



*Analyse de traces*

## **Outil logiciel d'aide à la déconvolution et à la purification de spectres de masse en mélanges complexes**

*S. Abouelkaram • N. Kondjoyan • F. Mercier • J-L. Berdagué*

*INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, Saint Genès Champanelle, France*

Dans le cadre de la recherche de composés volatils marqueurs de la qualité des aliments, nous avons développé un outil logiciel de purification des spectres de masse en mélanges complexes. Cet outil permet d'analyser de zones chromatographiques ciblées et d'extraire des spectres purs impossibles à obtenir manuellement ou avec les outils logiciels disponibles sur le marché. Actuellement, ce logiciel de déconvolution spectrale fonctionne de manière interactive sur des régions d'intérêt choisies ; ce qui est un avantage par rapport à l'approche « boîte noire » des outils existants. A terme, une version automatisée traitera un chromatogramme complet en laissant à l'opérateur la possibilité de retraiter une région particulière en semi-automatique. Ce logiciel réalise l'analyse des signaux de chromatographie en phase gazeuse monodimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse. Sa mise en œuvre donne, aux possesseurs de systèmes de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS), la possibilité d'identifier un nombre important de composés supplémentaires présents dans leurs chromatogrammes unidimensionnels. Cet outil complète également l'information apportée par les équipements de séparation physique tels que la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GCxGC-MS/tof). En effet, il permet d'explorer les signaux de la seconde dimension où subsistent encore de nombreuses co-élutions résiduelles. Le principe de notre logiciel repose sur l'utilisation d'une cascade d'algorithmes réalisant successivement 1) la détection des pics présents dans toute zone du chromatogramme, 2) la sélection des pics éligibles, 3) l'ajout des pics retenus dans le processus de calcul des spectres purifiés. Afin d'évaluer objectivement les performances du logiciel, nous avons fait le choix d'identifier de la manière la plus exhaustive possible les composés volatils présents dans plusieurs zones de co-élutions complexes obtenues par analyse GC-MS. Pour cela, nous avons ré-analysé ces zones par chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle de type « Heartcut » couplée à la spectrométrie de masse (GC-GC-MS) ; ceci afin d'obtenir une liste de référence des substances présentes dans les co-élutions. Les résultats présentés

comparent les performances du logiciel pour extraire des spectres purifiés (i) aux performances de référence de l'analyse « Heartcut », à celles (ii) de 3 opérateurs expérimentés utilisant un logiciel constructeur (MSD ChemStation) et à celles (iii) d'un logiciel libre de déconvolution (Amdis V2008). Une fois les spectres calculés par notre application, l'identification des composés volatils a été réalisée sur la base de leur similitude avec les spectres de référence et de la cohérence de leurs indices de rétention relatifs.

Pour la mise en pratique, nous avons analysé 3 zones de co-élutions complexes choisies dans le profil chromatographique d'un produit alimentaire (huile d'olive). Pour l'ensemble de ces 3 zones, nous avons considéré les 3 critères suivants : nombre de composés proposés et nombre de composés correctement identifiés (méthode manuelle avec 3 opérateurs, AMDIS ou notre logiciel) ainsi que le facteur de qualité des identifications. Lequel facteur ainsi que l'identification sont estimés par MSD ChemStation pour les trois méthodes utilisées. Les résultats ont montré que l'approche logicielle développée est prometteuse car elle présente systématiquement des performances supérieures à celles des opérateurs manuels ou à celles du logiciel AMDIS. Ses performances d'identification sont naturellement inférieures mais proches de celles obtenues après séparation physique de type « Heartcut » (GC-GC-MS). Ces résultats démontrent le potentiel de notre application interactive de traitement de signaux de chromatographie. Par son interactivité elle offre à l'opérateur l'accès aux informations pertinentes lui permettant de se consacrer à l'analyse qui conduira à une déconvolution optimale des pics de la zone étudiée du chromatogramme.

## **Développement d'une méthode d'analyse multirésidus d'organochlorés dans les sols par QuEChERS et GC/MS. Comparaison avec l'extraction ASE**

*Arnaudguilhem Carine • Buleté Audrey • Rouvière Florent*

*CNRS Service Central d'Analyse, Service Séparation et Spectrométrie de masse, Solaize, rance*

Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche portant sur la dépollution d'eaux et sols contaminés par des organochlorés aromatiques, substances persistantes bioaccumultrices et toxiques. L'objectif est de développer un procédé alternatif aux traitements actuels (adsorption sur charbon actif pour l'eau et excavation suivie de l'incinération pour les sols), basé sur la phyto épuration (dépollution par les plantes).

Notre étude porte sur le développement d'une méthode d'analyse multirésidus de 30 composés organochlorés appartenant à différentes familles chimiques, dans les sols par GC-MS. Cette méthode permet d'évaluer la quantité de contaminants piégés dans les sols et ainsi évaluer l'efficacité du procédé de dépollution.

Dans ce type de matrice, les extractions au Soxhlet [1], les extractions assistées par Ultrasons [2], Microondes (MASE) [1], ou par solvant (ASE) [3] sont les plus couramment reportées dans la littérature. Ici, nous avons comparé l'extraction ASE à une nouvelle méthode appelée QuEChERS. Cette méthode, initialement développée pour l'analyse des pesticides dans l'alimentation (fruits et légumes), est basée sur une extraction solide/liquide en milieu tamponné en une seule étape. Dans notre cas, nous l'avons appliquée à la matrice sol, et plus particulièrement à la tourbe.

Pour les 2 méthodes, les conditions d'extraction ont été optimisées : température, quantité d'échantillon, solvant... Nous obtenons des rendements d'extraction compris entre 60 et 87% avec l'ASE. Cependant, les conditions élevées de température et de pression ne permettent pas de récupérer les composés volatils.

A la différence, l'extraction par la technique QuEChERS permet de détecter et quantifier tous les composés, avec des rendements supérieurs à 70%. La linéarité a été vérifiée sur une gamme comprise entre 10 et 5000 ng/g, ainsi que la répétabilité et la reproductibilité de la méthode. Les limites de détection et quantification ont été estimées.

[1] Wang W., *Analytica Chimica Acta* 602, 211-222 (2007)

[2] Tor A., *Analytica Chimica Acta* 559, 173-180 (2006)

[3] Hubert A., *Anal. Chem* 72, 1294-1300 (2000)

## Développement et validation d'une méthode d'analyse de médicaments dans des invertébrés benthiques d'eau douce par nano chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

A. Buleté • R. Baudot • L. Wiest • C. Cren

Service central d'analyse du CNRS USR 059, Solaise, France

L'industrialisation et l'utilisation de produits chimiques dans la vie courante sont responsables de la dissémination dans l'environnement de substances très variées (médicaments, pesticides), pour lesquelles les conséquences sur l'environnement ne sont que progressivement mises en évidence. Un des enjeux majeurs des sciences environnementales aujourd'hui est d'évaluer le risque lié à la dispersion dans les écosystèmes de ces contaminants et leurs conséquences. Si quelques travaux ont tenté de mesurer des conséquences biologiques d'une exposition à différents contaminants organiques sur des invertébrés aquatiques d'eau douce (insecte, crustacé, cnidaire), peu de données, voire aucune n'est disponible quant à la contamination des invertébrés aquatiques benthiques des milieux, pourtant à la base de l'évaluation de l'état des écosystèmes. Ce manque d'informations s'explique notamment par l'absence de méthodologies analytiques adaptées aux matrices environnementales biotiques de très petite taille. L'objectif de cette étude est de développer une méthodologie analytique adaptée aux matrices environnementales biotiques de très petite taille et pesant seulement quelques centaines de microgrammes. La complexité et la très faible quantité de l'échantillon rendent d'autant plus délicates, aussi bien l'étape d'extraction que l'analyse proprement dite. En effet, les substances recherchées à l'état de traces dans des matrices complexes de si petite taille nécessitent la miniaturisation des techniques existantes et l'utilisation de technologies de pointe : la nano chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (nano-LC-nano-ESI MS/MS) qui permet d'augmenter la sensibilité des analyses, de diminuer ainsi les limites de détection et de pouvoir répondre à ces enjeux écotoxicologiques. Dans ce contexte, nous avons choisi de développer une méthode permettant l'analyse de molécules retrouvées dans l'environnement au niveau des sédiments et des eaux de surface et potentiellement bioaccumulables : un antidépresseur inhibiteur de la recapture de la sérotonine (la fluoxétine) et un médicament anti-convulsif (la carbamazépine) dans deux mollusques gastéropodes modèles : le prosobranch parthénogénétique *Potamopyrgus antipodarum* et hermaphrodite *Valvata piscinalis*.

