

Chromatographie en phase gazeuse haute résolution— spectrométrie de masse des congénères de biphényles polychlorés dans quelques échantillons d'origine biologique

M. R. DRISS

Département de Chimie, Faculté des Sciences, Campus Universitaire le Belvédère, 1060, Tunis (Tunisie)

S. SABBAH

Institut National de Recherche Scientifique et Technique, 2050, Hammam-lif (Tunisie)

et

M. L. BOUGUERRA*

Département de Chimie, Faculté des Sciences, Campus Universitaire le Belvédère, 1060, Tunis (Tunisie)

ABSTRACT

High-resolution gas chromatography–mass spectrometry of polychlorinated biphenyl congeners in biological samples

A study is performed on polychlorinated biphenyl (PCB) congener residues in samples of human blood and milk as well as in falcon and pigeon eggs.

Most of the PCB congeners found in these biological samples were quantified by high-resolution gas chromatography (HRGC). A PCB technical mixture —namely, DP6 (Phenochlor)— was used for the calibration as its composition was previously determined by HRGC–mass spectrometry.

The usefulness of such a congener analysis is outlined.

It is the first time to the best of our knowledge that a Phenochlor mixture is used for standardization.

INTRODUCTION

L'analyse des résidus de biphényles polychlorés (PCBs) débute par leur extraction de la matrice originelle; l'extrait ainsi obtenu est soumis, après purification, à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec détection à capture d'électrons (ECD).

L'utilisation des colonnes capillaires dans le domaine de l'analyse des PCBs a permis l'obtention d'une information qualitative détaillée de la composition des PCB [1–5]. Le pouvoir de séparation et la haute résolution de ces colonnes de chromatographie ont révélé que les PCBs, dans les mélanges techniques, étaient représentés par près d'une centaine de composés [6] et que dans les produits environnementaux, l'empreinte des PCBs pouvait varier d'une matrice à l'autre.

L'incertitude sur la mesure, exprimée en équivalent de mélange technique, est d'autant plus importante que le profil des PCBs diffère de celui des produits de référence. Ce fait est particulièrement frappant dans le cas de matériel biologique

provenant d'organismes supérieurs (oiseaux, mammifères) [7–9] pour lesquels les composés fortement chlorés sont amplifiés, ce qui conduit à une surestimation de la quantification en termes d'équivalent de mélanges techniques.

Les limites de ce mode de quantification apparaissent ainsi doublement. D'une part, la réduction des nombreuses données contenues dans un chromatogramme à une seule grandeur qui est l'expression de la concentration en PCBs totaux, fait perdre l'information qualitative sur la contamination [10,11]. D'autre part, l'expression de la mesure en équivalent de mélange technique ne permet pas une appréciation satisfaisante des processus discriminants vis-à-vis des différents chlorobiphényles.

Ces méthodes quantitatives utilisées dans la détermination des PCBs ont été critiquées dès 1975 [11].

Dans ce contexte, la quantification par congénère trouve toute sa justification, elle permet une meilleure approche du comportement des PCBs et de leurs effets sur l'environnement. En effet, il est important, notamment sur le plan de la toxicité, de préciser quels sont les composés retenus par la matière vivante et quels sont les processus intervenant dans cette sélection [12,13].

La méthode de quantification par congénère est plus précise car elle s'adresse effectivement à la concentration réelle du composé présent dans l'extrait étudié. Souvent, le problème à résoudre concerne la disponibilité des congénères purs nécessaires à la réalisation des solutions étalons et la sélection des composés à prendre en considération pour le dosage résiduel des PCBs. Or, la plupart des congénères ne sont pas disponibles commercialement et lorsqu'ils existent, leur coût rend difficile l'acquisition des 209 composés.

Pour pallier à ces difficultés, nous proposons dans le présent travail une méthode de quantification des congénères de PCB basée sur l'utilisation d'un mélange technique de Phénochlor (DP6) dont la composition est préalablement déterminée par CPG haute résolution (CPG-HR)–spectrométrie de masse (SM) [14]. Les facteurs de réponse des congénères sont déterminés par CPG–ECD. Dans ces conditions, la quantification se fait de la façon classique, composé par composé.

