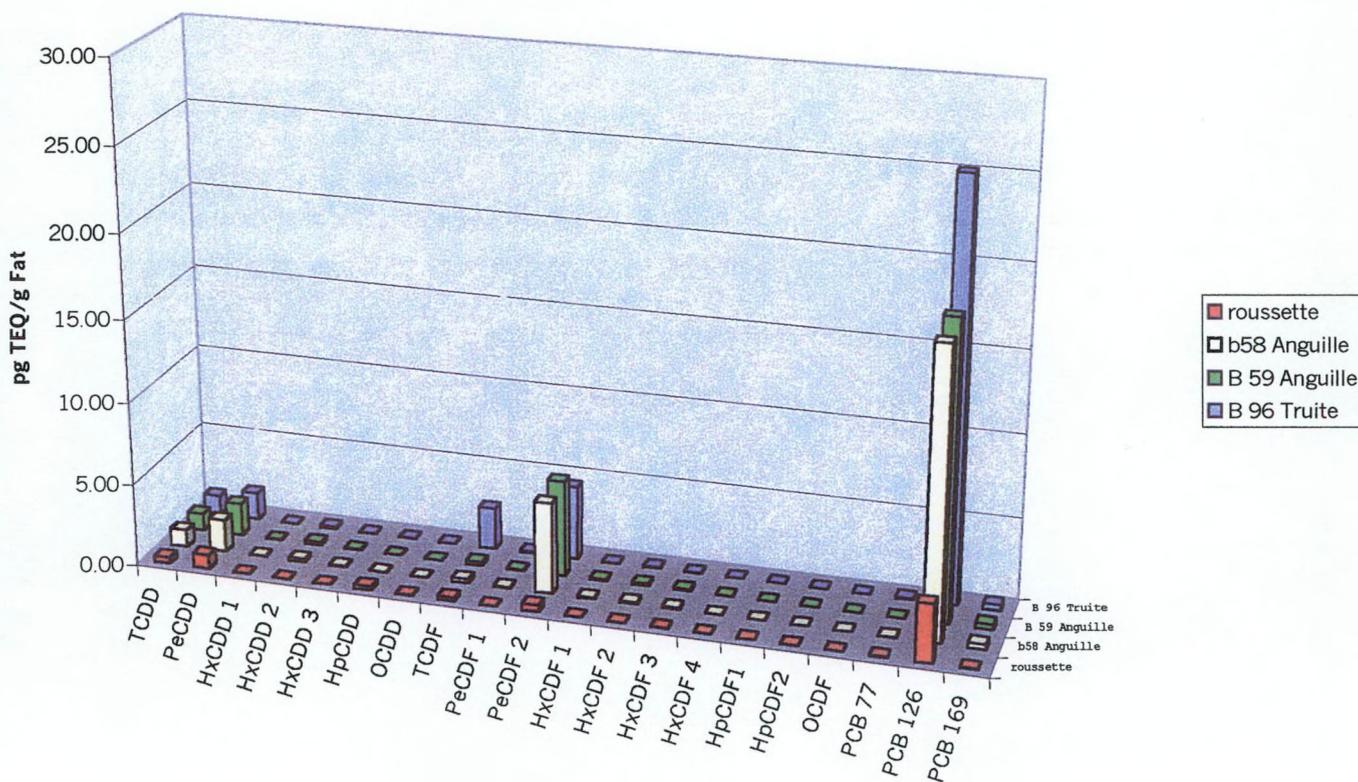


Fig. 32 : Pattern de contamination TEQ en PCDD/Fs et cPCBs dans trois espèces de poissons analysées au laboratoire : roussette *Scyliorhinus canicula* ; anguille *Anguilla anguilla* (2 échantillons) ; truite *Salmo sp.* Résultats exprimés en pg TEQ / g graisse.

### 7.3.2 Observations dans des échantillons de crevettes.

Nous avons également réalisé des analyses dans trois échantillons de crevettes « grises » de Mer du Nord. Ces mesures mettent en évidence, de nouveau, d'importantes concentrations en cPCBs, décroissantes avec le degré de chloration (fig. 33). D'autre part, on notera la dominance de l'OCDD et des furannes tetra et pentachloré dans le pattern PCDD/Fs.

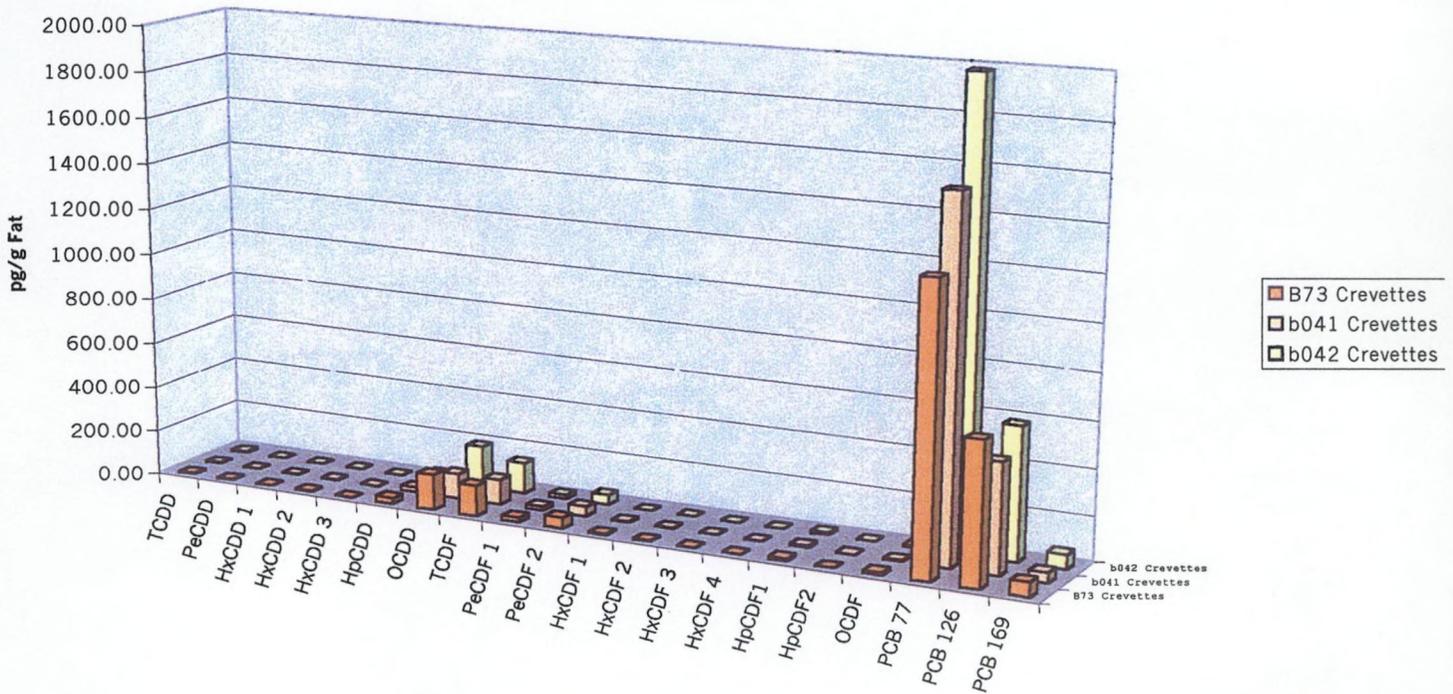


Fig. 33 : Pattern de contamination en PCDD/Fs et cPCBs dans trois échantillons de crevettes « grises » de Mer du Nord (espèce non identifiée) . Résultats exprimés en pg / g graisse.

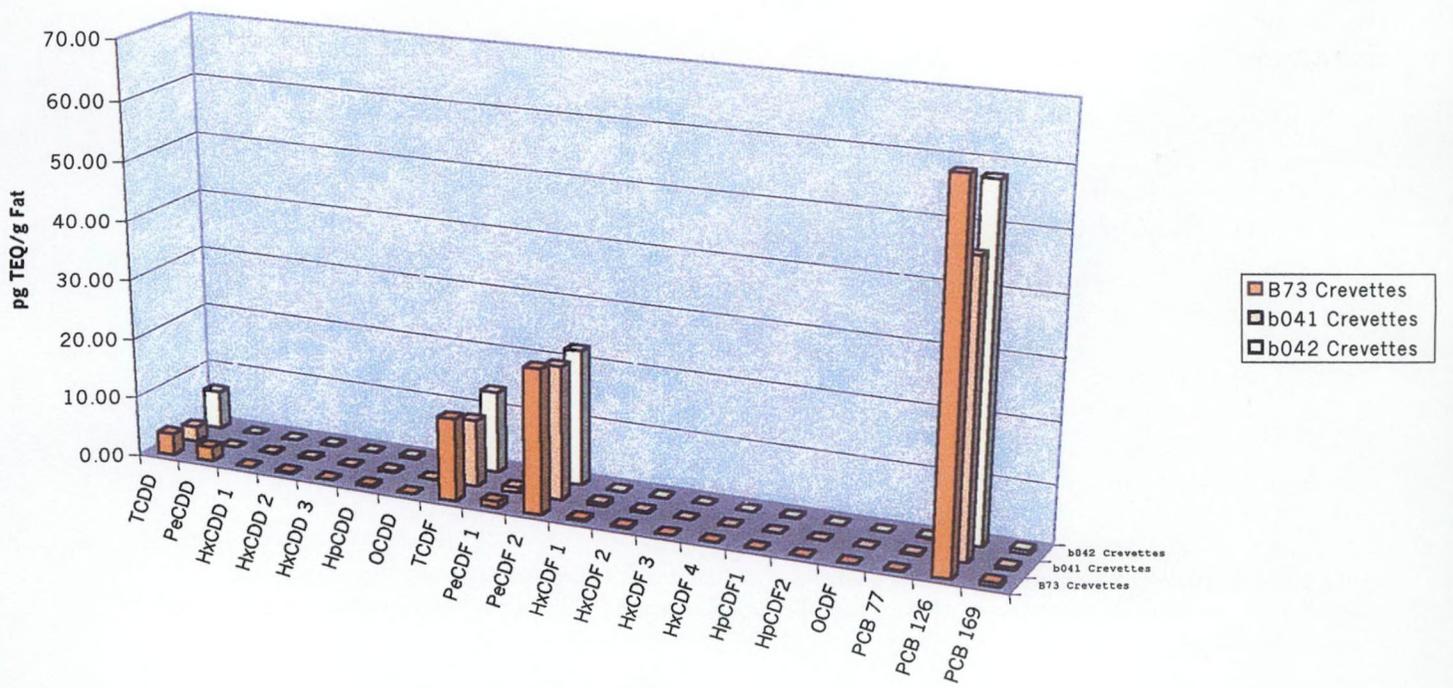


Fig. 34 : Pattern de contamination TEQ en PCDD/Fs et cPCBs dans trois échantillons de crevettes « grises » (espèce non identifiée) . Résultats exprimés en pg TEQ / g graisse.

En ce qui concerne la PeCDF2, les remarques formulées précédemment concernant des problèmes de co-élution sur la colonne DB5 MS (Points 3.2.2.2 et 6.2.1) sont d'application : la valeur mesurée doit être considérée comme indicative en raison d'une incertitude lors de la quantification, due à la présence d'isomères non-2,3,7,8-chloro-substitués.

Exprimés en TEQ (fig.34), ces mesures indiquent la dominance du PCB 126, suivi par les PeCDF2, TCDF, TCDD et PeCDD. PCDD/Fs et cPCBs montrent une contribution similaire au TEQ total. Ce dernier est de l'ordre de 100 pg TEQ / g graisse et plus. Les teneurs en graisse sont de l'ordre de 0,5 à 1 % dans ces organismes.

#### **7.4 Conclusions sur les analyses réalisées.**

Quel que soit l'organisme dans lequel nous avons fait des mesures, et indépendamment des niveaux observés, on peut observer que :

- Les PCBs sont présents à des concentrations environ 10 fois plus élevées que les PCDD/Fs.
- Les concentrations en PCBs sont décroissantes avec le degré de chloration. Le PCB 77 est toujours présent en très larges quantités. Le cachalot fait figure d'exception : il s'agit de la seule espèce étudiée dans laquelle les concentrations en PCB 77 sont nettement plus faibles que les concentrations en PCB126.
- Le PCB 126 domine le pattern TEQ dans tous les cas. Il est le contributeur majeur au TEQ total.
- En général, les PCDD/Fs contribuent au TEQ total à raison de 40 à 60 % suivant les cas.
- La charge TEQ des organismes consommés par l'homme est supérieure aux normes définies pour les PCDD/Fs dans les denrées alimentaires dans tous les cas. Les échantillons de crevettes sont particulièrement contaminés.

Ces résultats montrent que des analyses de monitoring de composés dioxin-like seront à mettre en œuvre dans le cadre d'une gestion durable de la Mer du Nord, tant pour le suivi des niveaux de contaminations des chaînes alimentaires (contaminations importantes de niveaux supérieurs) que pour les produits de la pêche (problèmes par rapport aux normes définies pour les composés « dioxin-like »).

Il est également à signaler qu'en ce qui concerne la fixation des PCDD/Fs dans les compartiments biologiques, nos travaux sur le sang de mammifères laissent apparaître que les fractions sanguines riches en protéines de transport présentent des niveaux élevés. Ce compartiment pourrait donc également être important à étudier dans les cibles biologique.

### **8 Etude de méthodes alternatives d'analyse.**

En marge de nos travaux sur la mise au point de méthodes précises d'analyse des PCDD/Fs et cPCBs, qui requièrent l'analyse par spectrométrie de masse de haute résolution, notre laboratoire a également étudié la possibilité d'utiliser des méthodes d'analyse alternative, plus rapides et moins coûteuses. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication jointe en annexe 4.

Etant donné les questions que soulèvent les teneurs en composés "dioxin-like" relevées dans les organismes marins susceptibles d'entrer dans la chaîne alimentaire humaine (poissons, crustacés, mollusques), des questions se posent en matière de normes alimentaires pour ces matrices. Il serait donc intéressant de pouvoir disposer de méthodes de "screening" rapides et peu coûteuses, donnant lieu à une réponse de type "positif / négatif", avant analyse confirmative par HRMS dans le cas d'échantillons déclarés "positifs".