Une des étapes clé de ces analyses reste la préparation des échantillons, aussi avons nous optimisé cette étape en comparant différentes techniques d'extraction : la méthode QuEChERS [1] dans une «version miniaturisée» avec ou sans étape de purification par SPE dispersive, une extraction sur résine avec ou sans étape de purification par SPE dispersive. Après optimisation, la méthode d'extraction la plus efficace, simple et rapide est basée sur la méthode «micro-QuEChERS» sans étape de purification par SPE dispersive et est réalisée à partir d'une dizaine de milligrammes de matrice dans 500µL d'un mélange acétonitrile:eau:hexane (50/20/30) et 100mg de tampon citrate. Les rendements d'extraction obtenus sont de 86% pour la carbamazépine et 87% pour la fluoxétine. La stratégie analytique adoptée ensuite est basée sur l'analyse nano-LC-nano-ESI MS/MS, avec une détection réalisée en mode MRM avec l'utilisation d'une source NanoSpray. La validation a permis de déterminer que la méthode est robuste pouvant atteindre des limites de détection compatibles avec la recherche de contaminants environnementaux. Pour la carbamazépine et la fluoxétine, la LOD est respectivement de 4 ng/g et de 30 ng/g pour une prise initiale d'une dizaine de milligrammes de matrice.

Grâce aux limites de détection atteintes, cette méthodologie a été appliquée avec succès à l'analyse des différents gastéropodes qui ont été exposés à différentes concentrations de fluoxétine (11, 33 ou 100 µg/L) pendant 7 et 14 jours. Ces gastéropodes ont montré des différences significatives de réponse à la fluoxétine (malformation des gonades...) L'examen des résultats obtenus en nano-LC-nano MS/MS montre une bioconcentration plus importante pour l'espèce la plus sensible à la fluoxétine (*Potamopyrgus antipodarum*). Dans un contexte de contamination des organismes vivants, la méthode d'analyse élaborée est un outil analytique fiable permettant l'évaluation de la bioaccumulation de médicaments. De plus, la méthode, développée à l'échelle d'un individu permet d'envisager une intégration des données dans une approche métabonomique permettant de caractériser et de paramétrer la diversité des réponses biologiques obtenues.

Remerciements au CNRS pour le financement de ce projet et au Cemagref

PI-004

## Analyse Quantitative et confirmation de la présence de migrants dans les emballages alimentaires

*Philippe Tourelle • Gilles Jarry • Impress Metal Packaging, La Fleche, France*

*Cécile Busset • AB SCIEX, Les Ulis, France • Stephen Lock • AB SCIEX, Warrington, Royaume-Uni.*

La récente augmentation du nombre de matières et de substances utilisées dans les emballages alimentaires implique une surveillance accrue, afin de s'assurer que ces composés ne migrent pas vers la nourriture.

Une méthode LC/MS/MS avec un 3200 QTRAP® a été développée pour détecter trois composés : l'ITX, (un mélange de deux isomères 2-Isopropylthioxanthone et 4-Isopropylthioxanthone), l'Irgacure [Irgacure 819 ou Phenylbis(2,4,6-triméthylbenzoyl)phosphine oxide], tous deux utilisés en tant que photo-initiateurs dans les encres traitées avec des UV et le TRP [Tri(propylène glycol) diacrylate] contenu dans les encres.

La séparation chromatographique a été effectuée avec une colonne Hypersil BDS de diamètre 2.0 mm et de porosité 5 µm avec un gradient de phases mobiles composées d'acétonitrile et d'acide Formique. Les échantillons réels ont été extraits avec de l'acétonitrile. L'identification des composés est basée sur la recherche en bibliothèque des spectres de masses [bibliothèque créée avec des analyses MRM-EPI (Enhanced Product Ion) de solutions standards].

Les résultats de quantification présentés comportent la calibration et la linéarité pour les trois composés, et les pourcentages de reproductibilité pour les points bas de concentration sont indiqués. Les limites de détection sont inférieures ou égales à 0,5 ng/mL et les coefficients de variation sont inférieurs à 10%. L'utilisation de la bibliothèque de spectres, composée de spectres EPI acquis avec trois énergies de collision différentes, confirme la détection de ces trois composés dans les échantillons réels.

La méthode LC/MS/MS développée pour l'extraction, la détection et la quantification de ces trois migrants potentiels montre une bonne précision. Les fonctionnalités du 3200 QTRAP® permettent d'obtenir simultanément des données quantitatives et qualitatives en une seule injection.

## Analyses de traces et d'ultra-traces de 29 perturbateurs endocriniens dans des eaux et sédiments de rivières par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

J. Camilleri • C. Cren-Olive • E. Vullet • R. Baudot • L. Wiest

Service Central d'Analyses du CNRS – USR 59, Solaise

De nombreux pays montrent un intérêt croissant pour l'identification et la quantification de nombreux xénobiotiques et polluants résultants de l'activité humaine présents dans l'environnement, notamment les perturbateurs endocriniens. Plusieurs études montrent des troubles du comportement [1], une diminution de la fertilité [2] ou bien encore des malformations de naissances dues à ces perturbateurs endocriniens. La majeure partie de ces molécules sont listées comme polluants émergents par l'Union Européenne [4], [5]. Ces molécules présentant des propriétés physico-chimiques très différentes et étant de structures chimiques variées, leur surveillance dans l'environnement requièrent le développement de méthodes de détection et de quantification sensibles et précises. La plupart des méthodes d'analyses existantes ne ciblent qu'une ou deux familles de perturbateurs endocriniens tels que les stéroïdes, les pesticides ou les alkylphénols [6], [7], [8], ne représentant pas l'état de pollution global des milieux. Ceci montre l'intérêt et la nécessité de méthodes d'analyses multi-résidus faisant appel à une détection par un triple-quadrupole, permettant de quantifier des traces de polluants appartenant à plusieurs familles de perturbateurs endocriniens en une seule analyse. Cette méthode doit de plus nécessiter un minimum d'étapes de préparation, sans perdre en sélectivité et en sensibilité.

L'objectif de cette étude est de mettre en place une méthode d'analyse par chromatographie liquide et détection en spectrométrie de masse permettant d'effectuer un état des lieux et une surveillance de la pollution des milieux aquatiques par une sélection de 29 perturbateurs endocriniens de familles différentes. Cette méthode fait appel à une extraction en phase solide (SPE) en ligne pour les phases aqueuses et extraction assistée par solvants (ASE) pour les sédiments avant de procéder à une analyse et une quantification par LC/MS-MS. Les molécules d'intérêt ont été sélectionnées parmi les listes de polluants prioritaires [4], [5] et les composés connus ou supposés à effets perturbateur endocrinien : 6 hormones (œstrone, 17β-œstradiol, acétate de mégestrol, progestérone, testostérone et tamoxifène), 16 pesticides (acide 2,4-dichlorophenoxyacétique, acétochlore, alachlore, atrazine, carbendazime, diuron,

iprodion, linuron, prochloraz, thiram et ziram), 1 filtre UV (4-méthylbenzylidène camphre), 5 alkylphénols (tert-butylphénol, n-octylphénol, tert-octylphénol, n-nonylphénol et 4-para-nonylphénol), 3 composés phénoliques (2,4-dichlorophénol, bisphénol A et résorcinol) ainsi que 3 composés pharmaceutiques utilisés comme indicateurs de pollution globale des milieux (3,4-dichloroaniline, carbamazépine et diclofénac). La méthode d'extraction SPE en ligne a été optimisée en comparant la capacité de concentration de plusieurs phases ainsi que les différentes géométries et granulométries disponibles. L'extraction des sédiments par ASE a été développée en réalisant un plan d'expérience étudiant l'influence du solvant d'extraction, de la température, du temps statique, de la pression et du nombre de cycles. La détection réalisée par un spectromètre de masse de type triple-quadrupole en mode MRM permet des limites de détections et de quantifications de l'ordre du ng/L et du ng/g.