Diverses études ont utilisé l'Aroclor [15] et le Clophen [16] comme référence pour la quantification des congénères de PCB mais c'est la première fois, à notre connaissance, que le Phénochlor DP6 est pris comme étalon pour ce type de dosage.

Les échantillons étudiés, sont: le lait maternel, le sang d'adulte et les oeufs de faucon et de pigeon.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériels et conditions opératoires

Les échantillons d'oeufs de Faucon et de Pigeon proviennent d'un lot qui a fait l'objet d'une étude précédente quant à la concentration globale en PCBs [17–19].

Quant aux échantillons de lait maternel et de sang d'adulte, ils proviennent d'un lot d'une centaine de donneurs qui a fait lui aussi, de son côté, l'objet d'un travail précédent [20].

Les échantillons objet de la présente étude ont été choisis pour représenter une grande variété de concentrations en PCBs.

La CPG sur colonne capillaire a été menée sur un chromatographe Varian 3700 équipé d'un détecteur à capture d'électrons (Ni 63). Une colonne capillaire en silice

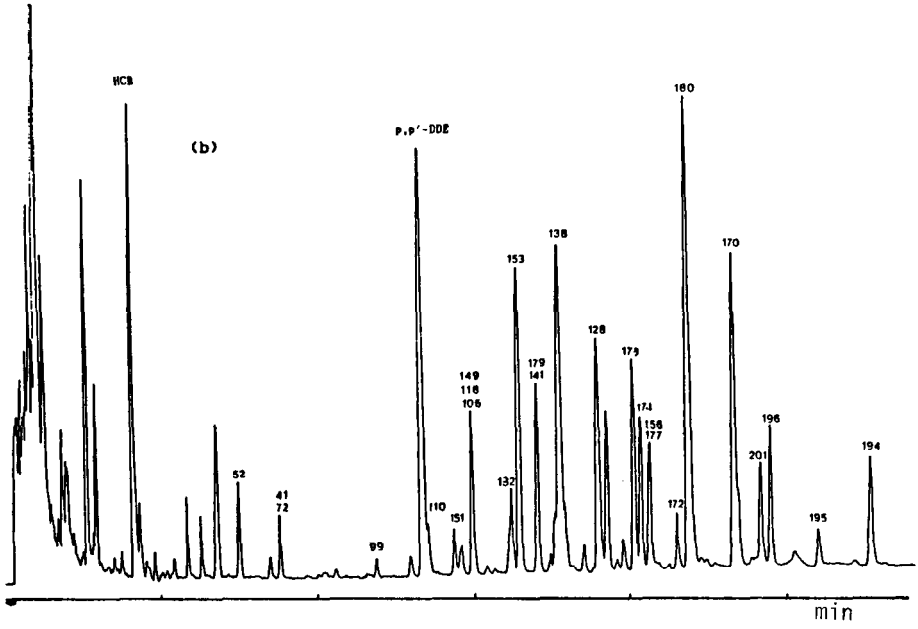
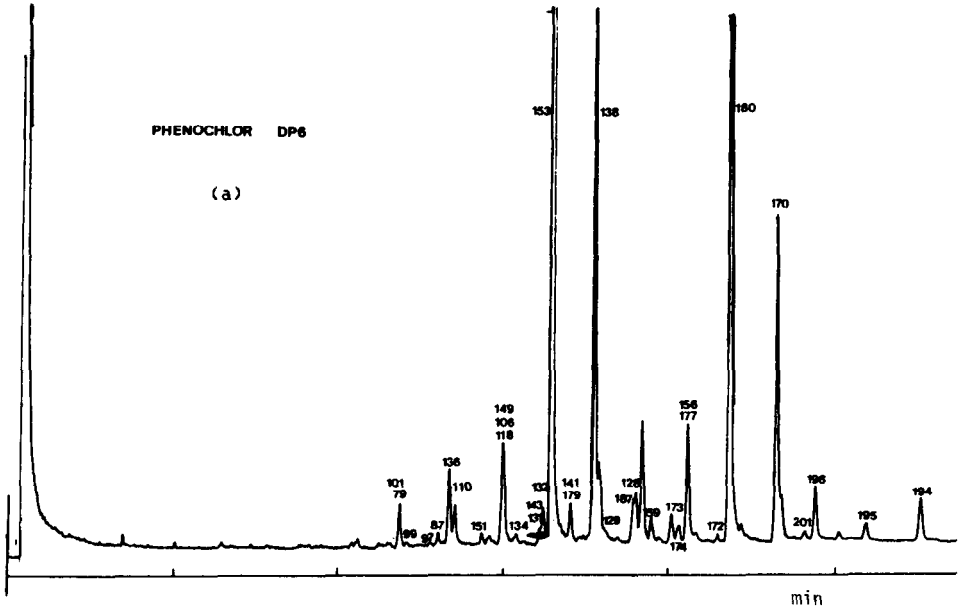