Deux voies ont été explorées par le laboratoire :

### **1. Spectrométrie de masse en tandem.**

Nous avons étudié la possibilité de remplacement de la HRMS par une technique de spectrométrie moins sensible mais plus sélective, la spectrométrie de masse en tandem "MS-MS" dans une trappe à ions. En effet, ce type de détecteur représente un coût d'achat et de maintenance largement inférieur à un spectromètre à haute résolution. Le procédé de double fragmentation des molécules issues de la colonne de GC sur lequel repose ce type d'analyse permet d'accroître de façon considérable la sélectivité du détecteur, ce qui autorise en principe l'injection d'échantillons peu purifiés, contrairement au spectromètre de haute-résolution. Cependant, la sensibilité de ce type de spectromètre est moindre. L'analyse de matrices biologiques faiblement contaminées passe donc par l'accroissement de la taille d'échantillon, ou l'injection de la totalité de l'extrait purifié en GC (injection « large volume »). Etant donné les niveaux de contamination présentés par les organismes marins, les charges TEQ admissibles dans ces matrices qui seront prochainement appliquées, et les limites de détection associées à ces normes, permettront peut-être de développer ce type d'analyse.

### **2. Tests biochimiques.**

- Il existe sur le marché divers types de "bio-assays" pour l'analyse de 2,3,7,8-PCDD/Fs. Nous avons particulièrement étudié le kit d'immuno-assay "EIA" (competitive inhibition enzyme immuno-assay), basé sur un anticorps polyclonal spécifique à la 2,3,7,8-TCDD et aux congénères apparentés, développé par Cape technologies, USA. La réponse de ce test est proportionnelle aux TEF des différents congénères recherchés. Sa sensibilité annoncée est de l'ordre du picogramme.

Ce test biochimique permet d'obtenir une valeur de TEQ totale dans un échantillon donné. La mesure est donc intéressante dans une optique de screening "positif / négatif".

- Un second test biochimique est à l'étude à l'université de Liège (Prof. J. Martial). Le principe de ce test est identique à celui du « Calux » commercial, testé à l'Insitut de la Santé Publique (Dr. Goyens). Les premiers résultats obtenus sont encourageants.

Une étude comparative entre immuno-assay, MS-MS et HRMS a été réalisée par notre laboratoire et récemment publiée (annexe 4). Celle-ci montre que

- Pour les matrices à forte contamination et relativement "propres" (cendres d'incinérateurs), la MS-MS donne un résultat équivalent à la HRMS.
- Le test EIA donne une valeur de TEQ pour les PCDD/Fs surestimée par rapport à l'analyse par spectrométrie de masse. Par conséquent, le test donne un résultat fiable en ce qui concerne les échantillons négatifs ; les échantillons déclarés "positifs" seraient à ré-analyser par HRMS.
- Pour des échantillons faiblement contaminés, la sensibilité du test reste insuffisante.

### **Conclusion de ces travaux :**

En conclusion, les analyses de type "biochimique" pourraient s'avérer utiles pour l'analyse d'échantillons de denrées alimentaires d'origine marine, dans le cadre des normes encore à fixer en la matière, en vue d'une réponse de type "positif / négatif".

La spectrométrie de masse à basse résolution en tandem (MS-MS) doit encore faire l'objet d'une évaluation en ce qui concerne les échantillons biologiques. Il est probable que les niveaux retrouvés dans certains organismes marins permettent d'envisager cette technique, ce qui réduira considérablement le coût de l'analyse. La MS-MS pourrait être intéressante si ses limites de quantification sont de l'ordre de grandeur des normes à venir dans ces matrices.

Cependant, une étude détaillée des patterns de contamination, qui nécessite une sensibilité optimale pour tous les congénères, devrait, selon nos observations, être réalisée en HRMS.

## 9 Conclusions générales.

Le projet mené par notre laboratoire dans le cadre du programme de « Gestion durable de la Mer du Nord » a conduit à diverses réalisations concrètes :

1. Une méthode d'analyse rapide des PCDD/Fs et cPCBS dans les matrices biologiques a été développée, optimisée et validée. En ce qui concerne la pré-purification des échantillons pour lesquels une grande quantité de graisse doit être analysée, l'intégration de la colonne « HCDS » a accru le niveau d'automatisation et la rapidité de l'analyse. Néanmoins, la colonne de GPC reste d'application pour certains échantillons qui pourraient poser problème avec cette colonne HCDS. La durée de l'analyse est réduite à quelques jours pour plusieurs échantillons traités en parallèle.
2. La méthode de détermination des lipides totaux selon Smedes, n'utilisant pas de solvants organiques chlorés, a été implémentée au laboratoire avec succès.
3. Une méthode d'analyse rapide des PCDD/Fs et cPCBS dans les sédiments a été développée au laboratoire. La méthode de préparation d'échantillon répond aux exigences analytiques, mais des imprécisions ont été observées, qui seront corrigées dans le courant de l'année 2001.
4. Les analyses réalisées dans les échantillons de cachalots issus des échouages de l'hiver 1994-1995 révèlent des niveaux particulièrement élevés en PCDD/Fs et composés apparentés, à l'inverse des jeunes marsouins résidents de Mer du Nord étudiés. Ces analyses montrent l'importance d'intégrer une mesure des composés « dioxin-like » dans l'étude des causes d'échouage.
5. Des analyses ont été réalisées dans divers organismes vivants marins et permettent d'obtenir quelques résultats préliminaires en vue de futurs programmes de monitoring de ces polluants.
6. Les méthodes alternatives d'analyse rapide (Immuno-assay, MS-MS) ont été abordées et pourraient se révéler intéressantes pour l'analyse de denrées alimentaires d'origine marine, pour une réponse de type « positif / négatif ». Des recherches doivent encore être menées afin de confirmer ces premières observations. Une étude détaillée des patterns de contamination nécessite la spectrométrie de masse à haute résolution.

Notre laboratoire est donc à même mener à bien les analyses développées pour certains types d'échantillons, en particulier les tissus animaux pour lesquels nous avons été accrédités par Beltest.

Des contacts ont d'ores et déjà été établis avec deux réseaux de recherche en vue de collaborations futures dans le cadre de la gestion durable de la Mer du Nord.

## **Bibliographie.**

- Berggren P., Ishaq R., Zebuhr I., Naf C., Bangh C. et Broman D. (1999) : "Patterns and levels of organochlorines (DDTs, PCBs, non-ortho PCBs and PCDD/Fs) in male harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Baltic Sea, the Kattegat-Skagerrak seas and the west coast of Norway." Mar. Poll. Bull., 38, 12, 1070-1084.
- Bligh E.G. et Dyer W.J. (1959) : "A rapid method of total lipid extraction and purification". Can. Journ. Biochem. Physiol., 37, 8, 911-917.
- Boon J.P., Lewis W.E. et Goksoyr A. (2000) : "In vitro biotransformation of organohalogenes by sperm whale microsomes in relation to the CYP-isozymes present." Mar. Envir. Res., 50, 61 (abstracts)
- Bruhn R., Kannan N., Petrick G., Schulz-bull D.E. et Duinker J.C. (1999) : "Persistent chlorinated organic contaminants in harbour porpoises from the North Sea, the Baltic sea and arctic waters." Sci. Total Env., 237/238, 351-361.
- Henkelmann B., Wottgen T., Chen G., Schramm K.-W. et Kettrup A. (1999) : "Accelerated Solvent extraction (ASE) of different matrices in the analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans : method development and comparison to Soxhlet extraction." Organohal. Compounds, 40, 133-136.
- Holsbeek L., Joiris C.R., Debacker V., Ali I.B., Roose P., Nellissen J.-P., Gobert S., Bouquegneau J.-M. et Bossicart M. (1999) : "Heavy metals, organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in sperm whales stranded in the southern north sea during the 1994/1995 winter." Mar. Pol. Bull., 38,4, 304-313
- Jarman W.M., Norstrom R.J., Muir D.C.G., Rosenberg B., Simon M. et Baird R.W. (1996) : "Levels of organochlorine compounds, including PCDDs and PCDFs, in the blubber of Cetaceans from the west coast of North America." Mar. Pol. Bull., 32,5, 426-436.
- Lundstedt S., van Bavel B., Haglund P., Tysklind M. et Öberg L. (2000) : "Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils." Jour. Chrom. A, 883, 151-162.
- Oehme M., Klungsoyr J., Biseth A. et Schlabach M. (1993) : "Quantitative determination of ppq-ppt levels of PCDD/Fs in sediments from the arctic (Barents sea) and the North sea." Anal. Meth. Instr., 1,3, 153-163.
- Ross P.S., Ellis G.M., Ikonomou M.G., Barrett-Lennards L.G. et Addison R.F. (2000) : "High PCB concentrations in free-ranging Pacific killer whales, *Orcinus orca* : effect of age, sex and dietary preference." Mar. Pol. Bull., 40,6, 504-515.
- Smedes F. (1999) : "Determination of lipids using non-chlorinated solvents." The Analyst, 124, 1711-1718.
- Van Loveren H., Ross P.S., Osterhaus A.D.M.E. et Vos J.G. (2000) : "Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals." Tox. Letters, 112/113, 319-324.

# **ANNEXE I**

**Rapport de l'exercice Quasimeme "BT3", Round 20 (2000-2001)**

## QUASIMEME LABORATORY PERFORMANCE STUDY

### BT-3 CHLOROBIPHENYLS, PCDDs and PCDFs IN BIOTA, ROUND 20 - EXERCISE 417

The BT-3 Chlorobiphenyls, PCDDs and PCDFs in biota, Exercise 417 was carried out by 6 of the 10 laboratories who agreed to participate in this exercise.

The samples for analysis of non-ortho chlorobiphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in biological tissues were supplied by the Netherlands Institute for Fisheries Research (RIVO), Ijmuiden, The Netherlands. Sample QPL005BT was a mussel (*Mytilus edulis*) homogenate prepared from mussels collected from the Dutch Wadden Sea. The mussels were stored frozen (-25°C) until preparation. The bulk sample was divided into smaller batches and cooked for 2 - 3 minutes after which the mussel flesh was collected and the bulk sample homogenized. 0.02% BHT was added as an antioxidant. Representative sub samples were dispensed into protectively coated tins and sterilised by autoclaving. Sample QPL006BT was a mackerel (*Scomber scombrus*) muscle homogenate sampled from waters near the Shetland Islands, United Kingdom. The fish were stored frozen (-25°C) until filleting and preparation. The fillets were mechanically ground and homogenised and 0.02 % BHT was added as an antioxidant. Representative sub samples were dispensed into tins and sterilised by autoclaving.

Each batch of material was prepared in bulk. The level of within and between sample homogeneity for the biota was determined by measuring either sodium, potassium and total lipid or by measuring selected PCBs. All materials have been shown to be homogeneous at or below the intake mass used by the participants, and stable for the purposes of the test.

The assigned values were obtained from the robust means of the trimmed data. Indicative values are given for all PCDDs except 2378-TCDD and for 4 PCDFs in sample QPL005BT, and for all PCDDs except 234678-HPCDD and OCDD, and all PCDFs except 2378-TCDF in sample QPL006BT. The assigned values, total errors allowable and interlaboratory information for the determinands are shown in Table 1. Table 2 outlines the percentage of satisfactory data and the limit of determination values submitted for each determinand. The final table shows the ranking of the laboratories which took part in this exercise (Table 3). The performance of the laboratories in this exercise is graphically illustrated in the histograms in Figure 1.

Further information about the errors (proportional and constant) and the data analysis can be obtained from the QUASIMEME Project Office on request.

If there are any comments on this exercise or requests, please contact:

QUASIMEME Project Office,  
FRS Marine Laboratory  
PO Box 101, Victoria Road,  
Aberdeen, AB11 9DB  
Tel.: +44 1224 295352,  
Fax: +44 1224 295511  
Email: QUASIMEME@marlab.ac.uk  
Http://www.quasimeme.marlab.ac.uk

**Table 1 Summary Statistics for all QUASIMEME Participants**

Exercise Number 417 Round 20  
 Group BT3 Year 1999/2000  
 Total Number of Laboratories 6

Matrix / Determinand	Assigned Value	Units	Total Error %	Total NObs Received	Median Value	Robust Mean	Between Lab. sd	Between Lab. CV%
<b>QPL005BT</b>								
CB77	76.90	ng/kg	12.57	6	75.58	76.90	14.42	19
CB126	11.48	ng/kg	12.94	6	11.55	11.48	2.31	20
CB169	1.44	ng/kg	15.97	6	1.64	1.59	0.56	35
2378-TCDD	0.43	ng/kg	24.08	4	0.42	0.43	0.10	22
<i>12378-PeCDD</i>	<i>0.17</i>	<i>ng/kg</i>	<i>41.32</i>	<i>2</i>	<i>0.17</i>	<i>0.17</i>	<i>0.04</i>	<i>22</i>
<i>123478-HxCDD</i>	<i>0.12</i>	<i>ng/kg</i>	<i>54.52</i>	<i>2</i>	<i>0.12</i>	<i>0.12</i>	<i>0.03</i>	<i>28</i>
<i>123678-HxCDD</i>	<i>0.33</i>	<i>ng/kg</i>	<i>27.66</i>	<i>4</i>	<i>0.32</i>	<i>0.33</i>	<i>0.11</i>	<i>35</i>
<i>123789-HxCDD</i>	<i>0.22</i>	<i>ng/kg</i>	<i>35.19</i>	<i>3</i>	<i>0.19</i>	<i>0.22</i>	<i>0.08</i>	<i>38</i>
234678-HpCDD	2.07	ng/kg	14.92	4	2.14	2.07	0.62	30
OCDD	10.49	ng/kg	12.98	4	9.04	10.49	5.56	53
2378-TCDF	2.55	ng/kg	14.46	4	2.30	2.55	1.00	39
12378-PeCDF	0.40	ng/kg	24.92	4	0.41	0.40	0.03	6
23478-PeCDF	1.26	ng/kg	16.48	4	1.10	1.26	0.62	49
123478-HxCDF	0.47	ng/kg	23.14	4	0.47	0.47	0.06	12
<i>123678-HxCDF</i>	<i>0.29</i>	<i>ng/kg</i>	<i>29.59</i>	<i>4</i>	<i>0.27</i>	<i>0.29</i>	<i>0.11</i>	<i>38</i>
234678-HxCDF	0.33	ng/kg	27.56	4	0.33	0.33	0.10	29
<i>123789-HxCDF</i>		<i>ng/kg</i>						
1234678-HpCDF	1.64	ng/kg	15.55	4	1.66	1.64	0.28	17
OCDF	3.22	ng/kg	14.05	4	3.10	3.22	0.48	15
Lipid-Smedes	2.09	%	14.89	4	2.15	2.09	0.37	18
Lipid-Total	2.26	%	14.71	4	2.38	2.26	0.44	20

Entries in italics are given as indicative values only  
 NObs= Total number of observations ie No. of labs \* No of replicates