[1]. S. S. Madsen, Søren Skovbolling, Christian Nielsen and Bodil Korsgaard, *Aquatic Toxicol.*, 68, 109 (2004)

[2]. A. Güvercin, L. Rylander and Y. Lindberg Güvercin, *Reprod Biomed Online*, 15, 633 (2007)

[3]. D. M. Schreinemachers, *Environmental health perspectives A*, 111, 1259 (2003)

[4]. *Communication de la commission au conseil et au parlement européen sur la mise en oeuvre de la stratégie communautaire concernant les perturbateurs endocriniens COM (2001) 262 final*

[5]. *European commission DG ENV, Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption, hkb-annex 15*

[6]. J. B. Baugros, B. Giroud, G. Dessalces, M. F. Grenier-Loustalot and C. Cren-Olivé, *Analytica Chimica Acta*, 607, 191 (2008)

[7]. S. Barrek, C. Cren-Olivé, L. Wiest, R. Baudot, C. Arnaudgüllhem and M. F. Grenier-Loustalot, *Talanta*, 79, 712 (2009)

[8]. J. B. Baugros, C. Cren-Olivé, B. Giroud, J. Y. Gaurrit and M. F. Grenier-Loustalot, *J. Chromatogr. A*, 1216, 4941 (2009)

## Dosage d'acrylamide à l'état de trace dans les aliments frits

*J. Bassama • Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Département PERSYST, UMR QualiSud, TA B-95/16, Montpellier • Z. Gümata • UMR QualiSud, Univ. Montpellier • C. Enjalbal • Laboratoire de Mesures Physiques, Service commun de l'Univ. Montpellier 2, Plateau technique des l'institut des biomolécules Max Mousseron • G. Cazals • Labo. de Mesures Physiques, Service commun de l'Univ. Montpellier 2, Plateau technique des l'institut des biomolécules Max Mousseron*

En 2002, la découverte de l'acrylamide, par une équipe suédoise, dans différents aliments cuits à haute température[1] fut le point de départ de recherches très intenses. En effet cette petite molécule polaire qui se présente sous la forme d'une poudre cristalline incolore et inodore, principalement soluble dans l'eau et l'éthanol, est connue pour ses propriétés neurotoxiques et une activité carcinogène potentielle chez l'Homme. Les premières études se sont attelées à l'identification des voies de formation de l'acrylamide, à la mise au point de méthodes analytiques fiables pour le dosage de celui-ci, afin de déterminer les paramètres technologiques permettant de baisser sa teneur dans les produits finis. Ainsi, de nombreuses études ont déterminé la présence d'acrylamide dans de multiples aliments de la vie courante : pain, café, pommes de terre frites, céréales, amandes grillées, etc. Il est cependant à noter que des données manquent, à ce jour, sur les produits alimentaires tropicaux. C'est le cas, par exemple, de la banane plantain dont la consommation est courante dans les pays d'Afrique centrale, d'Amérique latine et d'Asie du sud-est. C'est l'un des aliments les plus consommés sous forme frite.

C'est dans ce contexte scientifique que le développement d'une méthode de dosage de l'acrylamide dans les produits frits à base de plantain a été entrepris. Cette méthode qui se veut efficace, robuste et facile à mettre en œuvre devrait permettre une étude visant à déterminer des conditions de friture minimisant la formation d'acrylamide.

Avant 2002, il existait des méthodes de dosage de l'acrylamide dans les champignons ou les céréales[2]. Cependant, ces techniques n'étaient pas adaptées à l'analyse de matrices plus complexes comme les aliments cuits à haute température. Depuis 2002, de nouvelles méthodes dont l'analyse par GC-MS ou par LC-MS ont été développées pour quantifier l'acrylamide dans ces matrices beaucoup plus complexes[3,4]. Si les méthodes GC ont été les premières à être développées, aujourd'hui les méthodes LC-MS ont pris le pas, car faisant l'économie de l'étape de dérivatisation chimique (Bromination). La méthode que nous avons développée consiste donc en une analyse directe par HPLC couplée à une détection par spectrométrie de masse API-QqQ

en mode suivi de transitions et dilution isotopique. Pour cela, un traitement de l'échantillon a été mis en œuvre consistant en plusieurs étapes d'extraction puis passage sur cartouche SPE. La séparation s'effectue par HPLC en phase inverse en utilisant une colonne ATLANTIS (Waters) qui est une colonne de type C18 qui a la capacité de retenir les petites molécules très polaires lors d'une élution en mode isocratique avec 100% d'eau. Les tests d'ionisation par electrospray (ESI) de l'acrylamide en mode positif ont donné des résultats tout à fait satisfaisants et l'utilisation d'un analyseur triple quadripôle (QqQ) nous permet de travailler en suivi de transition (MRM) afin d'obtenir les meilleures sensibilités et spécificités possibles sur l'analyte et l'étalon interne qui est de l'acrylamide marqué trois fois par le deutérium (H3-Acrylamide). Avec une détection des deux composés en mode MRM et une linéarité vérifiée des résultats, la méthode mise au point permet ainsi le dosage de traces. (LOD : 10 ppb, LOQ : 50 ppb).

[1] Swedish National Food Administration (SNFA). Information about acrylamide in food. <http://www.slv.se>, 24 April 2002.

[2] Castle, L. J. *Agric. Food Chem.* 1993; 41, 1261

[3] Yu Zhang, *Journal of Chromatography A*, 1075 (2005) 1-21

[4] Yu Zhang, *Chem. Rev.* 2009, 109, 4375-4397

## Spéciation des composés silicés par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS) appliquée aux produits pétroliers

F. Chainet(1) • C-P. Lienemann(1) • M. Courtiade(1) • J. Ponthus(1) • O. F. X. Donard(2)

(1)Direction Physique et Analyse, IFP-Lyon, Vernaison - France • (2)LCABIE, CNRS UMR 5034, Univ. de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France

L'origine du Silicium dans les produits pétroliers provient de l'ajout d'antimousse en amont des différents procédés d'extraction et de raffinage du pétrole brut [1]. Ces polymères silicés (Polydiméthylsiloxane, PDMS) ont pour but d'éviter les émulsions formées dans les charges à raffiner. Néanmoins, à cause de la température élevée (>300 °C) et des différentes conditions (eau, oxygène, impuretés...) imposées dans les procédés, ces polymères silicés se dégradent. En effet, ils forment une multiplicité de molécules siliciées peu connues à des teneurs très faibles comprises entre 1 ppb et 40 ppm de Si. Les principaux composés formés sont des siloxanes cycliques et linéaires, des silanols et des silanes. Cependant, en raison des températures élevées, la présence de radicaux associés à la réactivité de certains composés silicés peut contribuer à la formation de molécules supplémentaires inconnues.

Le Silicium est le quatrième poison retrouvé sur les catalyseurs d'hydrotraitement de retours industriels à base de Palladium (Pd) [2]. Ces différents composés vont s'adsorber sur le catalyseur et engendrer une perte d'activité irréversible de ce dernier, entraînant son remplacement prématuré. L'objectif de ce travail est donc de déterminer la nature des molécules responsables de l'empoisonnement des catalyseurs. En effet, aucune étude de spéciation du Si n'a été réalisée dans le domaine pétrolier. Une des voies possibles est leur identification et quantification par GC/MS [3-5].

Ainsi, cette étude présentera la spéciation de plusieurs composés silicés dans une matrice pétrolière par GC/MS en mode SIM (Single Ion Monitoring). Des problèmes de contamination relatifs à la formation de siloxanes cycliques (Dn) seront mis en évidence. Il en ressort que cette contamination provient majoritairement des septa utilisés (vials de stockage et injecteur) mais également du bleeding de la colonne capillaire. La mise en place respective de septa de vials sans silicone et d'un système de vanne Merlin lors de l'injection permettra de minimiser la pollution observée.

D'après la littérature et les retours industriels, un mélange test de 22 molécules, potentiellement présentes dans les coupes pétrolières, a été élaboré puis analysé par GC/MS en mode Full Scan (FS) et SIM. Le recours à ce second mode de détection permet

d'améliorer considérablement le rapport Signal sur Bruit (S/N) et donc les limites de détection (LOD), d'obtenir une meilleure résolution du pic chromatographique et également d'être sélectif par rapport aux espèces chimiques d'intérêt. Des LOD de l'ordre du ppb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) seront présentées. A la suite de cette étape, des gammes de linéarité de 5 à 100 ppb ont été obtenues grâce à un étalonnage interne dans le but de pouvoir quantifier ces molécules dans les matrices pétrolières. Le dopage d'un naphtha sans silicium par certains composés étudiés pour vérifier l'effet de matrice et appliquer cette méthode sur des échantillons réels (Naphtha, Essence...) sera également discuté dans cette présentation.

Ces travaux apportent donc des résultats inédits dans le domaine de l'analyse pétrolière et de la spéciation du Si. En effet, la méthode GC/MS en mode SIM mise en place rend possible la détection et la quantification des produits silicés à l'état de traces dans les produits pétroliers afin de comprendre l'empoisonnement des phases catalytiques.

[1]Kremer L.N and Hueston T.G. *Foam Control methods in delayed cokers. Petroleum Technology Quarterly*, 65, 2002.

[2] Didillon, B., Cosyns, J., Cameron, C., Uzio, D., Sarrazin, P., Boitiaux, J.P., *Industrial evaluation of selective hydrogenation catalyst poisoning, Catalyst Deactivation*, 1997, 111, p. 447.

[3] Flassbeck, D., Pfeleiderer, B., Grumping, R., Hirner, A.V., *Determination of low molecular weight silicones in plasma and blood of women after exposure to silicone breast implants by GC/MS, Analytical Chemistry*, 2001, 73, p. 606.

[4]Horii, Y., Kannan, K., *Survey of organosilicone compounds, including cyclic and linear siloxanes, in personal-care and household products, Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 55, p. 701.