Fig. 1

(Continué sur la p. 216)

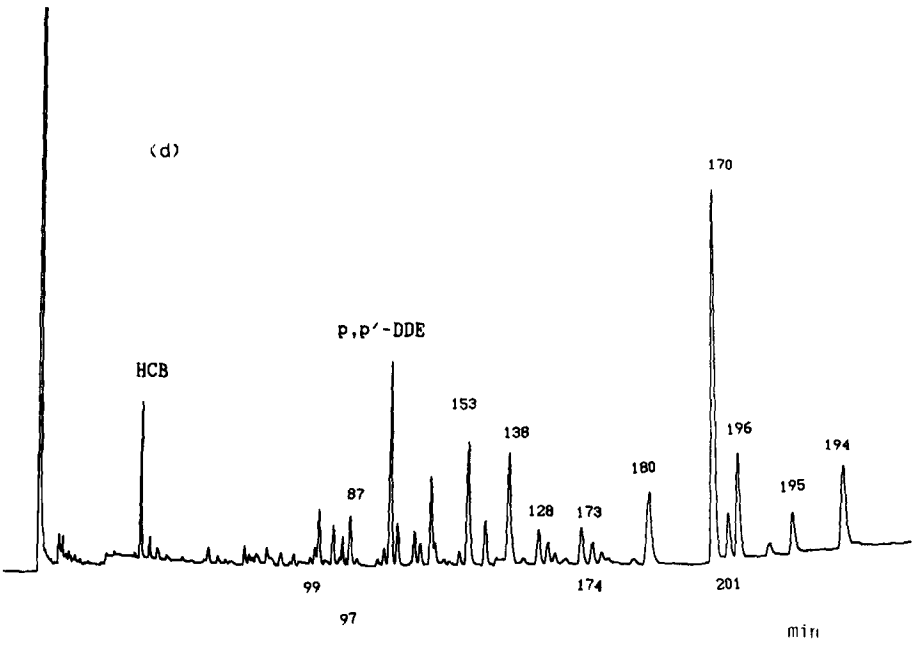
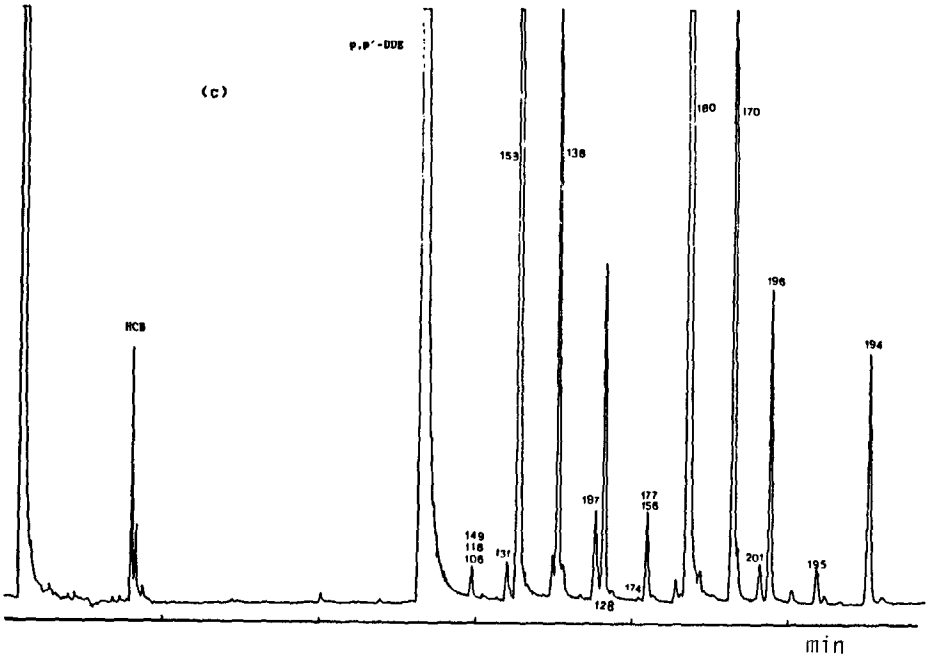


Fig. 1.