Matrix / Determinand	Assigned Value	Units	Total Error %	Total NObs Received	Median Value	Robust Mean	Between Lab. sd	Between Lab. CV%
<b>QPL006BT</b>								
CB77	52.3	ng/kg	12.60	6	49.1	52.3	13.1	25
CB126	11.5	ng/kg	12.94	6	10.7	11.5	4.52	39
CB169	0.75	ng/kg	19.19	5	0.69	0.75	0.24	32
<i>2378-TCDD</i>		<i>ng/kg</i>		<i>1</i>	<i>0.07</i>			
<i>12378-PeCDD</i>	<i>0.19</i>	<i>ng/kg</i>	<i>38.54</i>	<i>3</i>	<i>0.21</i>	<i>0.19</i>	<i>0.06</i>	<i>33</i>
<i>123478-HxCDD</i>	<i>0.37</i>	<i>ng/kg</i>	<i>25.94</i>	<i>4</i>	<i>0.21</i>	<i>0.37</i>	<i>0.39</i>	<i>106</i>
<i>123678-HxCDD</i>	<i>2.05</i>	<i>ng/kg</i>	<i>14.94</i>	<i>4</i>	<i>2.10</i>	<i>2.05</i>	<i>0.77</i>	<i>38</i>
<i>123789-HxCDD</i>	<i>1.19</i>	<i>ng/kg</i>	<i>16.71</i>	<i>4</i>	<i>1.14</i>	<i>1.19</i>	<i>0.45</i>	<i>38</i>
234678-HpCDD	6.44	ng/kg	13.28	4	6.16	6.44	1.87	29
OCDD	5.35	ng/kg	13.44	4	5.54	5.35	1.52	28
2378-TCDF	1.67	ng/kg	15.50	4	1.54	1.67	0.35	21
<i>12378-PeCDF</i>		<i>ng/kg</i>		<i>1</i>	<i>0.04</i>			
23478-PeCDF	0.30	ng/kg	29.19	3	0.27	0.30	0.11	36
<i>123478-HxCDF</i>		<i>ng/kg</i>		<i>1</i>	<i>0.02</i>			
<i>123678-HxCDF</i>		<i>ng/kg</i>		<i>1</i>	<i>0.02</i>			
<i>234678-HxCDF</i>		<i>ng/kg</i>		<i>1</i>	<i>0.04</i>			
<i>123789-HxCDF</i>		<i>ng/kg</i>						
1234678-HpCDF	0.38	ng/kg	25.74	3	0.35	0.38	0.22	60
OCDF	0.25	ng/kg	32.72	3	0.20	0.25	0.13	53
Lipid-Smedes	29.3	%	12.67	5	29.2	29.3	1.26	4
Lipid-Total	30.3	%	12.66	4	30.6	30.3	1.16	4

Entries in italics are given as indicative values only  
NObs= Total number of observations ie No. of labs \* No of replicates

Table 2 Summary of Z Scores and "Less Than" Values

Exercise Number 417  
 Group BT3  
 Total Number of Laboratories 6

Round 20  
 Year 1999/2000

Matrix/ Determinand	% of the data received	% Zscores  Z <2 Satisfactory	% Zscores 3> Z >2 Questionable	% Zscores 6> Z >3 Unsatisfactory	% Zscores  Z >6 Extreme	NObs Less than	Median Less than	Minimum Less than	Maximum Less than
<b>QPL005BT</b>									
CB77	100	83	17	0	0				
CB126	100	100	0	0	0				
CB169	100	50	33	0	17				
2378-TCDD	67	100	0	0	0				
12378-PeCDD	33					2.00	0.16	0.16	0
123478-HxCDD	33					1.00		0.21	0
123678-HxCDD	67								
123789-HxCDD	50					1.00		0.58	1
234678-HpCDD	67	75	25	0	0				
OCDD	67								
2378-TCDF	67								
12378-PeCDF	67	100	0	0	0				
23478-PeCDF	67								
123478-HxCDF	67	100	0	0	0				
123678-HxCDF	67								
234678-HxCDF	67	100	0	0	0				
123789-HxCDF	0					1.00		0.12	0
1234678-HpCDF	67	100	0	0	0				
OCDF	67	100	0	0	0				
Lipid-Smedes	67	100	0	0	0				
Lipid-Total	67	100	0	0	0				

Matrix/ Determinand	% of the data received	% Zscores  Z <2 Satisfactory	% Zscores 3> Z >2 Questionable	% Zscores 6> Z >3 Unsatisfactory	% Zscores  Z >6 Extreme	NObs Less than	Median Less than	Minimum Less than	Maximum Less than
<b>QPL006BT</b>									
CB77	100	83	0	0	17				
CB126	100	67	0	17	17				
CB169	83	80	0	0	20	1.00		8.00	8
2378-TCDD	17					1.00		0.19	0
12378-PeCDD	50					1.00		0.28	0
123478-HxCDD	67								
123678-HxCDD	67								
123789-HxCDD	67								
234678-HpCDD	67	75	25	0	0				
OCDD	67	75	25	0	0				
2378-TCDF	67	100	0	0	0				
12378-PeCDF	17					1.00		0.11	0
23478-PeCDF	50								
123478-HxCDF	17					1.00		0.11	0
123678-HxCDF	17					1.00		0.11	0
234678-HxCDF	17					2.00	0.14	0.14	0
123789-HxCDF	0					1.00		0.10	0
1234678-HpCDF	50					1.00		0.21	0
OCDF	50								
Lipid-Smedes	83	100	0	0	0				
Lipid-Total	67	100	0	0	0				

Units of measurement for less than values are given in Table 1

**Table 3 Ranked Z-scores for all Determinands with Assigned Values**

Exercise No. 417                      Round 20  
Group BT3                              Year 1999/2000

Total NObs with assigned values 20

Labcode	NObs  Z <2	% Z <2 Possible	Labcode	NObs Total	% Z <2 Actual
Q311A	19	95	Q311A	20	95
Q251A	18	90	Q309A	18	94
Q309A	17	85	Q251A	20	90
Q412A	16	80	Q127A	8	88
Q127A	7	35	Q412A	20	80
Q242A	4	20	Q242A	6	67

NObs |Z| < 2                      No. of observations by each lab. which were satisfactory  
%|Z|<2 Possible                      No of satisfactory data as % of the total no. of determinands  
with assigned values  
NObs TOTAL                      No. of observations (means) submitted by each lab for which  
assigned values were set  
%|Z|<2 Actual                      % of observations submitted which were satisfactory

Fig. 1. Round 20 BT3. Z-Scores for CBs, PCDDs and PCDFs in Blota. Page 1.

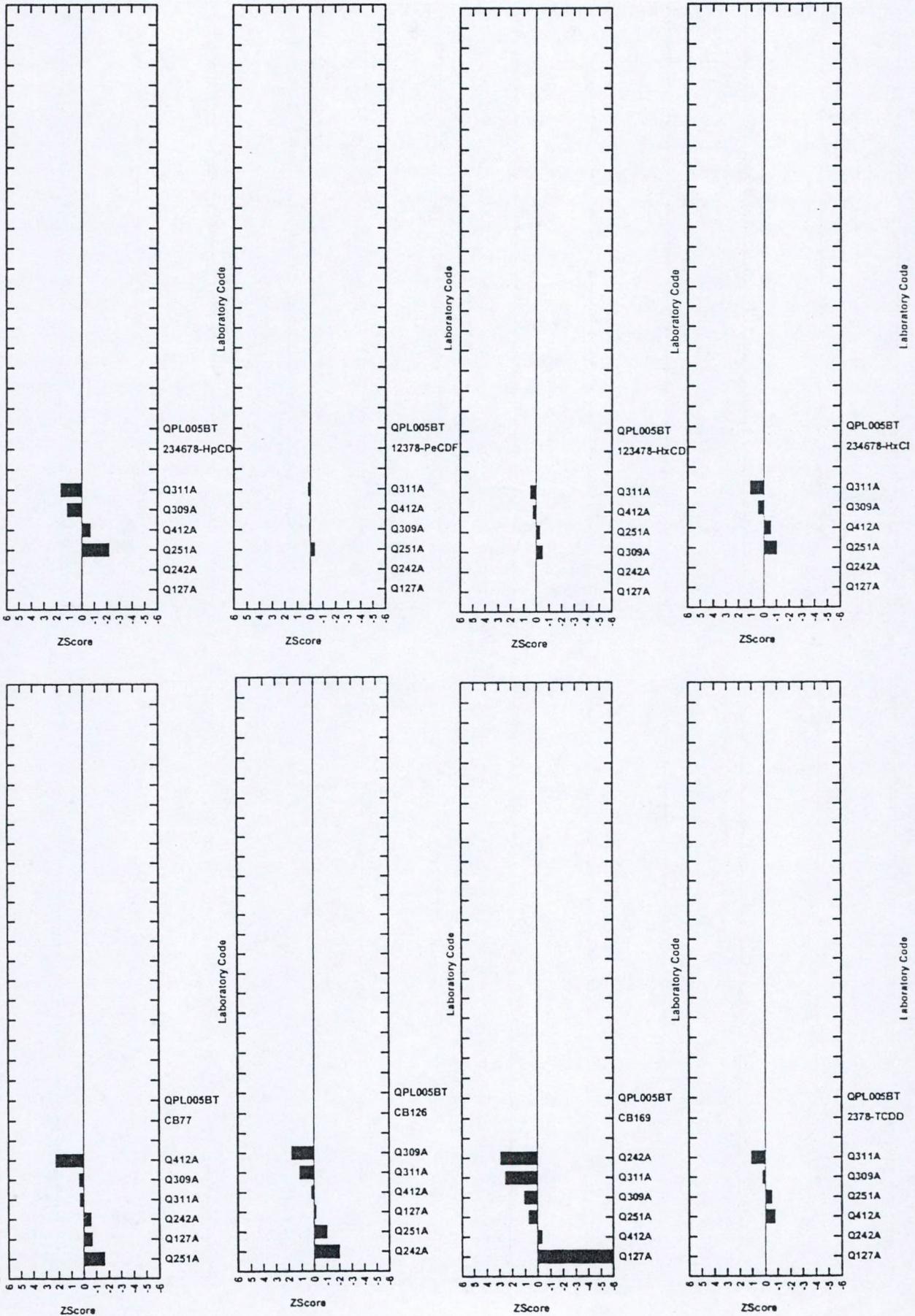


Fig. 1. Round 20 BT3. Z-Scores for CBs, PCDDs and PCDFs in Blota. Page 2.

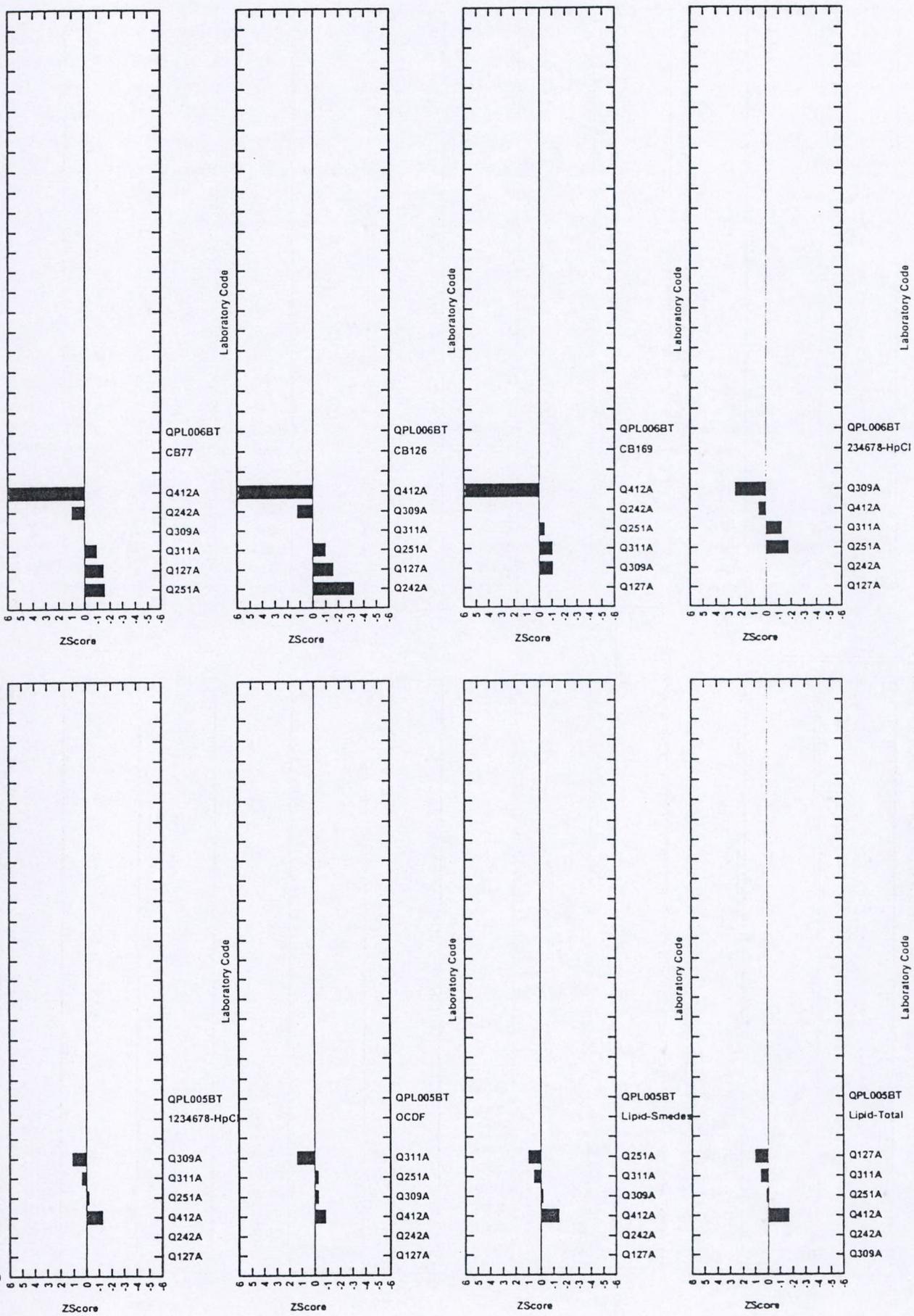
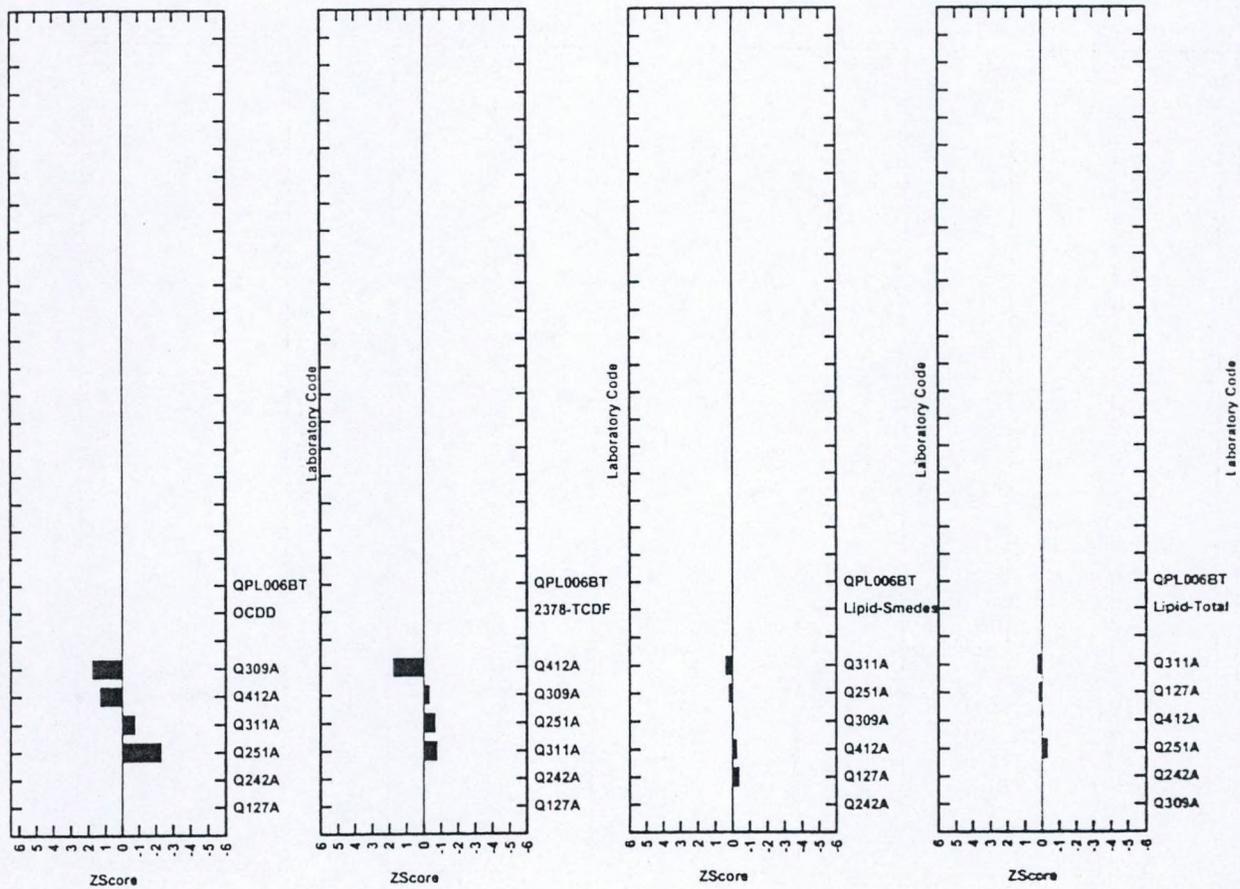