[5]Varaprath, S., Lehmman, R.G., *Speciation and quantification of degradation products of silicones (silane/siloxane diols) by gas chromatography mass spectrometry and stability of dimethylsilanediol, Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1997, 5, p. 17.



## Comparaison des extractions MEPS et SPE pour la quantification par LC-MS/MS d'androgènes et d'oestrogènes sous forme libres et conjugués dans du sérum de rat

M.Tournier • C. Pouech • A. Kiss • F. Lafay • R. Baudot • L. Wiest • M.-M. Flament-Waton • C.Cren-Olivé

Service central d'analyse du CNRS USR 059, Solaize, France

La réglementation REACH a pour objectif d'améliorer le niveau de protection de la santé et de l'environnement. Ainsi, depuis le 1er juin 2007, les substances sont classées selon leurs propriétés physico-chimiques, toxicologiques et environnementales. Leur pouvoir de bioaccumulation, leur persistance dans l'environnement, ou encore leur toxicité pour la reproduction sont alors étudiés. Dans ce sens, certaines substances sont qualifiées de perturbateurs endocriniens. Ce terme désigne en fait des substances qui interfèrent avec les fonctions du système hormonal. Selon REACH, ces substances sont considérées comme des substances extrêmement préoccupantes du fait de leur toxicité pour la reproduction. Ainsi, certains composés tels que le bisphénol A, l'atrazine, la vinclozoline ou encore l'HPTE sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens. Afin d'étudier directement ces derniers, des études sont menées pour établir une relation de causalité entre l'exposition aux perturbateurs endocriniens et certaines maladies.

Dans ce contexte, en collaboration avec l'INERIS (Institut National de l'Environnement industriel et des RISques), l'impact de ces perturbateurs endocriniens (bisphénol A, atrazine, vinclozoline, HPTE) sur le système hormonal est étudié par la mesure in vivo de la balance androgènes / oestrogènes. Pour cela, les fractions libres et les fractions conjuguées des hormones sexuelles dans le sérum sont détectées et quantifiées par LC-MS/MS. Les molécules recherchées sont alors la testostérone (T) et l'androstènedione (A) pour les androgènes, l'oestrone (E1) et la 17- $\beta$ -oestradiol (E2) pour les oestrogènes ainsi que les métabolites sulfo- et glucuro-conjugués de ces derniers. De plus, les pesticides auxquels sont exposés les espèces d'études (rats adultes mâles et femelles) sont aussi dosés pour établir la relation de causalité supposée. Deux techniques d'extraction ont alors été développées : la première innovante permet de minimiser les quantités de matrice et solvants, il s'agit des MEPS (C18) (Micro-Extraction sur Phase Solide) et la seconde plus classique, la SPE (Oasis HLB). Le choix de la méthode d'extraction repose sur divers critères, à savoir, les rendements, la linéarité, la LOD-LOQ et l'effet matrice. Les deux techniques permettent de travailler sur une large gamme de linéarité (de 1 à

2000 ppb) et présentent des LOD allant de 0,2 à 1 ppb et des LOQ de 1 ppb à 20 ppb. Des rendements de 60% à 84% ont été obtenus sur SPE pour tous les composés, les résultats sont similaires avec les MEPS à l'exception des métabolites conjugués (13 à 40 %). Afin de pouvoir étudier sélectivement ces métabolites glucuronidés et sulfatés, de nouvelles phases MEPS devront être développées. Les effets de matrice constatés sont corrigés par étalonnage interne. Cette comparaison permet donc de choisir la méthode d'extraction optimale par SPE, fiable et répétable, qui sera appliquée aux 400 échantillons de sérum de rats adultes.

## Développement d'une méthode associant l'extraction accélérée par solvant (ASE) à l'U-HPLC-APCI-MS/MS pour le dosage des Amines Aromatiques Hétérocycliques formées lors de la cuisson des viandes

S. Chevolleau • I. Mourahib • E. Jamin • L. Debrauwer

INRA UMR 1089 Xenobiotiques, INRA-ENVT, Toulouse

Les Amines Aromatiques Hétérocycliques (AAHs) sont des substances dont les propriétés mutagènes et cancérogènes sont connues chez les rongeurs. Certaines d'entre elles sont également suspectées d'être cancérogènes pour l'homme. A ce jour, plus d'une vingtaine d'AAHs ont été caractérisées à des concentrations de l'ordre du ng/g (ppb) dans la plupart des viandes cuites dans des conditions normales de temps et de température de cuisson. Celles-ci sont réparties en plusieurs familles, qui présentent à la fois des structures chimiques, des propriétés physico-chimiques ainsi que des mécanismes de formation différents [1].

Lors de précédents travaux [2,3], nous avons développé une méthode de quantification par LC-APCI-MS/MS pour la détermination de dix AAH dans différentes viandes cuites, et cette méthode a été utilisée dans le cadre de travaux visant à modéliser la formation des AAH lors du chauffage des viandes [4,5]. Dans le présent travail, nous présentons plusieurs améliorations apportées à la méthode en tirant parti d'une part de l'extraction accélérée par solvant (ASE) et d'autre part des performances de l'U-HPLC alliées à l'acquisition par spectrométrie de masse en tandem en mode MRM sur un instrument triple quadripolaire.

En premier lieu, le protocole d'extraction ASE a été optimisé de façon à obtenir un taux de récupération maximum pour chacune des AAH considérées. Outre les aspects rendement d'extraction, la répétabilité et le gain de temps d'analyse sont également des critères importants à mettre à l'avantage de l'extraction ASE par rapport à l'extraction liquide-liquide classique [3].

La méthode de dosage par LC-MS/MS utilise l'ionisation APCI en mode positif, en se basant sur deux transitions spécifiques pour chacune des AAH (une transition de quantification et une transition de confirmation), avec le TriMeIQx comme standard interne. La séparation U-HPLC est réalisée sur une colonne de type C8 (50 x 2 mm, 1,9µm) avec un gradient d'éluion AcONH4 (30 mM, pH 5) - ACN/MeOH (2/1) à un débit de 0,5 ml/min en utilisant le programme de transposition de conditions chromatographiques développé par l'équipe J.L. Veuthey [6]

La nouvelle méthode permet de réaliser la détermination

quantitative de 12 AAH avec un gain de temps d'analyse d'un facteur 5.

Les performances de la méthode en termes de répétabilité, linéarité et sensibilité ont été étudiées en considérant en particulier les effets matrices pouvant être engendrés par les modifications du protocole de préparation d'échantillon.

[1] M. Murkovic, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2004) 777-785.

[2] S. Chevolleau et al., 23èmes JSFM Nantes, 11-14 Sept 2006, P113.

[3] S. Chevolleau et al., *Sci. Aliments* 27 (2007) 381-395.

[4] A. Konjoyan et al., *Food Chem.* 119 (2010) 19-26.

[5] A. Konjoyan et al., *Food Chem.* (2010) sous presse.

[6] D. Guillardie et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 68 (2008) 430-440

## Application de la LC/MS/MS et du Scheduled MRM à l'Analyse Multi-Résidus de 70 Pesticides dans l'Huile Essentielle de Lavandin

Fillâtre Y(1,2) • Communal P-Y(1,2) • Jadas-Hécart A(2) • Daguin A(1) • Bonnet B(3) • Rondeau D(4)

(1)GIRPA, Beaucauzé • (2)Univ. d'Angers • (3)L'Oréal Recherche, Aulnay-sous-bois, France • (4)Univ. de Bretagne Occidentale, UMR 6521, Brest

De nos jours, environ 3000 huiles essentielles sont produites et utilisées dans le monde avec des champs d'application aussi variés que la cosmétique, la parfumerie l'agro-alimentaire, la pharmacie et l'aromathérapie. Ces huiles sont extraites des hespéridés ou des plantes aromatiques et médicinales (PPAM) soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Étant donné que la culture de ces matières premières implique généralement l'application de pesticides, la présence de tels résidus dans les huiles essentielles est très probable. En considérant le nombre important de pesticides pouvant être employés et les nombreux champs d'application des huiles essentielles, il apparaît nécessaire de développer une méthode multi-résidus de pesticides dans les huiles essentielles.

Cependant, contrairement aux matrices telles que l'eau, les légumes ou les fruits pour lesquelles des méthodes multi-résidus sont largement décrites dans la littérature, ils n'existent que quelques publications concernant l'analyse des pesticides dans les huiles essentielles. Le manque de performance aussi bien en termes de nombre de pesticides analysés que dans les limites de détection peut s'expliquer, au moins en partie par la complexité de la matrice. Les huiles essentielles sont en effet de nature apolaires, rendant très difficile la concentration ou la séparation de pesticides de la matrice.