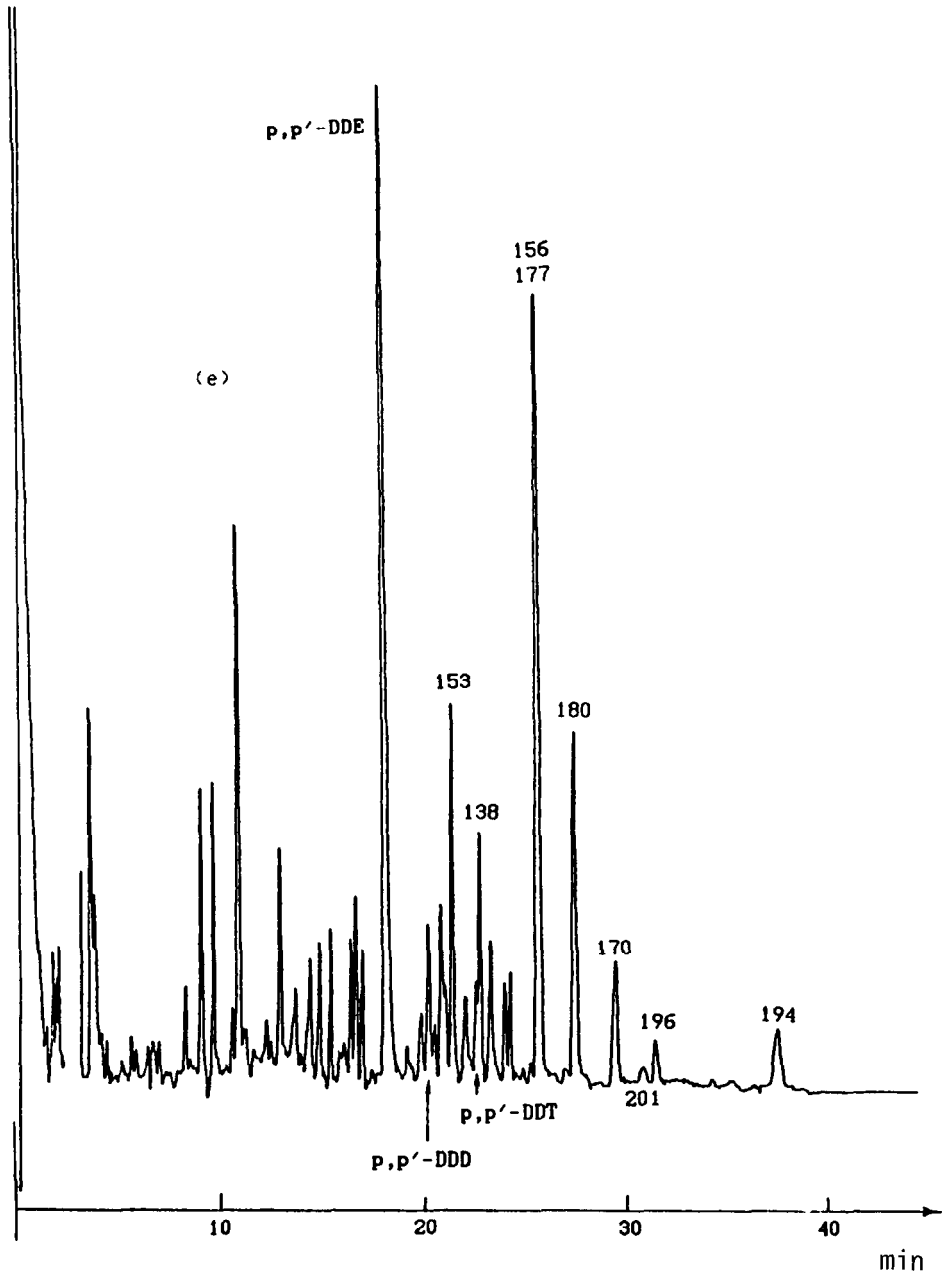


Fig. 1. (a) Chromatogramme du mélange technique DP6; (b) chromatogramme d'un échantillon de lait maternel; (c) chromatogramme d'un échantillon d'oeuf de faucon; (d) chromatogramme d'un échantillon de sang d'adulte; (e) chromatogramme d'un échantillon d'oeuf de pigeon. Appareil: Varian 3700 équipé d'un détecteur à capture d'électrons (Ni 63). Colonne: capillaire (WCOT), en silice fondue, 25 m × 0,32 mm D.I., paroi interne recouverte d'un film (0,12 μm) de CP-Sil 5. Conditions chromatographiques: voir texte.

fondue, de 25 m de long et de 0,32 mm de D.I., de paroi interne recouverte de la phase CP-Sil 5 dont l'épaisseur du film est de 0,12 μm , est utilisée dans ce travail.

Pour l'analyse chromatographique des échantillons de lait maternel, d'oeuf de faucon et de sang d'adulte, la température du four est programmée à la vitesse de 3°C/min de 150 à 200°C avec un palier de 4 min à la température initiale. Quant à l'analyse de l'extrait d'oeuf de pigeon, la température de la colonne est programmée de 130 à 200°C à la vitesse de 3°C/min. D'autre part, les températures du détecteur et de l'injecteur sont respectivement 300 et 260°C. Le volume injecté est de 1 μl (injection directe). La pression du gaz vecteur, l'hydrogène, est fixée à 17 p.s.i. Le débit du gaz additionnel (azote U) est de 30 ml/min. Les temps de rétention, les aires des pics et le calcul des concentrations sont fournis par un calculateur intégrateur CDS 111.

La CPGHR-SM utilisée pour la détermination de la composition du mélange DP6 a été menée sur un chromatographe de type Girdel série 32, équipé de la colonne capillaire CP-Sil 5 précédemment décrite, et couplé à un spectromètre de masse Nermag 10-10C muni d'un système de traitement des données Spectral 30. Les spectres de masse ont été enregistrés en mode impact électronique (IE) avec une énergie d'ionisation de 70 eV et une température de source de 200°C.