Fig. 1. Round 20 BT3. Z-Scores for CBs, PCDDs and PCDFs In Biota. Page 3.



## **ANNEXE II**

**Poster présenté au workshop Quasimeme, 5-7 / 04 / 2000, Oostende**

**"The Analysis of ChloroBiphenyls in Marine Matrices"**



## Fully Automated Clean-up Procedure for PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs Analysis in Marine High Fat Biological Matrices.

J.-S. Houziaux, J.-F. Focant and E. De Pauw

Mass Spectrometry Laboratory, University of Liege, B6c Sart-Tilman, B-4000 Liege, Belgium  
e-mail : Jshouziaux@ulg.ac.be, JF.Focant@ulg.ac.be

### Introduction

Dioxin and coplanar PCB analysis requires tedious clean-up operations before HRMS quantification. The Gel Permeation Chromatography is a good automated step for lipid removal.

For further clean-up, FMS Inc. (USA) has developed the "Power-prep". This system manages three disposable columns (multilayer silica ; basic alumina ; carbon) and five different solvents. We have successfully combined the GPC and the Power-prep for routine food analysis in our laboratory.

A further step to full automation is proposed by FMS : the replacement of the off-line GPC step by a "High Capacity Disposable Silica" (HCDS) column connected to the Power-prep basic scheme, for up to 5 g fat purification.

Our aim is to compare the GPC and the HCDS columns efficiencies.

### Material and methods

Samples of Mackerel muscle and Sperm whale blubber were analysed in triplicate for both methods. The extraction was performed by ASE with hexane (125°C, 100 bars).

#### 1. GPC purification.

4 g of fat were used for GPC purification. This pre-purified extract was loaded on the Power-prep for further automated purification. Total time : 5h

#### 2. "HCDS" purification.

5 g of fat were loaded on the HCDS column (28 g acidic, 16g basic, 6g neutral), connected to the first column of the Power-prep. Total time : 2h.

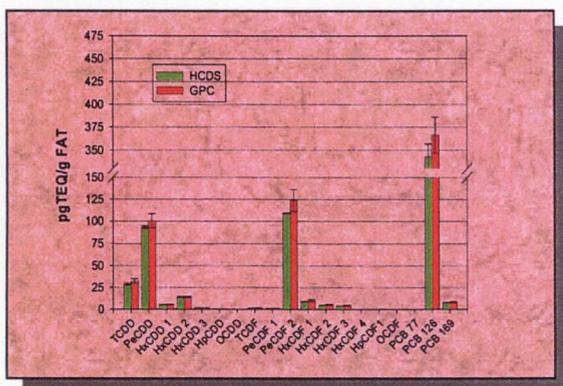
#### Quantification.

Isotopic Dilution method has been used for GC-HRMS analysis (Finnigan MAT 95) of 19 congeners.

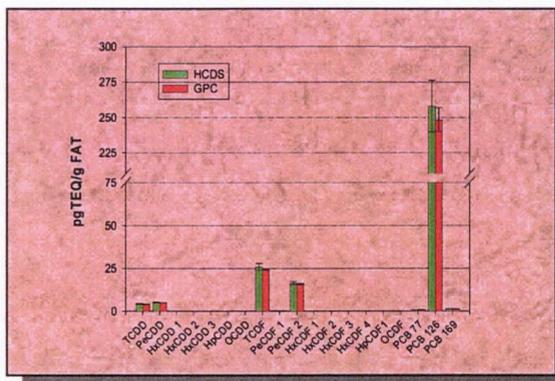
#### Quality assurance.

Procedural blanks and QC samples (8 pg TEQ/g ; fortified beef fat) were compared to our routine food analysis values (performed with the first method).

### Results

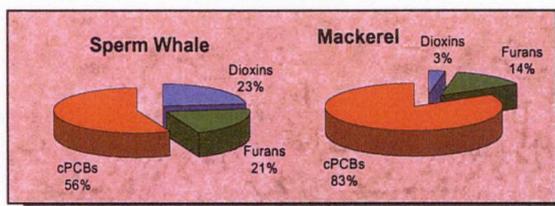


Comparison of HCDS and GPC methods results (triplicate) for the congeners pattern in the Sperm whale (*Physeter macrocephalus*) blubber sample.



Comparison of HCDS and GPC methods results (triplicate) for the congeners pattern in the Mackerel (*Scomber scombrus*) muscle sample.

In addition to time saving (3h), the HCDS allows to reduce manual operations, solvents consumption and cost. Larger fat sample can be purified and return on Power-prep investment is increased. It also overcomes the need for an automated GPC system. When used with an automated extraction system, 5 samples can be processed within 3 days. The system could easily be implemented in the lab and is designed for multi-residue analysis : this can lower the price of environmental analyses.



HCDS and GPC methods give very close and reliable results for both samples. No improvement can be observed for the recovery of the standard (about 60-90 %). TCDD, PeCDD, TCDF, PeCDF2 and PCB 126 are the most important contributors to the TEQ (WHO). Mean TEQs for Sperm whale and Mackerel are respectively 648 and 306 pg-TEQ/g fat. The cPCBs (mainly PCB 126) contribute to a large fraction of the total TEQ.

### Conclusion

The HCDS column allows true fully automated clean-up and has proven to be very efficient.

This system should allow further research on these contaminants in the environment if a multi-residue approach is developed. The system will be of prime interest for large samples (low levels).

## **ANNEXE III**

**Rapport d'analyses préliminaires "Astéries / Sédiments de la côte belge"**  
**(collaboration avec le réseau ICAS, Laboratoire de Biologie Marine**  
**Dr. P. Dubois.**

# Laboratoire de spectrométrie de masse, U. Lg.

## Rapport d'analyse : astéries et sédiments de Mer du Nord

10/08/2000

**Analyses préliminaires** : astéries + sédiments, stations « 230 », « SO1 » et « GC1 »

Laboratoire de Biologie marine, Dr P. Dubois, U.L.B.

### 1. Méthodes d'analyse.

#### 1.A. Sédiments

Les trois sédiments ont été séchés en étuve 24h à 50°C. Les pourcentages en eau déterminés sont : 230 : 17,5% ; SO1 : 17 % ; GC1 : 15 %.

5 g de sédiment sec ont été mélangé à 3g de Cuivre (lavé 48hr par Soxhlet au toluène) et insérés dans les cellules d'extraction.

L'extraction a été réalisée en ASE (Dionex ASE200) à l'hexane. En général, ce type d'échantillon est extrait au toluène. Nous avons voulu tester ce solvant, généralement utilisé pour l'extraction de lipides apolaires, en raison des facilités qu'il offre au niveau des étapes de purification. Conditions : 125 °C, 1500 PSI, 2 cycles statiques de 5'. Le standard de quantification (<sup>13</sup>C<sub>12</sub> PCDD/fs et <sup>13</sup>C<sub>12</sub> cPCBs) a été ajouté avant extraction (10 µL, EDF 4145).

Une pré-purification sur GPC (bio-beads SX-3, 70 g, colonne 39\*2.5 cm) a été réalisée. L'isolement des PCDD/Fs et cPCBs a été réalisé sur « Power-Prep »<sup>TM</sup> (Silice, alumine basique, charbon actif).

La séparation des isomères est assurée par colonne GC DB5 30m. L'analyse est effectuée sur un spectromètre de masse haute résolution (R = 10.000) Finnigan MAT95. La quantification de composés présents est réalisée par méthode de dilution isotopique.

Un échantillon blanc a été réalisé par extraction de 3g de Cuivre et purification identique.

Un échantillon « quality control » a été réalisé au moyen de l'échantillon « Sample8 » de l'exercice d'intercalibration « Ontario » auquel le laboratoire a récemment participé (résultats partiels transmis et corrects). Celui-ci a été extrait et analysé dans les mêmes conditions que les échantillons. Les conditions initialement utilisées pour cet échantillon étaient une extraction ASE au toluène à 185°C et une analyse sur colonne GC SP2331. Cette analyse complémentaire a été réalisée afin de déterminer si l'extraction à l'hexane, plus simple à mettre en œuvre, donne des rendements d'extraction similaires.

#### 1.B. Astéries

Les échantillons 230 et SO1 ont été découpés aux ciseaux et homogénéisés en totalité. L'échantillon GC1 a été partiellement homogénéisé.

Chaque échantillon a été broyé manuellement (pilon et mortier) et congelé dans l'azote liquide pour être lyophilisé. Après lyophilisation, un nouveau broyage est effectué.

Les quantités d'échantillons (PS) utilisées pour l'analyse diffèrent suivant les échantillons :

SO1 : 37.2 g PS (première analyse)

GC1 : 16 g PS

230 : 17.6 g PS

SO1 (seconde analyse complète) : 18 g PS

Extraction, purification et analyse sont réalisées dans les conditions décrites en 1.A.

Lors des analyses sur colonne DB5, il est apparu des problèmes chromatographiques apparemment liés à la présence d'isomères autres que les 2.3.7.8 PCDD/Fs. En effet, cette colonne ne les sépare pas bien, raison pour laquelle on l'utilise plus généralement pour les échantillons biologiques dans lesquels on retrouve essentiellement les isomères 2.3.7.8, peu éliminés. Cette colonne de 30 m permet en effet une analyse plus rapide. Afin de déterminer l'importance des risques de co-élution, l'échantillon 230 a fait l'objet d'une analyse complémentaire sur colonne SP 23312 plus adaptée à ce type de pattern.

Un échantillon de blanc a été réalisé par extraction de 10 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et conditions identiques de purification et d'analyse. Les valeurs de blanc ont été déduites des concentrations obtenues.

## 2. Résultats.

### 2.A. Sédiments

#### 2.A.1. Résultats des trois sédiments analysés.

L'analyse (tableau 1) révèle des concentrations minimales. Les valeurs en cPCBs sont de l'ordre de la LOQ (limite de quantification) du laboratoire. A ces niveaux, il est impossible de déterminer des différences de contaminations éventuelles entre les trois stations.

Cette absence de contaminants peut être due à diverses raisons : absence de contamination ; mauvais rendement d'extraction à l'hexane ; absence virtuelle de matière organique dans les échantillons (extraits propres) ; quantité d'échantillon insuffisante.

g PS	5.07	5.37	5.08
	Sed SO1	Sed GC1	Sed 230
2,3,7,8 TCDD	ND	ND	ND
1,2,3,7,8 PeCDD	ND	ND	ND
1,2,3,4,7,8 HxCDD	ND	ND	ND
1,2,3,6,7,8 HxCDD	ND	ND	ND
1,2,3,7,8,9 HxCDD	ND	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0.57	0.43	0.97
OCDD	1.34	0.77	1.54
<b>Total PCDDS</b>	<b>1.92</b>	<b>1.19</b>	<b>2.51</b>
2,3,7,8 TCDF	0.17	0.20	0.33
1,2,3,7,8 PeCDF	0.04	ND	ND
2,3,4,7,8 PeCDF	0.07	0.09	ND
1,2,3,4,7,8 HxCDF	ND	0.09	ND
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0.07	ND	ND
2,3,4,6,7,8 HxCDF	ND	ND	ND
1,2,3,7,8,9 HxCDF	ND	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	0.64	0.60	1.11
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	ND	0.04	ND
OCDF	0.66	0.62	1.41
<b>Total PCDFs</b>	<b>1.66</b>	<b>1.63</b>	<b>2.85</b>
PCB77	24.82	22.43	40.01
PCB81	2.62	2.73	4.68
PCB126	0.92	interference	1.46
PCB169	ND	0.07	0.09
<b>Total PCBs</b>	<b>28.36</b>	<b>25.23</b>	<b>46.25</b>

Tableau 1. Concentrations des différents composés recherchés dans les sédiments.  
« Interférence » : Rapports isotopiques non respectés ; « ND » : Non Détecté.