Ce problème peut aujourd'hui être surmonté grâce aux récentes avancées technologiques en spectrométrie de masse. Des améliorations considérables en termes de sensibilité et de vitesse d'acquisition donnent désormais la possibilité de détecter de nombreux composés (300 et même plus) en un seul run LC en atteignant de très bonnes limites de quantification. Les capacités de ces nouveaux spectromètres de masse permettent de limiter les étapes de préparation de l'échantillon à une dilution.

L'approche « dilution-injection » a été appliquée à l'analyse de pesticides dans l'huile essentielle de lavandin. Les analyses ont été effectuées avec un système LC/MS/MS API 4000 QTrap équipé d'une source d'ionisation opérant en électrospray. Le screening a été réalisé avec un nouvel algorithme d'acquisition appelé « Scheduled MRM » qui permet d'enregistrer les

transitions MRM seulement autour du temps d'élution attendu de l'analyte, améliorant ainsi les performances du mode MRM classique. La faisabilité de la méthode a été évaluée dans l'huile essentielle de lavandin sur 70 pesticides prioritaires appartenant à diverses familles chimiques. Les résultats obtenus sont concluant puisque tous les pesticides admettent des LQs inférieures à 20 µg/L dont 75% inférieures à 5 µg/L.

## Dosage des adduits à l'ADN formés par une amine aromatique polycyclique (PhIP) présente dans les viandes cuites

Emilien Jamin • Marc Audebert • Jérôme Molina • Laurent Debrauwer

Les amines aromatiques polycycliques (AAH) sont des produits néoformés lors de la cuisson de viandes et présentent un risque potentiel de sécurité chimique des aliments. Parmi la vingtaine d'AAH aujourd'hui connue et présente à l'état de traces dans les matrices alimentaires, PhIP est particulièrement étudié en raison de ses propriétés biologiques et de ses quantités retrouvées dans les aliments cuits. PhIP qui est formé à partir de créatinine et de phénylalanine, est l'une des AAH majoritaires dans les viandes cuites (1) et possède des propriétés cancérigènes avérées chez les animaux de laboratoire. Cependant, pour présenter son caractère génotoxique, PhIP doit être métaboliquement activé sous forme de N-hydroxylamine estérifiée pouvant ensuite conduire à la formation d'un adduit covalent avec une des bases de l'ADN (2). La quantification des adduits à l'ADN par HPLC-MS/MS représente un des outils disponibles pour évaluer la génotoxicité d'une substance, d'autant plus si les résultats de ce dosage sont associés à des données obtenues par d'autres méthodes, comme l'analyse de la phosphorylation de l'histone H2AX par exemple, qui peut nous informer sur la quantité de cassures du double brin d'ADN.

Des lignées cellulaires modèles d'épithélium de colon murin ont été utilisées au cours de cette étude. Ce modèle in vitro implique d'une part des cellules du colon qui est un organe cible pour PhIP, et d'autre part un ADN muté ou non sur le gène *apc* qui est l'une des mutations impliquées dans le cancer colorectal humain. Outre l'incubation de ce modèle biologiquement pertinent avec PhIP, l'incubation d'un mélange PhIP / B[a]P a été réalisée afin d'étudier les effets d'une telle association entre une AAH et un hydrocarbure aromatique polycyclique comme le benzo[a]pyrène. Suite aux incubations, l'ADN a été extrait et digéré en désoxynuclosides selon un protocole précédemment développé (3). Les adduits dG-C8-PhIP ont ensuite été quantifiés par HPLC-MS/MS. La séparation des adduits et des bases non modifiées a été réalisée à l'aide d'une colonne chromatographique XTerra C18 (150x2,1mm) 3,5µm (Waters) et de phases mobiles composées de méthanol/eau et acidifiées avec 0,2% d'acide acétique. Le mode d'ionisation par Electrospray en mode positif a été utilisé sur un spectromètre de masse à triple

quadripôle TSQ Quantum Discovery Max (Thermo Scientific). La quantification de l'adduit dG-C8-PhIP a été réalisée en mode SRM par acquisition du signal correspondant à la perte du désoxyribose.

La méthode HPLC-MS/MS développée a permis d'atteindre une limite de détection (S/N>3) équivalente à 3 adduits pour 10<sup>8</sup> bases non modifiées et une limite de quantification (S/N>10) de 1 adduit pour 10<sup>7</sup> bases non modifiées. Une calibration externe a été utilisée présentant un coefficient de régression linéaire supérieur à 0,995, une variabilité relative de mesure inférieure à 5% (intra et inter-day à J+3) et une exactitude supérieure à 96% (n=3). Les incubations de 24h réalisées en triplicat ont impliqué 4 doses de PhIP (1, 10, 30 et 100 µmol/L), et 1 mélange PhIP / B[a]P (10 / 1 µmol/L). Les résultats obtenus sur la lignée *apc* mutante (*apc*Min/+) et non mutante (*apc*+ /+) ont montré une évolution dose / réponse non linéaire et un nombre d'adduits plus important dans les échantillons *apc*Min/+ en accord avec l'activation métabolique (4). De manière intéressante, l'étude du mélange PhIP / B[a]P a montré une induction du nombre d'adduits formés par PhIP. Enfin, tous ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le test de génotoxicité impliquant H2AX qui met en évidence les cassures double brin issues des processus de réparation de l'ADN.

1. Kondjoyan A, Chevolleau S, Grève E, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V, Bruel S, Touzet C, Portanguen S, Debrauwer L, *Food Chemistry* (2010) 119, 19-26

2. Jamin EL, Arquier D, Canlet C, Rathabao E, Tulliez J, Debrauwer L, *J Am Soc Mass Spectrom* (2007) 18, 2107-2118

3. Ravanat JL, Douki T, Duez P, Gromaud E, Herbert K, Hofer T, Lasserre L, Saint-Pierre C, Favier A, Cadet J, *Carcinogenesis* (2002) 23, 1911-1918

4. Bellocq D, Molina J, Rathabao R, Canlet C, Taché S, Martin PGP, Pierre F, Paris P, *Mutat Res* (2008) 653, 34-43

## **Comparative study of liquid chromatography coupled to tandem or high resolution mass spectrometry on triple quadrupole, quadrupole-time-of-flight and Orbitrap devices for measuring perfluorinated contaminants in fish**

H. Kadar(1) • B. Veyrand(1) • J.-P. Aantignac(1,2) • S. Durand(1) • P. Marchand(1) • B. le Bizec(1)

(1)ONIRIS, USC 2013-Laberca, Atlanpole, Nantes • (2)INRA, Nantes

Perfluorinated compounds (PFCs) are emerging contaminants that focused high interest from the international scientific community. These chemicals are characterized by a hydrophobic carbon chain fully substituted by fluorine atoms, and a hydrophilic moiety (sulfonic acid, carboxylic acid...). These substances of entropic origin are synthesized since half a century and are present in a wide range of commercialized products for their stain, oil repellent and surfactant properties. Perfluorinated contaminants (PFCs) are usually monitored by high performance liquid chromatography (LC) coupled to tandem mass spectrometry (MS) on triple quadrupole instruments. Although not yet widely implemented in the field, high resolution mass spectrometry appears as a valuable alternative for these halogenated chemicals presenting a significant mass default. Moreover, this last option represents a way to face with particular matrix effects caused by co-eluting and isobaric interferences affecting the measurement of some PFCs in fish. The present study have compared three different LC-MS related instruments and various signal acquisition modes, from low resolution full scan and selected ion monitoring acquisition on triple quadrupole (QqQ) to high resolution full scan or daughter scan acquisition on orbital trap (LTO-Orbitrap) or quadrupole-time-of-flight (Q-TOF). Performances have been compared for 26 target PFCs compounds belonging to 7 sub-classes (5 perfluoroalkylsulfonates, 11 perfluoroalkylcarboxylic acids, 1 perfluoroalkylsulfonates, 1 perfluoroalkylsulfonamide, 3 fluorotelomers saturated acids, 3 fluorotelomers unsaturated acids, 3 perfluoroalkylphosphonic acids). Globally, the high stability of PFCs lead to a relatively poor and non specific fragmentation pathway. The presence of biliary acid interfering compounds (e.g. taurochenodeoxycholic acid) in fish sample was found particularly disturbing in low resolution MS/MS due to the same retention time and diagnostic signals than PFOS, leading to an overestimation of the PFOS quantification with triple quadrupole in SRM mode. On the other hand, the same device was found unsurprisingly reliable for extended multiresidus monitoring. Conversely, high resolution instruments provided clearly better results in terms of signal specificity, with finally higher sensitivity.

However, the orbital trap suffers from a low scanning rate limiting its real and incomparable efficiency to the full scan acquisition mode, while the Q-TOF appears as a compromise in terms of specificity / sensitivity balance. Finally, the estimated instrumental limit of detections reached for PFOS on QqQ, QTOF and LTO-Orbitrap devices are 1.5, 0.6 and 0.2 pg injected, respectively.