Méthode de quantification

L'injection du DP6 sur la colonne capillaire CP-Sil 5 (détection par capture d'électrons) donne un chromatogramme révélant 27 pics (Fig. 1a). Pour les composés majoritaires, à chaque pic du chromatogramme correspond un composé. Cependant, quelques groupements —paires voire triplets— de composés demeurent non résolus; on obtient au total 17 pics correspondant à des chlorobiphényles identifiés avec une confortable marge de confiance et que l'on peut, en outre, quantifier. Ces congénères représentent 84% en masse du DP6. Ils ont été identifiés au moyen des indices de rétention mesurés par rapport aux *n*-alkyltrichloroacétates et de plus, déduits par le calcul selon la règle de Sisson et Welti [21] qui veut que l'indice de rétention d'un PCB soit égal à la somme des demi-indices de rétention de chacune de ses demi-structures. Les indices de rétention mesurés sont donnés par l'expression:

$$I_x = 100(TR_x - TR_z)/(TR_{z+1} - TR_z) + 100_z$$

dans laquelle I_x est l'indice du congénère x , TR_z est le temps de rétention du *n*-alkyltrichloroacétate dont le pic émerge immédiatement avant celui du soluté x et dont le nombre d'atomes de carbone du radical *n*-alkyle est z . TR_{z+1} est le temps de rétention du *n*-alkyltrichloroacétate, immédiatement élué après le soluté x , dont le nombre d'atomes de carbone du radical *n*-alkyle est $z + 1$.

Quant à la fraction massique x_i , du congénère i , dans le DP6, elle est déduite de l'analyse par CPGHR-SM. Ainsi la valeur x_i et la masse spécifique m_i du congénère i sont liées à la masse (m_i) du DP6 injecté par la relation:

$$m_i = m_i x_i / 100$$

(m_i est généralement exprimée en ng).