## 2.A.2. Extraction de l'échantillon « sample 8 » à l'hexane et au toluène.

ONTARIO / Sample 8 / 3g	Toluene SP2331-60m	Hexane DB5-30m
(pg / g PS)	Intercal 02-2000	06-2000
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	1,03	0,63
1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin (PeCDD)	5,62	6,41
1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD)	16,43	10,36
1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD)	32,13	24,94
1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD)	32,95	18,91
1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin (HpCDD)	777,7	538,75
1,2,3,4,5,6,7,8-Octachlorodibenzo-p-dioxin (OCDD)	10740,91	8612,06
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran (TCDF)	68,22	45,42
1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran (PeCDF)	122,67	69,24
2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (PeCDF)	22,16	31,08
1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran (HxCDF)	132,78	82,45
1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran (HxCDF)	44,2	26,47
1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran (HxCDF)	-	5,37
2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran (HxCDF)	13,07	23,00
1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran (HpCDF)	140,94	111,34
1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran (HpCDF)	1,09	0,18
1,2,3,4,5,6,7,8-Octachlorodibenzofuran (OCDF)	-	813,95
PCB 77	1565,94	678,03
PCB 126	29,16	29,19
PCB 169	3,44	3,55

Tableau 2 : comparaison des rendements d'extraction à l'hexane et au toluène pour l'échantillon "sample8".

D'une manière générale, l'extraction à l'hexane mène à une sous estimation des concentrations de la plupart des congénères. Le PCB 77 montre une très importante sous-évaluation. D'autre part, la 2,3,4,7,8 PeCDF, sujette à co-élutions sur la DB5, est légèrement surévaluée : d'autres isomères sont peut-être présents dans ce pic. Par contre les PCBs 126 et 169 sont en concentrations similaires.

Bien que commode au point de vue de la rapidité de purification, la technique alternative envisagée ne permet pas une quantification précise des congénères détectés. L'ordre de grandeur est cependant respecté, ce qui nous incite à penser que les trois sédiments analysés sont effectivement très peu contaminés.

Les prochaines analyses de sédiments seront donc impérativement réalisées sur colonne SP2331 avec extraction au toluène.

## 2. B. Résultats des analyses d'astéries.

Les résultats d'analyse sont exprimés en concentrations (tableau 3) et en TEQ (modèle OMS) (tableau 4). L'échantillon GC1 a été perdu en cours de purification et doit être recommencé à partir des tissus frais congelés restants.

Au niveau analytique, on remarquera :

1. La différence de résultat pour la 2.3.4.7.8 PeCDF entre SO1 et SO1-2 (tableaux 3 et 4), due à l'existence de co-élution(s) au début du pic sur la colonne DB5. L'analyse de l'échantillon 230 sur colonnes DB5 (même pattern chromatographique que SO1) et SP2331 (fig 1 et 2, fenêtre PeCDF) montre que les valeurs obtenues sont similaires entre les deux colonnes pour cet isomère. On peut donc conclure que les isomères co-éluant sur la DB5 se retrouvent dans le premier pic, lequel mène à une

erreur importante dans l'aire prise en compte pour la détermination de la concentration. Cette erreur pose problème dans la mesure ou ce congénère présente un TEF élevé (0.5) et est bien représenté.

2. D'autres différences relativement importantes apparaissent, qui peuvent être dues, outre l'erreur analytique, soit à une contamination, soit à une mauvaise homogénéité de l'échantillon. C'est particulièrement le cas pour les PCBs. L'hypothèse de la contamination ponctuelle n'est pas à rejeter ; néanmoins, en dépit des hauts niveaux que présentent certains échantillons marins (poissons, mammifères), aucune contamination des échantillons alimentaires n'a encore été observée au laboratoire.

A l'exception du PCB 126, les TEF sont cependant très faibles et interviennent de ce fait peu dans le calcul de la charge « dioxin-like » totale de ces astéries. Il faut également garder en mémoire que des erreurs de 20-30 % ne sont pas rares dans les analyses en ultra-traces (ppt-ppq). La quantité d'échantillon analysée est peut-être une autre raison à ces différences (SO1-2 analysé sur deux fois moins d'échantillon que SO1).

3 Les différences dans les quantités d'échantillon extraites sont probablement la cause de la non détection de certains congénères faiblement représentés. Le problème est accentué pour l'analyse sur SP2331 dans la mesure ou cet échantillon avait préalablement été analysé sur DB5 et a nécessité une dilution afin d'être injectable sur SP2331.

g Fat	1.0	0.4	0.4	0.4
	Ast-SO1DB5	AstSO1-2DB5	Ast230DB5	Ast-230-SP2331
2,3,7,8 TCDD	10.46	12.36	6.79	ND
1,2,3,7,8 PeCDD	15.41	15.92	14.00	ND
1,2,3,4,7,8 HxCDD	3.10	4.92	4.25	ND
1,2,3,6,7,8 HxCDD	30.13	37.79	27.61	26.14
1,2,3,7,8,9 HxCDD	12.38	15.54	interference	ND
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	47.00	39.54	28.43	23.55
OCDD	182.13	156.98	216.24	209.72
<b>Total PCDDs</b>	<b>300.61</b>	<b>283.06</b>	<b>297.32</b>	<b>259.40</b>
2,3,7,8 TCDF	76.79	94.59	94.40	96.46
1,2,3,7,8 PeCDF	0.90	ND	ND	ND
2,3,4,7,8 PeCDF	49.96	20.07	27.45	22.74
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0.23	ND	ND	ND
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0.29	ND	ND	ND
2,3,4,6,7,8 HxCDF	6.06	4.95	interference	ND
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0.70	ND	ND	ND
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	2.05	4.65	5.32	ND
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	ND	ND	ND	ND
OCDF	5.70	3.66	5.22	ND
<b>Total PCDFs</b>	<b>142.68</b>	<b>127.92</b>	<b>132.38</b>	<b>119.20</b>
PCB 77	2334.90	2316.01	2054.67	NA
PCB 81	67.16	120.93	79.13	NA
PCB 126	393.27	560.47	431.04	NA
PCB 169	63.66	78.73	64.45	NA
<b>Total cPCBs</b>	<b>2858.99</b>	<b>3076.15</b>	<b>2629.29</b>	<b>NA</b>

Tableau 3 : concentrations des différents composés recherchés dans les échantillons SO1, SO1-2 et 230 (pg / g lipides). « Interférence » : Rapports isotopiques non respectés ; « ND » : Non Détecté ; « NA » : non analysé. Ast-230-SP2331 analysé sur le même extrait concentré que Ast230DB5 (dilution du reste d'échantillon après injection sur DB5).

Dans l'ensemble, on obtient une bonne vision des répartitions de congénères dans les échantillons. L'analyse de SO1-2 montre que la quantité d'échantillon utilisée est insuffisante. 230 SP2331 montre un problème de dilution à l'injection en GC-HRMS. Les valeurs de référence à prendre en considération sont donc SO1 et 230 DB5, dans lesquels les isomères sont les mieux représentés. L'optimisation des conditions d'analyse en fonction des remarques faites ci-dessus permettra une analyse plus fine pour les prochaines séries d'échantillons : utilisation de 100g PF (environ 1g de graisse), analyse sur colonne SP 2331.

	Ast-SO1DB5	Ast-SO1-2 DB5	Ast-230-DB5	Ast-230-Sp2331
2,3,7,8 TCDD	10,46	12,36	6,79	0,00
1,2,3,7,8 PeCDD	15,41	15,92	14,00	0,00
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0,31	0,49	0,43	0,00
1,2,3,6,7,8 HxCDD	3,01	3,78	2,76	2,61
1,2,3,7,8,9 HxCDD	1,24	1,55	-	0,00
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0,47	0,40	0,28	0,24
OCDD	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>Total PCDDs</b>	<b>30,92</b>	<b>34,52</b>	<b>24,28</b>	<b>2,87</b>
2,3,7,8 TCDF	7,68	9,46	9,44	9,65
1,2,3,7,8 PeCDF	0,04	0,00	0,00	0,00
2,3,4,7,8 PeCDF	24,98	10,03	13,72	11,37
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0,02	0,00	0,00	0,00
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0,03	0,00	0,00	0,00
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0,61	0,50	-	0,00
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0,07	0,00	0,00	0,00
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,00
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	<LOQ	0,00	0,00	0,00
OCDF	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,00
<b>Total PCDFs</b>	<b>33,43</b>	<b>19,99</b>	<b>23,16</b>	<b>21,01</b>
PCB 77	0,23	0,23	0,21	NA
PCB 81	0,01	0,01	0,01	NA
PCB 126	39,33	56,05	43,10	NA
PCB 169	0,64	0,79	0,64	NA
<b>Total cPCBs</b>	<b>40,20</b>	<b>57,08</b>	<b>43,96</b>	<b>NA</b>

Tableau 4 : concentrations TEQ des différents composés recherchés dans les échantillons SO1, SO1-2 et 230 (pg TEQ / g lipides). « Interférence » : rapports isotopiques non respectés ; « ND » : non détecté ; « NA » : non analysé. « <LOQ » : détection mais valeur inférieure aux limites de quantification du laboratoire. Ast-230-SP2331 analysé sur le même extrait concentré que Ast230DB5 (dilution du reste d'échantillon après injection sur DB5).

*Au niveau de la distribution des congénères :*

230 et SO1 présentent des patterns et des niveaux de contamination similaires. En furannes, ce sont principalement les TCDF et PeCDF qui sont bien représentés, y compris dans les isomères non 2,3,7,8. Les PCDD sont mieux représentées. Le PCB 77 est présent en grandes quantités.

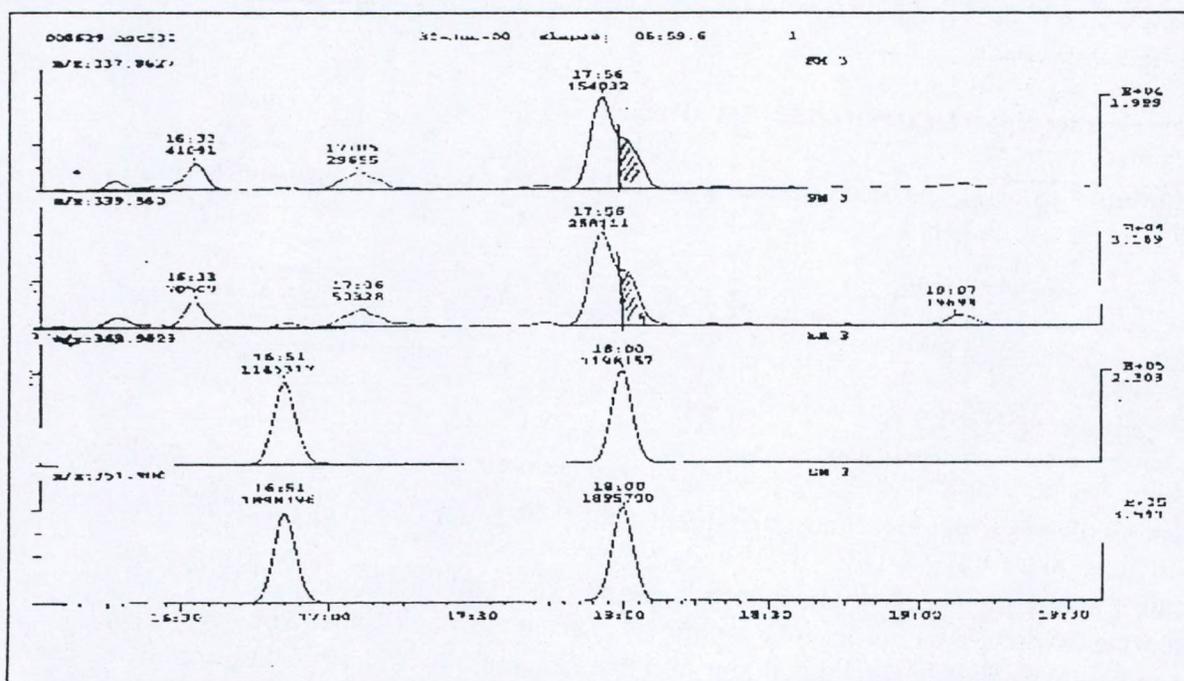


Figure 1 : Séparation chromatographique sur colonne DB5MS de 30 m des isomères de PeCDF de l'échantillon Ast-230. Les deux cadrans du bas reprennent les deux masses suivies pour le  $^{13}\text{C}$  1,2,3,7,8 PeCDF (16'51) et le  $^{13}\text{C}$  2,3,4,7,8 PeCDF (18'00) (standards). Les deux cadrans du haut reprennent les deux masses suivies en  $^{12}\text{C}$  PeCDFs (natifs). Hachuré : aire intégrée pour la 2,3,4,7,8-PeCDF