## Mesures quantitatives absolues par ionisation chimique couplée à la FTICR-MS

J. Leprovost(1) • P. Leparloner(2) • C. Mayoux(2) • J. Lemaire(3) • H. Mestdagb(3) • M. Heninger(1)

(1)AlyXan, Université Paris Sud, Orsay • (2)SETARAM, Caluire, France • (3)Laboratoire de Chimie Physique, Université Paris Sud-11, Orsay

L'analyse quantitative d'un échantillon est un aspect fondamental de la mesure, imposée par des normes de plus en plus contraignantes, à laquelle un instrument d'analyse doit savoir répondre.

La grande majorité des techniques analytiques actuelles s'appuie pour cela sur un "référentiel" auquel la mesure est comparée. Ces techniques, dites "par calibration", se confrontent à d'importants inconvénients :

- "Le référentiel" est dans la plupart des cas, un étalon dont la composition (nature et quantité de chaque constituant) est parfaitement connue. Ces étalons sont coûteux et souvent difficiles à générer.

- Leur composition peut évoluer dans le temps et n'est garantie que pour une durée définie, entraînant à terme un biais dans la mesure quantitative de l'analyseur.

La chimie analytique a connu d'importants progrès ces dernières années en ce qui concerne les méthodologies mises en œuvre pour la détection, l'identification et la quantification d'une grande variété de composés sur une large gamme de concentration avec un temps de réponse court. Dans ce domaine, la spectrométrie de masse joue un rôle important.

Nous présenterons ici l'apport des spectromètres de masse FTICR transportables, basés sur l'utilisation de méthodes douces et sélectives d'ionisation chimique, pour réaliser des mesures quantitatives absolues de composés en temps réel, sans nécessiter de calibration préalable.

La FTICR présente l'avantage d'être une technique "large bande" en piège, permettant de mettre en place des réactions ion-molécule. Des méthodes d'ionisation douces telles que le transfert de charge ou de proton (PTR) est alors possible. Ces techniques rendent possible une quantification directe des molécules détectées. Parmi les réactions ion-molécule utilisées, la PTR à partir de l'ion  $H_3O^+$  est particulièrement adaptée pour la mesure de polluants organiques présents dans l'air, l'eau...

La mesure quantitative repose alors sur la cinétique de réaction entre les analytes recherchés et l'ion précurseur  $H_3O^+$ . Moyennant la connaissance des paramètres expérimentaux tels que la pression d'échantillon introduite dans le spectromètre, le temps de réaction ainsi que la constante de vitesse de réaction

entre les analytes et l'ion précurseur, une mesure absolue en ppm v/v (mol/mol) peut être obtenue à partir d'un seul spectre de masse.

La majeure partie de l'incertitude liée à ces mesures est rattachée à la détermination de la constante de vitesse et peut être de  $\pm 25\%$ . Nous décrirons nos efforts pour la réduction de cette incertitude en déterminant ces constantes expérimentalement, dans des conditions bien définies.

Le potentiel de cette information associée à une technique de mesures "large bande" et "temps réel" reste néanmoins important dans des domaines variés tels que :

- La sécurité : quantification rapide d'une menace chimique comme outil décisionnel avant une mesure plus précise en laboratoire.

- Les matériaux : quantification de l'ensemble des COV émis lors de la dégradation d'un échantillon complexe. La calibration, dans ce cas, est délicate à faire et pourtant un bilan de masse est une information essentielle.

- Tout simplement lorsque les étalons n'existent pas, sont trop coûteux ou sont dangereux à générer, et que la semi-quantification est la seule solution. Dans ce cas, l'information de la quantification absolue est précieuse et plus représentative de la mesure.

Plusieurs exemples illustreront le potentiel de cette méthodologie de quantification pour une mesure absolue.

P1-014

## Evaluation of Performance and Benefit of Ultrahigh-Resolution ESI-TOFMS Coupled to Fast Chromatography in the Application of Forensic Screening

C. Marfisi(1) • K. A. Kellersberger(2) • A. Pelander(3) • P. Decker(4) • C. Baessmann(4)

(1)Bruker Daltonique, Wissensbourg, France • (2)Bruker Daltonics, Billerica, MA • (3)University of Helsinki, Finland • (4)Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany

Comprehensive forensic screening of a large target database (~700 compounds) using full scan data from LC/TOF MS technology is already established as a routine method. Compound identification relies on accurate mass, isotope pattern, and (optionally) retention time information.

Nevertheless, although the method has proven to be very reliable in practice and is applied to ~7000 samples per year, the target database contains a few compound pairs of similar retention time, which require mass resolution higher than the standard TOF MS specification (>10,000), thus potentially preventing an unambiguous identification. These compound pairs are ideal test cases for the enhanced capabilities of the latest UHR-TOF technology. Since mass accuracy, isotope pattern quality and resolution on TOF instruments are independent of acquisition rate, coupling to an UHPLC also allows for significantly faster methods.

Here we will show that

- UHR-TOF MS technology is successfully applied to forensic screening examples: compounds, which can not be resolved on standard TOF MS systems can be unambiguously identified.
- All compounds tested show very low detection limits (0.5 pg abs. on column) and linear ranges of 3 -4 orders of magnitude.
- Mass resolution values up to ~50.000 (@m/z400) are observed.
- Mass accuracy, isotope pattern and mass resolution performance are independent of acquisition rates, so combinations with fast LC methods can also be used.

## Développement d'une stratégie analytique basée sur le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse haute résolution pour la mesure de retardateurs de flamme bromés et de leurs principaux métabolites dans des échantillons biologiques humains

Marteau C(1,2) • Antignac JP(1) • Carion R • Debrauwer L(2) • Berrebi A(3) • Zalko D(2) • Le Bizec B(1)

(1)ONIRIS, USC 2013 INRA, Laberca, Nantes • (2)INRA UMR1089 Xenobiotiques, Toulouse • (3)CHU, Hôp. P. de Viguière, gynécologie-obstétrique, Toulouse

Les retardateurs de flamme bromés (RFB) sont des composés largement utilisés dans la plasturgie comme agents ignifuges lors de la synthèse de matières plastiques depuis une trentaine d'années. Les plus courants sont les polybromodiphényle éther (PBDE), le tétrabromobisphénol A (TBBPA) et l'hexabromocyclododécane (HBCD), ce dernier étant présents sous plusieurs formes isomériques. Ils sont désormais retrouvés dans tous les compartiments environnementaux, et notamment chez l'homme, leur présence ayant été détectée dans le sérum, le tissu adipeux et le lait maternel. Par ailleurs, ces composés, suspectés d'être des perturbateurs endocriniens sont biodisponibles et peuvent être métabolisés, en produits hydroxylés et méthoxylés pour les PBDE et en conjugués (sulfate ou glucuronide) pour le TBBPA et l'HBCD. Des PBDE hydroxylés ont déjà été retrouvés dans du sérum et du lait maternel. L'objectif de cette étude est donc de développer une méthode de mesure des RFB et de leurs métabolites applicable à des échantillons humains (lait et sérum) prélevés chez des couples mère-enfant lors de l'accouchement à l'hôpital P. de Viguière de Toulouse. La méthode développée inclue le TBBPA et ses métabolites conjugués de phase II, les diastéréoisomères  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de l'HBCD et certains PBDE hydroxylés (composés tri- à octa-bromés). La mesure de ces composés par couplage LC-HRMS (LTO-Orbitrap) après ionisation électrospray dans le mode négatif, permet une identification non ambiguë de ces composés avec une résolution de 15,000 et avec une limite de détection instrumentale de l'ordre du pg injecté. L'identification se fait sur la base de deux ions du massif isotopique caractéristique de l'ion pseudomoléculaire. L'élution de ces composés se fait sur colonne Hypersil Gold (100 mm x 2,1 mm x 1,9  $\mu$ m), avec un mélange eau / acétonitrile (0,1% d'acide acétique). La méthode de préparation des échantillons a été développée à partir de 5 mL de lait maternel. La première étape est une extraction liquide-liquide par l'acétone et l'hexane permettant de récupérer d'une part (dans l'hexane) la matière grasse du lait dans laquelle sont présents le TBBPA, l'HBCD et les OH-PBDE, et d'autre part (dans la phase aqueuse)

les métabolites conjugués. De la première fraction sont ensuite séparés d'une part les composés hydroxylés (TBBPA et OH-PBDE) puis l'HBCD. La seconde fraction subit quant à elle soit une hydrolyse enzymatique par une glucuronidase et une sulfatase, avant purification sur SPE (détermination du TBBPA total), soit un fractionnement supplémentaire sur SPE échange d'anion avant hydrolyse afin de déterminer séparément les formes natives des formes glucuronides et sulfates.