Par détection en capture d'électrons, le facteur de réponse E_i d'un congénère i nécessaire pour le dosage résiduel est alors exprimé par la relation:

$$E_i = A_i / m_i$$

TABLEAU I

POURCENTAGE MASSIQUE ET FACTEURS DE RÉPONSE DES CONGÉNÈRES DE PCB DANS LE DP6

No. IUPAC	% massique	F.R.R. (ECD) ^a	No. IUPAC	% massique	F.R.R. (ECD) ^a
52	0,48	N.E. ^{b,f}	134	N.D. ^c	N.E. ^d
49+47	0,26	N.E. ^c	131+143	0,38	N.E. ^c
42+44	0,15	N.E. ^c	132	N.D.	N.E. ^b
37	0,02	N.E. ^b	153	18,65	0,497
41+72	0,10	N.E. ^c	141+179	1,67	N.E. ^c
70	0,15	N.E. ^b	138	16,79	0,642
66+95	0,45	N.E. ^c	129	0,12	0,987
80+89	0,12	N.E. ^c	187	1,21	1,132
92+84	0,30	N.E. ^c	128	4,38	1,174
79+101	2,20	N.E. ^c	159	N.D.	N.E. ^d
99	0,29	0,532	173	0,83	2,122
97	0,39	0,590	174	0,59	0,346
87	0,84	0,980	156+177	2,90	N.E. ^c
136+85	0,55	N.E. ^c	180	14,50	1,177
110	2,21	0,755	170	18,40	0,842
151	0,53	0,532	201	1,50	0,953
106+			196	0,85	1,142
118+149	6,10	N.E. ^c	195	0,67	0,542

^a F.R.R.: facteur de réponse par rapport à l'aldrine (F.R.R. = 1 pour un ng d'aldrine).

^b Non détecté en ECD.

^c Coélués sur CP-Sil 5.

^d Non détecté en SM.

^e N.D. = non décelé.

^f N.E. = non évalué.

dans laquelle A_i représente l'aire du pic du congénère i .

Afin d'établir la courbe de calibration pour chaque congénère à doser, des solutions étalons de DP6 de différentes concentrations ont été injectées. Ainsi a été déterminée la gamme de concentration pour laquelle le plus grand nombre de congénères détectés par SM présentent une réponse linéaire en détection par capture d'électrons (Tableau I). Il apparait sur ce tableau, à la concentration optimale de travail, que certains congénères quantifiés par SM ne sont pas décelés en ECD. Par ailleurs, comme à chaque congénère de PCB correspond un facteur de réponse en ECD, en cas de coélution des composés, cette grandeur ne peut plus être évaluée. D'ailleurs, une nette disparité des valeurs du facteur de réponse E_i pour les congénères isomères heptachlorés et hexachlorés a été mise en évidence (Tableau I). Ce résultat a été, du reste, déjà signalé par Mullin *et al.* [22].

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Sur le Tableau II figurent les teneurs résiduelles des PCBs détectés dans les échantillons de lait maternel, de sang et d'oeufs de faucon et de pigeon. Pour tous ces échantillons, l'empreinte des PCBs en CPG diffère de celle du mélange technique DP6 (Fig. 1b, c, d et e). Ce résultat montre bien que, lors de l'évaluation des teneurs en PCBs

TABLEAU II
TENEUR DES CONGÉNÈRES DE PCB DANS LES ÉCHANTILLONS D'OEUF DE FAUCON ET DE PIGEON, DE LAIT MATERNEL ET DE SANG D'ADULTE