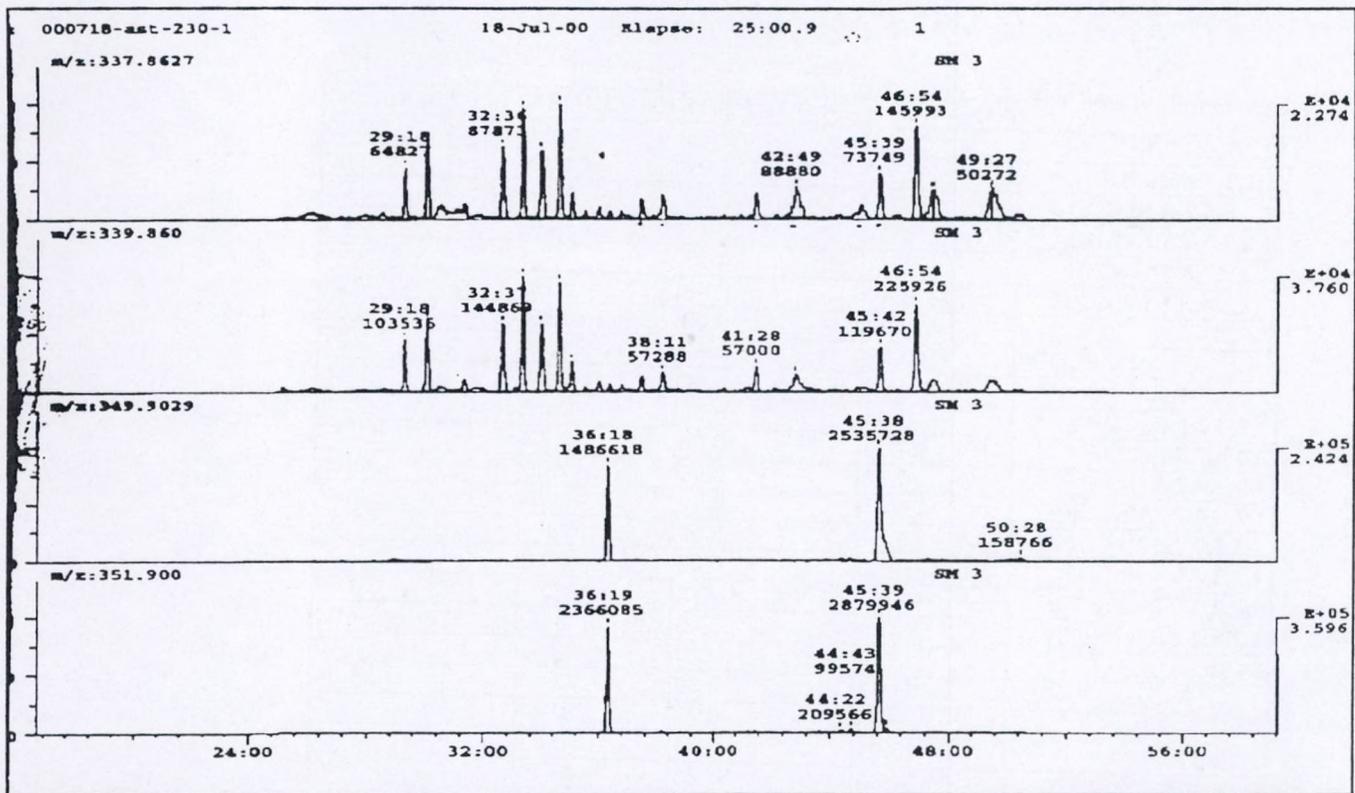


Fig. 2 : Séparation chromatographique sur colonne SP2331 de 60m des isomères de PeCDF présents dans l'échantillon 230 (analyse HRMS, R=10000). Les deux cadrans du bas représentent les standards  $^{13}\text{C}$  1,2,3,7,8-PeCDF (deux masses. 36'19) et 2,3,4,7,8-PeCDF (deux masses. 45'39). Les isomères natifs se retrouvent aux mêmes temps de rétention dans les deux cadrans du haut et sont bien isolés. Tous les autres pics représentent des isomères PeCDF chloro-substitués en des positions autres que 2,3,7 ou 8 (« non toxiques ») séparés par la colonne.

L'analyse de l'échantillon 230 sur la colonne SP2331 pour l'isolement d'isomères non-2,3,7,8 PCDD/Fs révèle au minimum 16 TCDF, 10 PeCDF, 5 HxCDF, 3 TCDD, 1 PeCDD, 3 HxCDD. Il est à regretter que la dilution de l'échantillon entraîne une grande imprécision et une baisse des niveaux de détection (TCDD et PeCDD non détectés, tableau 3 ; pic 2,3,4,7,8-PeCDF non symétrique, fig2). Au niveau des contributions à la charge « dioxin-like » (tableau 4) des composés recherchés, les PCBs coplanaires présentent la plus importante contribution suivis par les PCDD. On notera l'importante contribution des congénères PCDD/Fs les moins chlorés, en particulier TCDD, PeCDD et PeCDF2. Le PCBs 126 représente 98% du TEQ PCBs, ainsi qu'observé dans la grande majorité des échantillons biologiques de tous horizons.

## 2 C. Pourcentages de lipides extraits dans les astéries.

Pour les échantillons d'astéries, les poids frais et sec et poids de graisses extraites sont repris au tableau 4.

	Ast-SO1	Ast-SO1-2	Ast-GC1	Ast-230
Poids frais	190	190	102	106
Poids sec (lyoph.)	64,8	64,8	36,2	34,8
% lipides extraits (ASE)	0,9 %	0,8 %	1,1%	1,1%

Tableau 4 : rendements d'extraction lipidiques des astéries

Ces valeurs sont similaires à la valeur moyenne donnée par P. Wantier (environ 1% de lipides).

Cependant, nous n'avons aucune certitude quant à la nature exacte de l'extrait par ASE. Il conviendra donc de réaliser une extraction de lipides totaux pour les prochains échantillons. Nous avons appliqué avec succès la méthode de Smedes lors du dernier exercice Quasimeme BT3 (PCDD/Fs et cPCBs dans les biotes). A noter que dans ce cas également les extraits ASE correspondent aux valeurs déterminées par la méthode de Smedes pour les lipides totaux. Une analyse qualitative du contenu de ces extraits pourrait être intéressante en vue de l'abandon de déterminations lipidiques par les traditionnelles et fastidieuses méthodes manuelles.

## CONCLUSIONS DE L'ESSAI.

Les analyses réalisées sur ces échantillons de sédiments et d'astéries ont permis de mettre en évidence certains points importants pour la fiabilité des résultats ultérieurs :

Les tentatives d'allègement des manipulations ne sont pas concluantes. Les sédiments devront systématiquement être extraits au toluène. L'analyse des sédiments requiert une colonne de type SP2331.

Un minimum de 10 g de sédiment sec sera à utiliser, en particulier pour des échantillons de type sableux. Des sédiments à faible teneur en M.O. seront probablement faiblement contaminés. Il serait intéressant de connaître la teneur en matière organique des sédiments.

Bien que l'extraction à l'hexane nous donne certainement une sous-évaluation des résultats, l'analyse du sédiment Ontario « Sample 8 » montre que les ordres de grandeurs sont respectés (erreur maxi de 50%). Il conviendrait d'analyser des astéries vivant sur des sédiments plus fortement contaminés afin de déterminer si une corrélation existe. Les analyses réalisées ne permettent pas de le dire. Les trois sédiments seront prochainement ré-analysés dans les conditions optimales.

Les astéries nécessiteront une quantité de 100g PF afin de détecter les congénères faiblement représentés, ce qui entraînera une préparation d'échantillon fastidieuse. Ces échantillons présentent de nombreux congénères de PCDD/Fs non chloro-substitués aux positions 2,3,7,8, ce qui est une observation inattendue. Analytiquement, ceci nous conduit à l'utilisation d'une colonne SP2331 comme pour les échantillons inorganiques, en raison des imprécisions liées à l'utilisation d'une colonne DB5 30m pour ce type de pattern. Le laboratoire devra donc réaliser une optimisation de l'analyse sur la colonne SP2331 afin de suivre les 2,3,7,8 PCDD/F et cPCBs en un seul run de 60' (actuellement, les cPCBs ne sont pas suivis sur cette colonne ; dioxines et furannes font l'objet de runs séparés, car cette colonne est utilisée pour des analyses d'isomères non-2.3.7.8 dans les cendres). Cette constatation est applicable à d'autres types d'échantillons d'invertébrés pour lesquels un doute existe (ex : Crustacés).

Cependant, il convient de remarquer que les TCDF et PeCDF, qui comportent le maximum d'isomères non-2,3,7,8, présentent des concentrations similaires en DB5 et SP2331 ; les co-élutions possibles ne semblent pas, pour ces échantillons, mener à une surestimation du TEQ. Ceci s'explique sans doute par la présence des co-éluants dans la première moitié du pic bicéphale, tandis que la seconde moitié correspond bien à l'isomère 2,3,4,7,8 PeCDF seul. En PCDDs, on observe beaucoup moins d'isomères, mais ce fait est à relier à la trop forte dilution de l'échantillon.

Le PCB 77 est présent en très larges quantités (de l'ordre du ng/g fat), mais sa contribution au TEQ reste faible. La contribution des cPCBs au TEQ est de l'ordre de 40%. 98 % de cette contribution est due au seul PCB 126. Il serait intéressant de pouvoir doser les congénères PCBs mono-ortho substitués afin d'obtenir une image globale de la charge « dioxin-like » des astéries.

L'échantillon GC1 sera analysé prochainement afin de compléter la série. L'optimisation de la colonne SP2331 devrait être entreprise dans le courant du mois d'août. L'intégration des cPCBs est cependant déjà effective sur la colonne SP2331. Les techniques de préparation, extraction et purification donnent les résultats escomptés pour ces échantillons d'astéries.

Les échantillons sont donc analysables dès à présent moyennant ces adaptations.

## **ANNEXE IV**

**Publication du laboratoire sur les essais d'analyse par MS/MS et Bioassays  
(Chemosphere, sous presse)**



PERGAMON

Chemosphere 000 (2000) 000-000

CHEMOSPHERE

## Optimisation and use of tandem-in-time mass spectrometry in comparison with immunoassay and HRGC/HRMS for PCDD/F screening

J.-F. Focant\*, G. Eppe, E. De Pauw

Mass Spectrometry Laboratory, Chemistry Department, University of Liege, Alee de la Chimie, 17, B6c Sart-tilman, Liège B-4000, Belgium

### Abstract

Rapid screening of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans using quadrupole ion storage tandem-in-time mass spectrometry (QISTMS) conjointly with polyclonal antibody immunoassay has been considered. The optimisation of the fragmentation of the parent ion in the trap has been completed. The analysis of fly ashes from a municipal waste incinerator contaminated at different levels has then been realised. Results obtained using QISTMS, HRMS and immunoassay are compared. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Polychlorodibenzo-*p*-dioxins; Polychlorodibenzofurans; Tandem mass spectrometry; Immunoassay; Screening; Fly ash

### 1. Introduction

During their lifetime, humans are exposed to a wide range of organic toxins in different amounts. Among the polyhalogenated aromatic family, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) are a class of non-volatile environmental contaminants that are not primary industrial products (Safe, 1986). These compounds (generally simply called "dioxins") are formed as impurities in the manufacture of chemicals based on chlorophenols and chlorinated aromatic hydrocarbons (Cairns et al., 1980), as well as in various industrial processes such as wastes combustion, metal industry, wood burning... (Mukerjee, 1998). Once formed, dioxins are released into the environment and accumulate through the food chain up to humans. According to the number and position of the chlorine atoms, they are able to bind with the aryl

hydrocarbon (Ah) receptor, which gives them the possibility to exert a broad range of toxic and biological effects toward mammals (Tyler et al., 1998).

Since many years, the great environmental concern about the presence of these molecules at low levels (parts per trillion) in the environment has lead scientists to develop sensitive analytical methods. Powerful analytical tools as well as multiple-step isolation and cleanup procedures are necessary to determine trace levels of these analytes in complex contaminated samples. Due to its specificity and sensitivity, high-resolution gas chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) has become the reference method in this field. The usual procedure to quantify dioxins is based on isotopic dilution. This method rests on the measurement of two ions in the molecular cluster for each congener ( $[M]^+$  and  $[M - 2]^+$ , for example) in comparison with their corresponding  $^{13}\text{C}$ -labelled ions with verification of the isotopic ratios and retention times.

As HRGC/HRMS requires large investment and maintenance costs, alternative methods have been evaluated either to replace the reference method or at least

\*Corresponding author. Tel.: +32-4-366-3414; fax: +32-4-366-3413.

E-mail address: jf.focant@ulg.ac.be (J.-F. Focant).

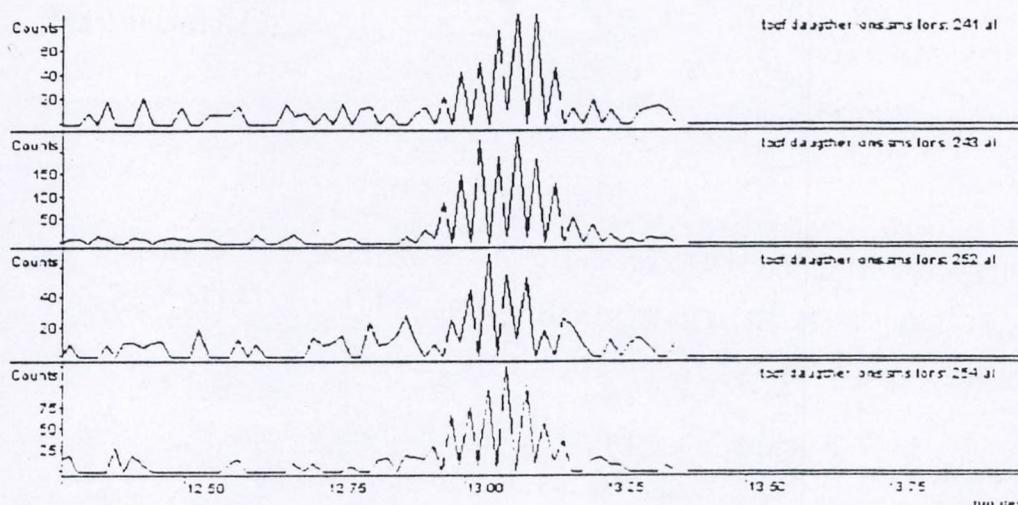


Fig. 1. Example of quantification for TCDF by MS/MS using isotopic dilution. This chromatogram represents native (241, 243) and labelled  $^{13}\text{C}$  (252, 254) daughter ions.

to alleviate analysis costs by their use in preliminary screening. Only suspect samples are kept for analysis by the reference method. Capillary column gas chromatography/tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) using a low-resolution quadrupole ion trap has been presented by Plomley et al. (1994) and Splendore et al. (1997) as a valuable screening method for PCDD/Fs. The storage of selected parent ions in the trap followed by their fragmentation by collision-induced dissociation (CID) yields characteristic daughter ions resulting from the loss of the  $\text{COCl}$  fragment (Chess and Gross, 1980). The fragmentation of native and  $^{13}\text{C}$ -labelled parent ions is monitored using multiple reaction monitoring (MRM). To ensure the production of two different daughter ions for each parent, selected parents ions have to contain at least one  $^{37}\text{Cl}$ ; this is achieved by considering  $[\text{M} - n]^+$  ( $n = 2, 4, 6$ ) parent ions. The quantification is still carried out using the isotopic dilution technique, applied now on daughter ions instead of molecular ions (Fig. 1). The sensitivity reaches a level which, when coupled with the selectivity of the MS/MS method, can confer very good results in the evaluation of 2,3,7,8-substituted congeners' contribution to the toxic equivalency (TEQ) of the environmental samples.