## **Techniques d'analyse des éléments traces métalliques dans les milieux biologiques "Problématique et solutions proposées"**

*Dr Megueddem M • Dr Djafer R • Dr Messaoudene AB*

*Service de Toxicologie du Centre Hospitalier Universitaire d'Annaba (Algérie)*

### Introduction :

Etant donné que les niveaux d'exposition reconnus comme dangereux pour la santé sont de plus en plus bas (taux sérique moyen de mercure chez la population générale inférieur à  $10\mu\text{g/l}$ ), le développement de techniques analytiques basées sur la précision et l'exactitude, s'avère nécessaire pour une meilleure appréciation de la dose interne.

La mise au point de techniques d'analyses appropriées au dosage des polluants dans les milieux biologiques a fait l'objet de progrès considérables ces dernières années ; néanmoins il n'est pas toujours aisé de faire un choix pertinent en ne s'appuyant exclusivement que sur la littérature en vigueur. On doit, aussi, tenir compte de l'élément et de la matrice.

### Objectif :

L'objectif de notre travail vise à :

- Évaluer les difficultés analytiques associées à ces mesures
- Etablir des règles de bonne pratique que chaque laboratoire doit suivre impérativement afin d'obtenir des résultats quantitatifs.

### Conclusion :

En dépit des progrès considérables durant ces dernières années pour la détermination des teneurs en métaux dans les milieux biologiques, ces analyses restent difficiles et ne peuvent être réalisées que dans des laboratoires ayant l'expérience de l'étude de ces matrices.

## Développement d'une méthode de quantification du P-aminophenol par LC/MS/MS dans le plasma Humain

Jérémy Pinguet • Damien Richard • Frédéric Libert • Alain Eschaliér

*Service de Pharmacologie, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, pôle BFHP, CHU Gabriel Montpied, Clermont Ferrand, France*

Le Paracétamol, aussi appelé acétaminophène, est l'agent analgésique et antipyrétique le plus couramment utilisé dans le monde. Cependant son mécanisme d'action est encore mal connu aujourd'hui. Un mécanisme d'action centrale du paracétamol est suspecté depuis quelques temps. Le paracétamol serait une pro-drogue qui suite à deux transformations métaboliques successives donnerait un composé bioactifs, la N-acylphenolamine ou AM404. Le paracétamol serait tout d'abord métabolisé au niveau hépatique par une N-déacetylase en P-aminophenol, puis par une hydrolase (la FAAH) en AM 404.

Afin d'étudier ce mécanisme d'action nous souhaitons mettre au point dans notre laboratoire une méthode de détection et de quantification simultanée du Paracétamol et de son métabolite actif intermédiaire, le P-aminophenol, au niveau plasmatique.

La méthode de quantification par LC-ESI-MSMS en mode MRM offre une grande sensibilité et spécificité et reste ainsi une technique de choix pour le dosage des petites molécules.

Cependant, une vérification rigoureuse de la spécificité de cette approche reste nécessaire. En effet lors de notre étude, nous avons observé une fragmentation spontanée du paracétamol en p-aminophénol dans la source d'ionisation. L'optimisation des paramètres instrumentaux influençant cette dégradation permet de diminuer ce phénomène sans toutefois l'annuler et ceci au détriment de la sensibilité. Ainsi la séparation chromatographique de ces deux composées est nécessaire afin de différencier le signal du P-aminophenol plasmatique, du signal issu de la dégradation du paracétamol en source.

Cette séparation est effectuée sur une colonne Hypercarb® (ThermoFischer), colonne adéquate, constituée entièrement de graphite poreux qui permet la rétention et la séparation des molécules très polaires et de structure proche.

Le travail présenté décrit les différentes analyses préliminaires effectuées pour la mise au point de la méthode et les premiers résultats obtenus sur des patients.

## Développement d'une méthode analytique pour évaluer le devenir du Diuron et de ses produits de dégradation dans le sol

Cédric Repincay(1) • François Perreau(2) • Sylvie Nélieu(1)

(1)UR 251 PESSAC, INRA, Versailles • (2)Institut J.-P. Bourgin, Biologie des Semences/Seed Biology UMR 204 INRA-AgroParisTech, Versailles

Après épandage sur les sols cultivés, les pesticides sont susceptibles de persister, mais le niveau de pollution est atténué par différents processus naturels dont la photodégradation. Dans cette dégradation abiotique, des substrats présents en surface des sols absorbent l'énergie lumineuse puis forment des entités réactives qui dégradent les polluants organiques. Toutefois, ce processus doit être caractérisé car les produits formés sont parfois plus toxiques que le composé parent.

L'objectif de cette étude était de développer et valider une méthode analytique permettant d'évaluer, en lien avec leur impact, le devenir du diuron et de onze de ses produits de transformation dans le sol. Les produits de dégradation ont été caractérisés lors d'une précédente étude [1]. Ces produits n'étant pas disponibles en solution étalon chez les fournisseurs, l'optimisation des conditions de détection par spectrométrie de masse en mode MRM n'est pas possible par infusion direct. Ces paramètres ont été optimisés par UPLC-ESI-MS/MS en faisant varier la tension de cône en mode SIM puis l'énergie de collision en mode SRM. Une méthode d'extraction par ultrasons a été développée afin d'extraire l'ensemble des composés du sol.

Pour la plupart des composés, les limites de détection sont dans le domaine du ppb, soit moins de 0,1% de l'apport à dose agronomique du pesticide natif.

[1] M.V. Shankar, S. Nélieu, L. Kerhoas and J. Einhorn *Chemosphere* 66 (2007) 767-774

## Fatty Acid Ethyl Ester: nouveaux marqueurs de diagnostic précoce du Syndrome d'Alcoolisation Fœtal

D. Richard(1) • T. Paillet(1) • J. Pinguet(1) • R. Minet-Quinard(2) • V. Sapin(2) • A. Eschalière(1)

(1)Service de Pharmacologie, Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie, pôle BHP, CHU Clermont-Ferrand.

(2)Laboratoire de Biologie Médicale, pôle BHP, dCHU Clermont-Ferrand.

L'exposition prénatale à l'alcool (éthanol) est un problème majeur de santé publique, du fait de sa prévalence importante et de la sévérité des effets sur le développement fœtal. Le diagnostic du SAF (ou syndrome d'alcoolisation fœtal) repose à ce jour, uniquement sur un examen clinique post-natal. L'objectif de ce travail est de proposer aux cliniciens, un nouveau marqueur biologique de diagnostic précoce du SAF et de valider ce marqueur dans une matrice biologique peut explorer : le liquide amniotique.

Les FAEE (Fatty Acid Ethyl Ester) sont des métabolites mineurs et spécifiques de l'élimination de l'éthanol de l'organisme. Notre travail s'est donc appliqué à développer, optimiser et valider une méthode analytique sensible et spécifique d'analyse quantitative de certains FAEE dans cette matrice biologique, par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse.

Initialement développé dans le laboratoire pour la recherche de FAEE dans le méconium et dans la matrice cheveu, nous nous sommes attachés à valider notre protocole d'analyse dans cette nouvelle matrice. Après extraction liquide / liquide puis purification de l'extrait sur support solide cationique, les échantillons réduits à sec sont repris dans l'hexane pour être quantifié par CPG/SM à l'aide d'étalons internes deutérés spécifiquement synthétisés pour l'analyse de neufs FAEE.

Après validation de la méthode analytique, suivant les exigences de la norme ISO 15189, nous pouvons proposer une méthode d'analyse fidèle (répétable et reproductible), sensible, robuste et exacte pour l'ensemble de ces molécules.

Afin de valider biologiquement ces marqueurs biologiques dans le liquide amniotique, une étude pré-clinique est initiée. Ainsi quinze animaux (rattes gestantes), répartis en trois groupes d'études, sont gavés par une solution aqueuse alcoolique (2g/L ou 4g/L) versus un groupe témoin. Du jour J10 au jour J19 de gestation, les animaux sont suivis et gavés quotidiennement. A J20, les animaux sont sacrifiés et des prélèvements de sang et de liquide amniotique sont effectués.

Différentes méthodes analytiques sont appliqués sur ces prélèvements. Dans un premier temps, l'analyse

spécifique de l'éthanol par CPG/FID couplé par un système d'injection par espace de tête, n'a pas permis d'identifier la présence d'éthanol dans l'ensemble des prélèvements réalisés. Secondairement, l'analyse spécifique et simultanée des neufs FAEE définis précédemment sont recherchés et quantifiés. Là encore, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence dans les différents groupes d'animaux traités par rapport aux animaux sains et ceci pour l'ensemble des matrices étudiées.

En conclusion, nous pouvons dire que l'analyse spécifique par CPG/SM des FAEE comme marqueur du diagnostic du SAF chez l'homme reste à ce jour encore le seul marqueur biologique post-natal possible dans différentes matrices biologiques (méconium et cheveu). L'application pré-clinique reste encore difficile du fait d'un manque de sensibilité de la méthode analytique simple quad couplé à un volume limité de prélèvement de liquide amniotique. L'utilisation d'outils analytiques automatisés associant par exemple une extraction de type SPME (Solid Phase Micro Extraction) couplées à un système de détection de type triple quadripôle pourrait apporter potentiellement la sensibilité et la spécificité recherchées.