No. IUPAC	Structure	Oeuf de faucon			Oeuf de pigeon			Lait maternel			Sang d'adulte		
		OF1 (%)	OF2 (%)	OF3 (%)	OP1 (%)	OP2 (%)	OP3 (%)	LM1 (%)	LM2 (%)	LM3 (%)	SA1 (%)	SA2 (%)	SA3 (%)
99	2,2',4,4',5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,15	1,02	1,08	1,27	2,6	0,76
97	2,2',3,6,6'	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2,5	5,3	2,27
87	2,2',3,4,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2,29	7,07	4,93
110	2,3,3',4,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
151	2,2',3,5,5',6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,17	0,10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
153	2,2',4,4',5,5'	13,97	15,36	13,82	26,35	10,59	30,5	10,52	5,30	6,30	16,4	12,9	20,6
138	2,2',3,4,4',5'	11,72	13,56	7,04	16,35	51,81	20,08	23,72	11,20	13,45	13,31	8,6	7,54
187	2,2',3,4',5,5',6	4,24	3,80	5,02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,70	8,12	1,4	1,56	2,07
128	2,2',3,3',4,4'	0,86	0,63	2,39	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12,21	N.D.	3,86	6,89	8,28
173	2,2',3,3',4,5,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3,00	5,17	N.D.	2,2	2,05	2,22
174	2,2',3,3',4,5,6'	0,3	1,68	0,98	N.D.	N.D.	N.D.	2,23	3,04	2,25	1,27	2,02	2,34
180	2,2',3,4,4',5,5'	14,83	18,23	3,67	20,63	8,08	25,4	12,03	9,23	12,75	10,03	9,89	6,73
170	2,2',3,3',4,4',5	23,83	17,3	35,95	18,52	6,59	12	20,40	22,50	30,50	18,32	18,8	17,77
201	2,2',3,3',4',5,5',6	4,99	6,93	N.D.	5,17	0,84	0,13	6,05	10,23	11,32	8,2	4,3	3,74
196	2,2',3,3',4,4',5',6	12,72	11,6	15,06	4,5	14,7	7,2	10,35	9,02	7,12	8,47	12,98	10,30
195	2,2',3,3',4,4',5,6	4,24	3,8	6,12	N.D.	N.D.	N.D.	3,45	4,47	2,37	2,15	1,09	1,52
194	2,2',3,3',4,4',5,5'	8,48	7,73	10,04	8,5	7,3	5,3	6,90	5,80	4,75	8,31	4,02	8,91
Total (ppm)		127,2	115,9	20,33	1,533	3,217	0,62	0,834	1,815	0,195	7,84 · 10 ⁻³	5,66 · 10 ⁻³	5,27 · 10 ⁻³

totaux, l'utilisation d'un mélange technique de référence pourrait conduire à des résultats discutables.

Les types d'échantillons sélectionnés (lait, sang et oeufs) permettent d'apprécier des niveaux de présence des PCBs dans des proportions bien différentes. En effet la présence de contaminants dans la matière vivante est la résultante d'un ensemble de processus, différents d'une espèce à l'autre; processus d'absorption (régime alimentaire), de redistribution intracorporelle (rôle des lipides), de transfert et d'élimination de polluants (métabolisme),... Les facteurs environnementaux et biologiques influent sur ces processus [23,24] et il semble à première vue normal que des différences de concentration apparaissent pour ces congénères dans les types d'échantillons étudiés.

La contamination du lait, du sang et des oeufs de faucon et de pigeon est marquée par la prédominance des chlorobiphényles: 153, 138, 180 et 170. Donc, ces congénères apparaissent comme peu métabolisables par les organismes étudiés et par là, accumulables dans leurs tissus. Une propriété commune de ces molécules est que les deux groupements phényles de chaque congénère comporte l'un des détails de structures suivants: trichloro-2,4,5-phényle, trichloro-2,3,4-phényle et tétrachloro-2,3,4,5-phényle.

Quant aux congénères 194, 195, 196 et le 201 octachloré, qui se rencontrent à une teneur appréciable dans nos échantillons, leur présence pourrait de plus s'expliquer par leur degré de chloration élevé qui les rend réfractaires à l'élimination [25].

Certains congénères présents dans le DP6 ne se rencontrent que: dans le sang uniquement pour les congénères 87 et 97; dans le lait uniquement pour les congénères 151; et dans ces deux fluides d'origine humaine: 99.

Tous ces composés ont l'un des groupements phényles substitués en position 2,5 ou 2,3,6.

Les congénères qui ont été décelés dans cette étude dans le lait et le sang humains ont été aussi récemment rapportés dans le tissu adipeux à l'exception du congénère 201 [26].