In addition to the optimisation of an alternative mass spectrometry technique, the use and applicability of an immunoassay kit has been evaluated to demonstrate its performances when used together with MS/MS in screening campaigns. Among the different classes of existing dioxin assays (Bosveld and Vanden Berg, 1994; Garrison et al., 1996; Bovee et al., 1998; Schwirzer et al., 1998; Sugawara et al., 1998), a competitive inhibition enzyme immunoassay (EIA) based on a polyclonal antibody specific to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

and related congeners has been well described for soil and fly ash analysis (Harrison and Carlson, 1997a,b, 1998). This commercially available EIA kit has a sensitivity reaching the picogram level. Its response is proportional to the toxic equivalency factors (TEFs) of the toxic isomers.<sup>1</sup>

This paper illustrates the optimisation steps required for MS/MS and EIA. Results are compared with those obtained with the reference procedure. An analytical strategy involving a bioassay as screening test followed by good quantitation using GC/MS/MS is presented as a good approach for routine monitoring or for process optimisation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Toluene, hexane, methanol and water are Baker analysed HPLC reagents (J.T. Baker, Deventer, Netherlands). Dodecane was purchased from Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany).  $\text{HCl}$  (1 M) was prepared using  $\text{HCl}$  92% purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and fuming sulphuric acid prepared with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  95-97% Baker analysed reagents (J.T. Baker). Anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  is a Baker analysed reagent (J.T. Baker) and was covered with toluene and left in an oven at  $100^\circ\text{C}$  overnight before use. The standard solution of 2,3,7,8-chloro-substituted  $^{13}\text{C}_{12}$ -labelled dioxin

<sup>1</sup> High-Performance Dioxin/Furan Immunoassay Kit™, Cape Technologies, L.L.C., South Portland, USA.

ins (EPA 1613LCS),  $^{12}\text{C}_{12}$  1,2,3,4-TCDD as well as EIA calibration standards (DF1-CAL) were purchased from Campro Scientific (Veenendaal, Netherlands).

## 2.2. Instrumentation

All HRGC/HRMS analyses were performed using a VG-AutoSpec-Q high-resolution mass spectrometer (Fisons Instruments, Manchester, UK) and a 5890 Series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Wilmington, USA). Optimised GC conditions as well as operating mode of the mass spectrometer have been described elsewhere (Windal et al., 1998). Mainly, an SP2331 (60 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.2  $\mu\text{m}$ ) capillary column (Supelco, Bellefonte, USA) was used in parallel with a minimum resolution of 10000.

The GC/MS/MS analyses were carried out with a Saturn 2000 GC/MS/MS coupled with a Star 3400CX gas chromatograph and an 8200CX autosampler (Varian, Walnut Creek, USA). The Saturn 5.1 software version of the workstation was used. Mixtures were separated on a DB-5MS (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ) capillary column (J&W Scientific, Folsom, USA). The GC conditions were optimised to separate 2,3,7,8-chloro-substituted congeners as follows: on-column injection of 1  $\mu\text{l}$  of sample at 240°C, initial oven temperature of 150°C for 1 min, then increased at 30°C/min to 210°C, then increased at 1°C/min to 250°C and held for 7 min. A faster GC program has also been used during these experiments: on-column injection of 1  $\mu\text{l}$  of sample at 240°C, initial oven temperature of 140°C for 2 min, then increased at 50°C/min to 220°C held for 2 min, then increased at 25°C/min to 250°C held for 11 min, then increased at 25°C/min to 300°C and held for 3.2 min. In both cases, He (N60, Air Liquide, France) was used as the carrier gas. The trap temperature was set at 200°C, with the transfer line at 250°C and a maximum number of 5000 ions in the trap.

## 2.3. Sample preparation

Experiments were carried out on fly ash samples collected by private industries at the bottom of electrostatic precipitators of Belgian municipal waste incinerators. Several types of samples, called A, R, L and T, containing different levels of PCDD/Fs, were analysed. All fly ash samples were pre-treated as described in a previous paper (Windal et al., 1998). Briefly, sufficient quantity of fly ash was stirred with 1 M HCl for 2 h and then washed several times with fresh water after the elimination of the acidic layer by centrifugation. Overnight-dried ashes were kept in a closed vessel. For the extraction of each sample, 1.5 g of ash were Soxhlet extracted for 20 h using 120 ml of toluene without any previous spike with labelled solutions. The extract was dried with sodium sulphate and filtered. The dried ex-

tract solution was then adjusted to 100 ml in a silanised volumetric flask and protected from light at 5°C until use.

Each immunoassay test was realised on exactly 2 ml of the 100 ml homogenised toluene solution to ensure that appropriate amount of the sample was in contact with the coated tubes later on and to allow the semi-quantitation of the analytes. These 2 ml aliquots were submitted to the required cleanup procedure described in the technical information manual provided with the kit (Cape Technologies, South Portland, USA). This cleanup included fuming sulphuric acid wash, hexane extraction and solvent exchange to methanol using Triton X-100 as keeper.

The remaining solutions contained in the volumetric flasks were spiked with 10  $\mu\text{l}$  of  $^{13}\text{C}$ -labelled 2,3,7,8-dioxin solution to allow isotopic dilution quantification of the native dioxins by physico-chemical analysis. These solutions were concentrated using 50  $\mu\text{l}$  of dodecane as keeper without any additional cleanup.

## 3. Results and discussion

### 3.1. MS/MS optimisation

The MS/MS method development was mainly divided into three steps. The first task was, as usual, to determine the retention time of the parent ions on the selected column. This began with the injection of a standard mixture containing the 16 2,3,7,8-PCDD/F congeners using full-scan mode. The elution pattern from 2,3,7,8-TCDF to OCDD using the 50 min GC program is illustrated in Fig. 2(a). This allowed slicing of the chromatogram into 10 different segments corresponding to each group of chlorination, with every one of these segments being intended to the MRM of the  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  coeluting congeners.

Due to the shift sometimes observed in retention times, when real samples are analysed, a separation between PCDD and PCDF runs was considered. The disadvantage of the two separate injections was partly compensated by the possibility of using a faster method, which included only four or five segments with a total time of 23 min, as illustrated in Fig. 2(b).

The second task concerned the determination of the best conditions to efficiently ionise and trap the parent ions of each congener. Default parameters for the preliminary step of isolation of the ions were used: all the attention was focused on the excitation step yielding the daughter ions.

The CID parameters were then optimised. The main parameters which could be optimised during the excitation step were the excitation mode, the CID time, the excitation voltage and the stability parameter  $q_z$  issued of the Mathieu second-order differential equation which

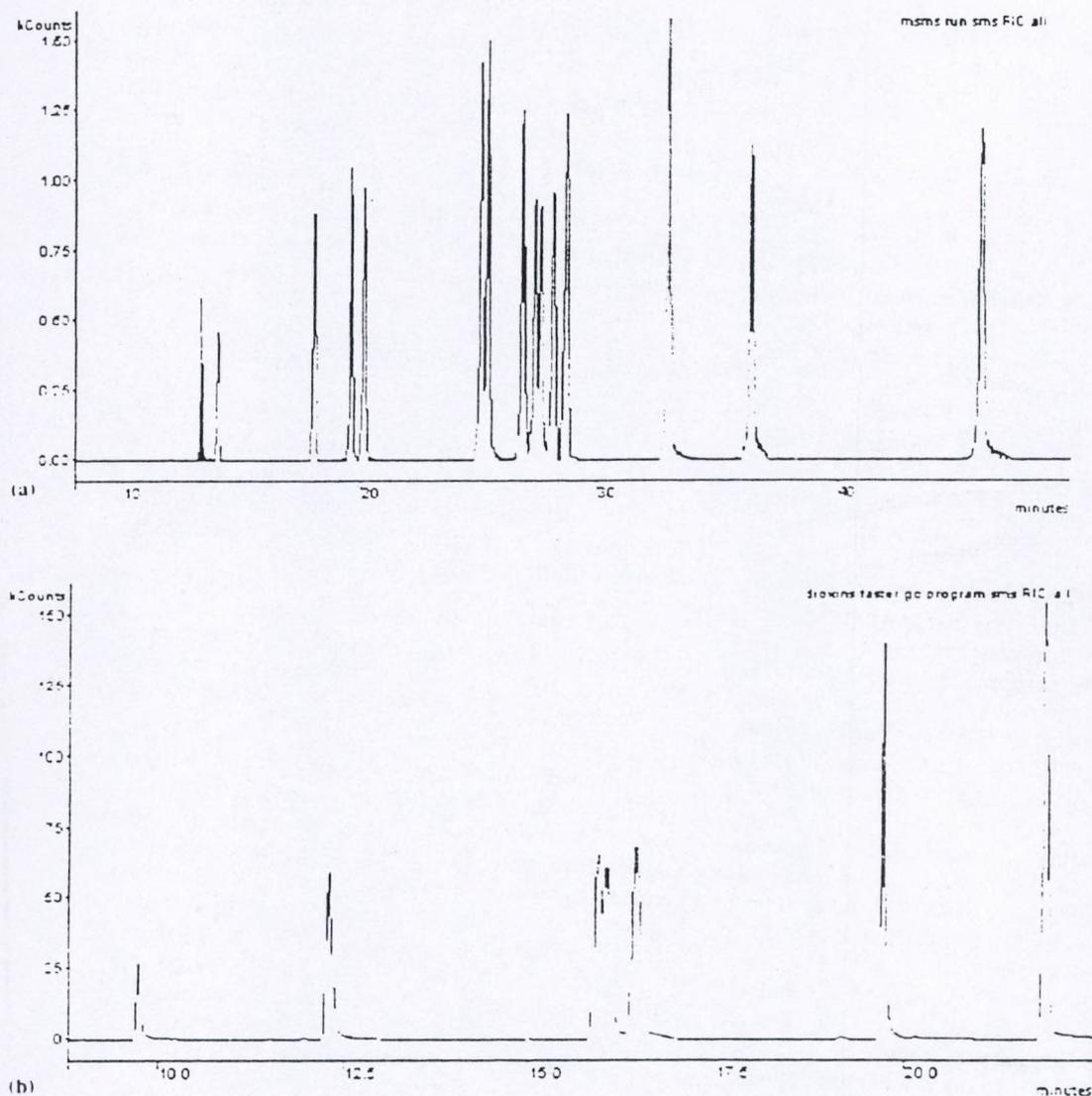


Fig. 2. Example chromatograms corresponding to: (a) 50 min GC program, PCDD and PCDF congeners; (b) 23 min GC program, PCDDs only.

accounted for the ion motion in the trap (March, 1991). The last two parameters were closely linked and an optimum of the couple (CID voltage,  $q_z$ ) had to be found for each 2,3,7,8-congener.

Two methods are available to increase the vibrational energy of the parent ion to allow its fragmentation at sufficient rate: resonant and non-resonant excitation. Firstly, a comparison between these two modes was carried out. Most of the MS/MS experiments described in the literature use resonant excitation mode. This method consists in application of an additional high-frequency dipole field to the end cap electrodes of the ion trap. The frequency is chosen in order to match the secular frequency of the trapped ion, resulting in an

increase of the kinetic energy of the ion. Kinetic energy is transformed into internal energy upon collisions with the helium present in the trap. The internal energy and the residence time are sufficient to allow fragmentation reactions involving rearrangements. The non-resonant mode is suitable for single-bond cleavage. An additional drawback of non-resonant excitation is that it suffers the loss of ions by ejection when slow fragmentation reactions (rearrangements) are monitored. Considering that the loss of COCl for PCDD/Fs occurs via the breakage of multiple chemical bonds, better results were expected using the resonant mode.

Regarding the couple (CID voltage,  $q_z$ ), the stability parameter was first tuned to modify the position of the

ion within the stability diagram of the trap. With the software used,  $q_z$  could be translated in term of excitation storage level (CID rf). This parameter was linked with the broadband multi-frequency waveform used during the isolation of the parent ion.

In order to realise the first selection of the  $q_z$  value without using runs that were too long, 1,2,3,4-TCDD was used rather than a mixture of all congeners. MS/MS optimisation was performed on the molecular ion of TCDD ( $m/z$  334), and the  $q_z$  value varied in the range of 0.2–0.5. A low CID voltage (0.2 V) was applied to avoid fragmentation. This indicated a  $q_z$  value of 0.3 as corresponding to the maximal intensity of the  $m/z$  334 ion.

Using this  $q_z = 0.3$  value as starting point, the determination of the optimum voltage for resonant CID excitation was done with the automated methods development (AMD) tool. This consisted of performing the maximum number of cycles through the different voltages across each peak. AMD allowed the CID voltage to be incremented on a scan-by-scan basis for up to 10 scans per cycle. In our case, values from 0.8 to 1.5 V by increments of 0.2 V were studied. The optimum voltage for maximum intensity of 1,2,3,4-TCDD daughter ion formation ( $m/z$  268 and 270) was around 1.3 V, as illustrated on Fig. 3. It is interesting to note

that isotopic ratios between  $m/z$  268 and 270 ions for this CID amplitude (0.33 V) as well as for higher intensity areas at other voltages (0.34, 0.32 V) are very close to the theoretical value (0.33 V).

Extrapolation of the 1.3 V set to the entire group of  $^{12}\text{C}$  2,3,7,8-PCDD/Fs and  $q_z$  optimisation were then done following some direct modifications. First, the scan time was decreased to 0.3 s/scan to ensure that the system performed enough scans for each fragmentation reaction of the AMD performed on  $q_z$  across the analytical peak. Second, excitation amplitudes for PCDFs were set to greater values due to the higher activation energy required to effect the loss of COCl from PCDFs relative to PCDDs (Plomley and March, 1996). Due to this higher stability, one could often observe the remaining presence of parent ions for PCDFs while PCDD parent ions were absent.

Finally, CID time was optimised. It was found for these chlorinated compounds that a short CID time of 5 ms gave a better signal-noise ratio than the usual longer ones. This feature allowed the collection of more scans across GC peaks, reducing the scan time.