## Développement d'une méthodologie multi-résidus pour l'analyse de stéroïdes hormonaux et composés vétérinaires à l'état de traces dans le sol

MV. Salvia • E. Vulliet • L. Wiest, • R. Baudot • C. Cren-Olivé

Service Central d'Analyse du CNRS, Solaise, d

L'utilisation croissante de produits chimiques pour l'agriculture et l'activité domestique est responsable de la dissémination de nombreuses substances nuisibles à l'homme dans l'environnement. Parmi ces dernières, les stéroïdes hormonaux et les composés pharmaceutiques ont suscité une vive attention ces dernières années [1]. Si plusieurs méthodes d'analyse sont disponibles pour déterminer les teneurs en stéroïdes hormonaux ou de quelques substances vétérinaires dans les milieux aqueux [2, 3], très peu de méthodes ont été décrites pour permettre de les analyser dans les matrices solides. Les quelques données disponibles sur les teneurs en stéroïdes dans les sols révèlent des contaminations pouvant atteindre quelques centaines de ng/kg[4].

Cette étude a pour objectif de développer une méthode analytique pour l'analyse de ces produits à l'état de traces dans le sol. Ainsi, 47 produits ont été sélectionnés pour ce travail, incluant 25 produits vétérinaires, 11 stéroïdes hormonaux et 11 autres produits connus pour être des contaminants humains ubiquitaires et utilisés, dans cette étude, comme marqueurs de pollution. Une méthode d'analyse à la fois sélective et sensible, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), a été développée. L'optimisation a permis de déterminer les meilleures conditions chromatographiques (choix de la colonne, du gradient, des phases mobiles...) et de détection en spectrométrie de masse (mode d'ionisation, transitions MRM.).

L'analyse d'une matrice complexe telle que le sol a nécessité de mettre en œuvre une préparation d'échantillon rigoureuse pour obtenir une analyse reproductible, et suffisamment sensible pour atteindre les limites de détection requises. Pour cela, une méthode d'extraction par ASE (Accelerated Solvent Extraction) a été développée. Etant donné les caractéristiques et les propriétés physico-chimiques très différentes des 47 substances étudiées, l'optimisation de cette étape s'est avérée très délicate. Afin d'obtenir les meilleurs paramètres pour cette extraction (pression, température, temps statique, nombre de cycles et choix du solvant) et de trouver le meilleur compromis pour extraire aux mieux chacun des composés, l'utilisation d'un plan d'expérience a été mise en œuvre. La procédure analytique permet de déterminer les analytes cibles à des concentrations inférieures au ng/g.

[1] Kuldip Kumar, Satish C. Gupta, Yogesh Chander, and Ashok K. Singh, *Advances in Agronomy*, 87, p.1-54, 2005.

[2] Maria J. Lopez de Aldaa, Silvia Diaz-Cruz, Mira Petrovica, Damia Barcelo, *Journal of Chromatography A*, 1000, p. 503-526, 2003.

[3] Emmanuelle Vulliet, Laure Wiest, Robert Baudot, Marie-Florence Grenier-Loustalot, *Journal of Chromatography A*, 1210, p. 84-91, 2008.

[4] O. Finlay-Moore, P. G. Hartel and M. L. Cabrera, *Journal of Environmental Quality*, 29, p.1604-1611, 2000.

PI-021

## **Analyse de traces d'explosifs présentes sur des échantillons solides par DESI-Orbitrap et DART-Orbitrap**

*Olivier Vigneau • Cécile Hubert • Xavier Machuron-Mandard*

*CEA, DAM, DIF, F-91297 ARPAJON France*

Le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap, de par sa très haute résolution (100000 à  $m/z$  400), est un puissant outil d'analyse permettant de réaliser des expertises globales d'échantillons sans recourir à des étapes préliminaires de séparation et de purification chromatographique.

Les sources d'ionisation à pression atmosphérique telles que l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique (APCI), sont couramment utilisées pour l'analyse d'échantillons liquides. Les nouvelles sources de désorption et d'ionisation à pression atmosphérique, telles que les sources DESI (Desorption & Electrospray Ionisation) et DART (Direct Analysis in Real Time), autorisent désormais une analyse directe et instantanée d'échantillons solides, aussi bien pour une analyse qualitative que quantitative.

L'étude présentée ici montre tout l'intérêt d'associer ces nouvelles sources d'ionisation et le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap pour l'identification de traces d'explosifs sur des supports solides (verre, tissus,...). L'analyse rapide de l'échantillon s'effectue directement sans aucune étape préparative ni séparative. Le processus d'identification moléculaire repose sur la mesure précise des masses ioniques exactes, l'exploitation des motifs isotopiques et leur comparaison aux motifs théoriques. Les ambiguïtés d'identification telles que la discrimination des composés isomères peuvent en outre être levées par le biais d'analyses effectuées en mode MS<sup>n</sup>.

Les expérimentations conduites sur différents explosifs (PETN, HMX, RDX et TNT) à l'aide des sources DESI et DART ont permis de déterminer et de comparer les performances intrinsèques de ces deux méthodes en termes de sensibilité et de quantitativité dans le cas d'échantillons solides. Bien que moins sensible qu'une source d'ionisation électrospray, les sources DESI et DART n'en demeurent pas moins efficaces, permettant la détection de quelques centaines de pg de HMX déposés sur tissus. Elles trouvent leur intérêt dans la rapidité et la simplicité d'utilisation qu'elles procurent pour l'analyse d'échantillons solides. Il n'est pas nécessaire en effet d'avoir recours à des processus de mise en solution préalable, limitant ainsi entre autres les risques de contamination des échantillons étudiés.

## **Analyses multi-résidus de traces et ultra-traces de contaminants émergents dans des eaux de surface et souterraines destinées à la consommation, par LC-MS/MS**

Vulliet E. • Cren-Olivé C.

*Service Central d'Analyse du CNRS, USR59, Solaize.*

L'industrialisation et l'utilisation d'un nombre croissant de produits chimiques pour les activités agricoles et domestiques sont responsables de la dissémination, dans l'environnement, de substances variées dont les conséquences ne sont que progressivement mises en évidence.

Ainsi une nouvelle classe de contaminants dits « émergents » est apparue récemment. Ces polluants ne sont pas des polluants introduits récemment mais la prise de conscience de leur présence dans l'environnement et de leurs effets néfastes sur les écosystèmes et les hommes, est récente. Ils correspondent en général à des substances qui ne sont pas encore réglementées, qui ne sont pas nécessairement persistantes dans l'environnement mais qui sont introduites de manière continue à des concentrations très faibles.

Actuellement la présence, la répartition et le devenir de ces contaminants dans l'environnement sont encore peu connus par manque de méthodologies adaptées. Ces lacunes méthodologiques s'expliquent par les difficultés de détection et de quantification de contaminants émergents dans les milieux naturels. Ce sont, en effet, de véritables défis analytiques compte tenu de la diversité des substances recherchées et de leur présence généralement à l'état de traces dans l'environnement.

Actuellement, la méthode de choix pour l'analyse de telles substances est la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, qui offre à la fois la sélectivité et la sensibilité requises. Cette étape d'analyse doit être précédée d'une méthode de préparation d'échantillon fiable et reproductible permettant d'extraire et de concentrer les composés d'intérêt.

Dans ce contexte, nous avons développé deux méthodes d'analyse permettant la détection et la quantification, dans les milieux aquatiques, de traces de 70 contaminants émergents appartenant à diverse familles chimiques (médicaments, hormones, alkylphénols,...). Celles-ci mettent en jeu une étape simple de préconcentration d'échantillon par extraction en phase solide (SPE) suivie d'une analyse en LC-MS/MS utilisant le mode MRM (multiple reaction monitoring).

Les méthodes ont été appliquées à l'analyse des

contaminants dans 71 eaux de surface et 70 eaux souterraines de la région Rhône-Alpes, représentant des eaux de captage pour la consommation humaine. Les résultats révèlent qu'aucune eau n'est exempte de contaminants. Par contre, la nature et les teneurs des substances présentes varient avec l'origine (surface ou souterraine) de l'eau. D'une manière générale, les teneurs retrouvées sont faibles : la plupart des substances pharmaceutiques sont inférieures à 25 ng/L et les hormones dépassent rarement 3 ng/L. Seuls quelques composés industriels dépassent 50 ng/L.

C'est la première fois que de telles campagnes étaient entreprises en France, originales tant par le nombre et la nature des substances recherchées que par l'origine de l'eau analysée ou encore par le nombre de prélèvements effectués. Les résultats ont une portée au niveau national mais aussi au niveau international grâce notamment aux très basses limites de détection atteintes.