CONCLUSION

La détermination des résidus de congénères de PCB peut être menée par CPGHR en utilisant des solutions standards issues des mélanges techniques de Phénochlor dont les compositions ont été préalablement déterminées. Ainsi une solution étalon de DP6 se révèle convenable pour la quantification de la plupart des congénères de PCB détectés dans les fluides biologiques et les oeufs. La méthode proposée, comparativement aux analyses classiques de dosage des PCBs, pourrait, à notre avis, permettre une meilleure compréhension des mécanismes de bioaccumulation et de persistance de ces composés dans la biosphère et l'environnement.

RÉSUMÉ

La plupart des résidus de congénères de PCB présents dans des échantillons de lait maternel, de sang d'adulte, d'oeufs de faucon et de pigeon ont été quantifiés par chromatographie en CPGHR. Pour la calibration, on a utilisé un mélange technique de PCBs, le Phénochlor DP6, dont la composition a été déterminée au préalable par CPGHR-SM. L'intérêt de l'analyse des PCBs par congénère est par ailleurs discuté.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. E. Wells, M. J. Gillespie et A. E. A. Porter, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 8 (1985) 443.
- 2 P. W. Albro, J. T. Corbett et J. L. Schroeder, *J. Chromatogr.*, 205 (1981) 103.
- 3 J. C. Duinker et M. T. Hillbrand, *Environ. Sci. Technol.*, 17 (1983) 449.
- 4 L. Tuinstra et A. Traag, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66 (1983) 708.
- 5 K. Ballschmiter et M. Zell, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 302 (1980) 20.
- 6 P. R. Schwartz, R. D. Campbell, D. L. Stalling, R. J. Little, J. D. Petty, J. M. Hogan et E. M. Kaiser, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1303.
- 7 E. Schulte et R. Malisch, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 319 (1984) 54.
- 8 A. Abarnou, D. Robineau et P. Michel, *Oceanol. Acta.*, 9 (1986) 19.
- 9 S. Safe, L. Safe et M. Mullin, *J. Agric. Food Chem.*, 33 (1985) 24.
- 10 S. Tanabe, F. Gondaira et A. Subramanian, *J. Agric. Food Chem.*, 38 (1990) 899.
- 11 A. S. Y. Chau et R. C. J. Sampson, *Environ. Lett.*, 8 (1975) 89.
- 12 G. Y. Leon, E. A. Emmett et E. D. Pellizzari, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 87 (1987) 48.
- 13 S. Tanabe, *Marine Pollut. Bullet.*, 20 (1989) 247.
- 14 S. Sabbah et M. L. Bouguerra, *J. Chromatogr.*, 552 (1991) 223.
- 15 L. Tuinstra et A. Traag, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66 (1983) 708.
- 16 E. Schulte et R. Malisch, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 314 (1983) 545.
- 17 M. R. Driss et M. L. Bouguerra, *Analisis*, 8 (1987) 361.
- 18 M. R. Driss, L. Mahmoud, L. Bahri et M. L. Bouguerra, *Bull. Ecol.*, 19 (1988) 43.
- 19 M. R. Driss, M. L. Bouguerra et S. Sabbah, dans A. A. Orio (Rédacteur), *Environmental Contamination, Third Internal Conference Acts, Venice, 26-29 September 1988*, UNEP-WHO, Venice, 1988.
- 20 S. Sabbah, Z. Jemaa et M. L. Bouguerra, *Analisis*, 15 (1987) 399.
- 21 D. Sisson et D. Welti, *J. Chromatogr.*, 60 (1971) 15.
- 22 M. D. Mullin, C. M. Pochini, S. McCrindle, M. Romkes, S. Safe et L. Safe, *Environ. Sci. Technol.*, 18 (1984) 468.
- 23 S. Safe, A. Parkinson, M. A. Denomme et T. Fujita, *Environ. Health Perspect.*, 60 (1985) 47.
- 24 L. B. Willet, T. T. Y. Liu et G. F. Fries, *J. Dairy Sci.*, 73 (1990) 2136.
- 25 P. de Voogt, D. E. Wells, L. Reutergårdh et U. A. Th. Brinkman, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 40 (1990) 1.
- 26 D. T. Williams et G. L. Lebel, *Chemosphere*, 20 (1990) 33.