A last parameter which was peculiar to the resonant mode was the number of frequencies applied in the excitation waveform (CID bandwidth). Changing the CID

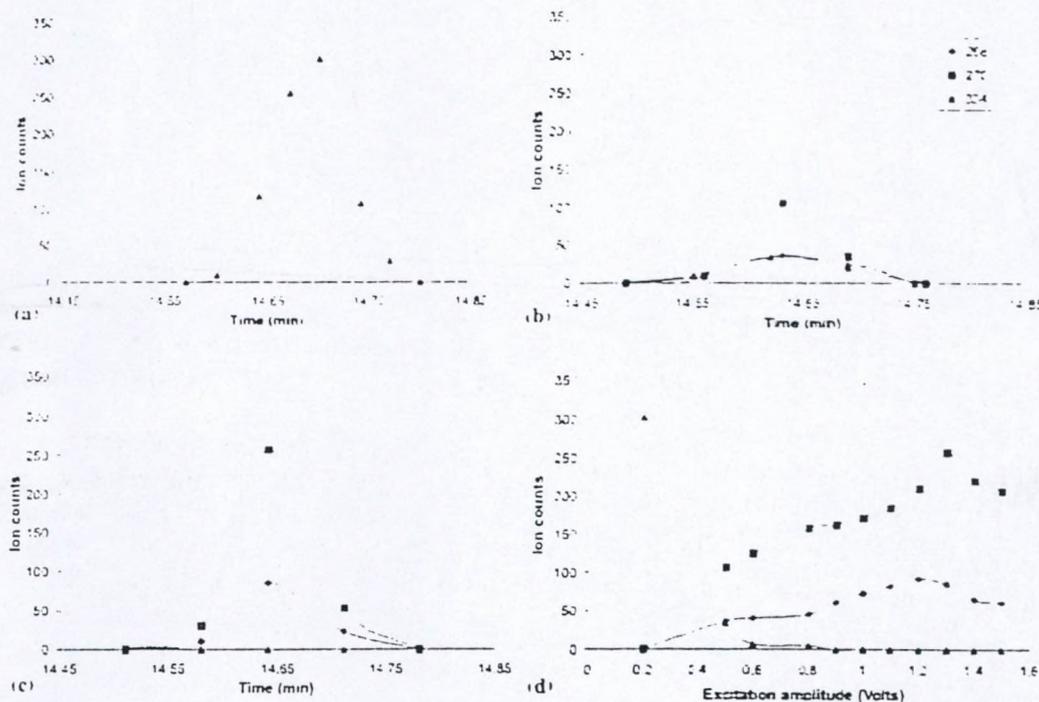


Fig. 3. Fragmentation curves for resonant excitation of 1,2,3,4-TCDD with a  $q_z$  value of 0.3: (a) Using a CID voltage of 0.2 V, the parent ion  $m/z$  334 is not fragmented and daughter ions are not formed yet. (b) Increasing the CID amplitude to 0.5 V gives enough energy for the effective collision of the parent ion with the He and yield to the  $m/z$  334 ion intensity due to the formation of daughter ions  $m/z$  268 and 270; (c) If voltage is set to 1.3 V, the maximal intensity for daughter ions is achieved without any remaining parent ion; (d) Global evolution of the species following CID voltage.

Table 1  
Optimised parameters for the MS/MS analysis of 2,3,7,8-PCDD/Fs

Segment #	Congeners	Molecular ions (m/z)	CID amplitude (V)	CID t <sub>1</sub> (ms)	Daughter ions (m/z)	Isotopic ratios	Validity ( $\pm 2\sigma$ )
Dioxin	TCDD <sup>12</sup> C	321.89 (M+2)	13	106	257/259	0.33	0.26 < 0.33 < 0.4
	TCDD <sup>13</sup> C	333.93 (M+2)	13	147	268/270	0.33	0.26 < 0.33 < 0.4
	PeCDD <sup>12</sup> C	357.85 (M+4)	13	158	293/295	0.66	0.53 < 0.66 < 0.80
	PeCDD <sup>13</sup> C	369.89 (M+4)	13	163	304/306	0.66	0.53 < 0.66 < 0.80
	HlxCDD <sup>12</sup> C	391.81 (M+4)	13	173	327/329	0.5	0.40 < 0.50 < 0.60
	HxCDD <sup>13</sup> C	403.86 (M+4)	13	178	338/340	0.5	0.40 < 0.50 < 0.60
	HpCDD <sup>12</sup> C	425.77 (M+4)	15	188	361/363	0.4	0.32 < 0.40 < 0.48
	HpCDD <sup>13</sup> C	437.81 (M+4)	15	193	372/374	0.4	0.32 < 0.40 < 0.48
	OCDD <sup>12</sup> C	461.73 (M+6)	15	204	397/399	0.6	0.48 < 0.60 < 0.72
	OCDD <sup>13</sup> C	473.77 (M+6)	15	236	408/410	0.6	0.48 < 0.60 < 0.72
Furan	TCDF <sup>12</sup> C	305.89 (M+2)	16	135	241/243	0.33	0.26 < 0.33 < 0.4
	TCDF <sup>13</sup> C	317.94 (M+2)	16	140	252/254	0.33	0.26 < 0.33 < 0.4
	PeCDF <sup>12</sup> C	341.86 (M+4)	16	150	277/279	0.66	0.53 < 0.66 < 0.80
	PeCDF <sup>13</sup> C	353.90 (M+4)	16	175	288/290	0.66	0.53 < 0.66 < 0.80
	HxCDF <sup>12</sup> C	375.82 (M+4)	3	207	311/313	0.5	0.40 < 0.50 < 0.60
	HxCDF <sup>13</sup> C	387.86 (M+4)	3	171	322/324	0.5	0.40 < 0.50 < 0.60
	HpCDF <sup>12</sup> C	409.79 (M+4)	3	203	345/347	0.4	0.32 < 0.40 < 0.48
	HpCDF <sup>13</sup> C	421.82 (M+4)	3	209	356/358	0.4	0.32 < 0.40 < 0.48

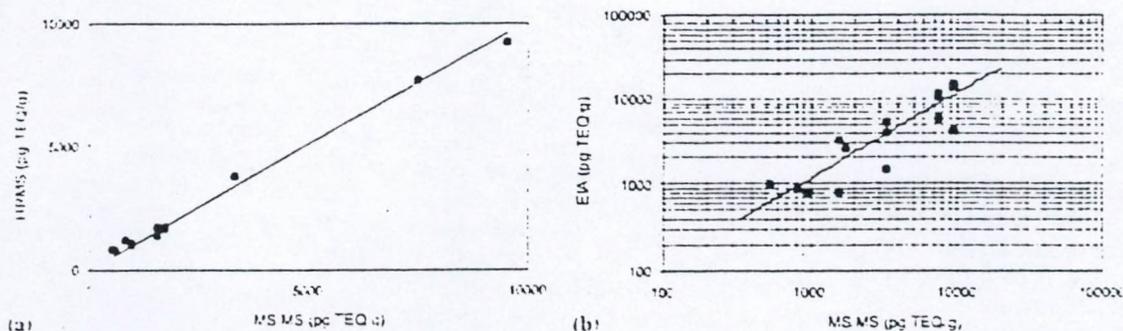


Fig. 4. Analysis of real fly ash samples: (a) Correlation curve between MS/MS and HRMS measurements; (b) EIA response against MS/MS results.

bandwidth permitted simultaneous excitation of ions within a range of masses. It was modified up to seven frequencies, but the main effect was the need of increasing the CID amplitude to compensate the spread of the energy on more frequencies.

The CID conditions were optimised for all natives and isotopic labelled 2,3,7,8-PCDD/Fs, and a multi-segment method to acquire the data was built (see Table 1).

Using these parameters on real fly ash samples, a good correlation (correlation coefficient of 0.99, slope of 1.01) between MS/MS and HRMS could be observed, as clearly illustrated in Fig. 4(a). The MS/MS measurements showed a relative standard deviation (RSD) of about 10-15% for total TEQ values, while RSD for HRMS quantification was between 5% and 10% depending on the nature of the sample contamination level. The RSD in MS/MS was generally greater for lower chlorination degree congeners which were often present in smaller amounts. The limits of detection using MRM applied on two ions in each segment were close to 1 pg  $\mu$ l for TCDD and 3 pg  $\mu$ l for OCDD.

### 3.2. Immunoassay semi-quantification

To allow comparison between the biological method and mass spectrometry results, a calibration curve has been calculated for each EIA run used for quantitative analysis. The complete description of the use of negative control, calibration standards and optical density values interpretation can be obtained in the calculation module C worksheet available for download from the Cape web site.<sup>2</sup>

Fig. 4(b) shows the MS/MS measurements based on calculation of each 2,3,7,8-congener contribution regarding its TEF. These TEFs are plotted versus the EIA response also expressed in picogram TEQ per gram of

sample. This shows that the EIA response follows quite well the evolution in the PCDD/F concentrations. The relatively good correlation (correlation coefficient of 0.84, slope 1.19) observed reflects the good relation between the WHO TEFs used and the cross reactivities of the EIA. The disparities previously reported (Zennegg et al., 1998) between I-TEFs and cross reactivities are lowered using WHO TEFs.

The profile of Fig. 5 indicates that the EIA generally provides a general overestimation of the PCDD/F contents. This means that the probability of finding false positive results is possible, but on the other hand, it gives a safety margin for the biological screening.

## 4. Conclusion

A simple and time-effective analytical strategy for the monitoring of the PCDD/Fs TEQ content in a large number of samples has been designed and verified. It includes an immunoassay for a first sorting out and GC/MS/MS. This approach should meet the need for tools for extensive monitoring.

Positive samples to EIA (above a threshold value) are quantified by GC/MS/MS. A fully secure strategy

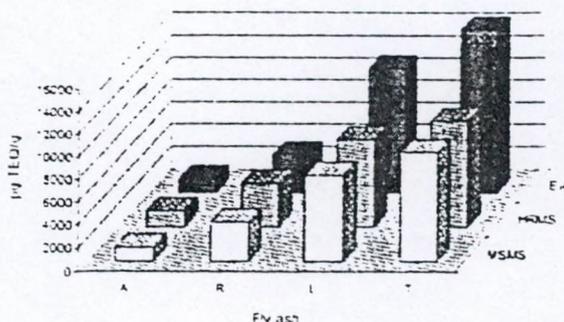


Fig. 5. Overview of the measurements on the different fly ashes

<sup>2</sup> Cape Technologies web site: <http://www.cape-tech.com/>.

should include the GC/MS/MS quantitation of a random selection of negative EIA samples. Random selection of positive samples can be, when required, confirmed by HRGC/HRMS. This combination of immunoassay and physico-chemical methods will reduce the global time and cost of efficient monitoring. Current work aims to decrease the detection limits of these alternative methods to make them suitable for the analysis of biological samples (Hayward et al., 1999).

#### Acknowledgements

This research was supported by the F.R.I.A. (Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture) and the R.W. (Region Wallonne). The authors also thank Robert O. Harrison from Cape Technologies for interesting discussions.

#### References

- Bosveld, A.T.C., Vanden Berg, M., 1994. Biomarkers and bioassays as alternative screening methods for the presence and effects of PCDD, PCDF and PCB. *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, 106-110.
- Boyer, T.F.H., Hoogenboom, L.A.P., Hamers, A.R.M., Traag, W.A., Zuidema, T., Aarts, J.M.J.G., Brouwer, A., Kuiper, H.A., 1998. Validation and use of the CALUX-bioassay for the determination of dioxins and PCBs in bovine milk. *Food Addit. Contam.* 15, 863-875.
- Cairns, T., Fishbein, L., Mitchum, R.K., 1980. Review of the dioxin problem: Mass spectrometric analyses of tetrachlorodioxins in environmental samples. *Biomed. Mass Spectrom.* 7, 484-492.
- Cress, E.K., Gross, M.L., 1980. Determination of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins by mass spectrometric metastable decomposition monitoring. *Anal. Chem.* 52, 2057-2061.
- Garrison, P.M., Tullis, K., Aarts, J.M.J.G., Brouwer, A., Giesy, J.P., Denison, M.S., 1996. Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-like chemicals. *Fundam. Appl. Toxicol.* 30, 194-203.
- Harrison, R.O., Carlson, R.E., 1997a. A new dioxin/furan immunoassay with low picogram sensitivity and specificity appropriate for TEQ measurement. *Organohalogen Compd.* 31, 139-144.
- Harrison, R.O., Carlson, R.E., 1997b. An immunoassay for TEQ screening of dioxin/furan samples: current status of assay and applications development. *Chemosphere* 34, 915-928.
- Harrison, R.O., Carlson, R.E., 1998. Measurement of PCDD/F TEQ by immunoassay: demonstration using real world samples. *Organohalogen Compd.* 35, 43-46.
- Hayward, D.G., Hooper, K., Andrzejewski, D., 1999. Tandem-in-time mass spectrometry method for the sub-parts-per-trillion determination of 2,3,7,8-chlorine-substituted dibenzo-*p*-dioxins and furans in high-fat foods. *Anal. Chem.* 71, 212-220.
- March, R.E., 1991. A musing on the present state of the ion trap and prospects for future applications. *Org. Mass Spectrom.* 26, 627-632.
- Mukerjee, D., 1998. Health impact of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins: a critical review. *J. Air and Waste Manage. Assoc.* 48, 157-165.
- Plomley, J.B., Koester, J., March, R.E., 1994. Rapid screening technique for tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins in complex environmental matrices by gas chromatography/tandem mass spectrometry with an ion trap detector. *Org. Mass Spectrom.* 29, 372-381.
- Plomley, J.F., March, R.E., 1996. Tandem mass spectrometry of polychlorodibenzo-*p*-dioxin and polychlorodibenzofuran in a quadrupole ion trap. I. Comparison of single frequency, secular frequency modulation, and multifrequency resonant excitation modes. *Anal. Chem.* 68, 2345-2352.
- Safe, S.H., 1986. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26, 371-399.
- Schwirzer, S.M.G., Holmaler, A.M., Kettrup, A., Nerdinger, P.E., Scaramin, K.-W., Thoma, H., Wegenke, M., Wibel, F.J., 1998. Establishment of a simple cleanup procedure and bioassay for determining 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity equivalents of environmental samples. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 77-82.
- Splendore, M., Plomley, J.B., March, R.E., Mercer, R.S., 1997. Tandem mass spectrometric determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorodibenzofurans in a quadrupole ion trap using multifrequency resonant excitation. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 165, 166-169.
- Sugawara, Y., Gee, S.J., Sanborn, J.R., Gilman, S.D., Hammock, B.D., 1998. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal antibodies for the detection of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Anal. Chem.* 70, 1092-1099.
- Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 319-361.
- Windal, L., Eppe, G., Gridelet, A.-C., Pauw, E., 1998. Supercritical fluid extraction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins from fly ash: the importance of the fly ash origin and composition on extraction efficiency. *J. Chromatogr. A* 819, 187-195.
- Zennegg, M., Harrison, R.O., Schmid, P., 1998. Application of a PCDD/PCDF immunoassay for the determination of TEQ in fly ash - a comparison with GC/MS data. *Organohalogen Compd.* 35, 213-215.

SERVICES FEDERAUX DES AFFAIRES SCIENTIFIQUES, TECHNIQUES ET CULTURELLES



RUE DE LA SCIENCE 8  
1000 BRUXELLES

