

# THÈSE

pour obtenir le grade de

**Docteur**

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement  
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Chimie Analytique

présentée et soutenue publiquement  
par

**Xuan Thanh BUI**

**le 19 décembre 2007**

**Utilisation de matrices agro-alimentaires comme indicateurs de pollutions  
environnementales : exemple du lait**

**Use of matrices agro-foodstuff as indicators of environmental pollution: example of milk**

Directeur de thèse : **Christian J. DUCAUZE**

Codirecteur de thèse : **Thi My Linh TRAN**

Travail réalisé : INRA/AgroParisTech, UMR- 214 «Ingénierie Analytique pour la Qualité des Aliments»,  
Laboratoire de Chimie Analytique, 16 rue Claude Bernard  
75231 PARIS CEDEX 05 - FRANCE

Devant le jury :

**M. Alain BERMOND**  
**Mme Arlette BAILLET**  
**M. Philippe GARRIGUES**  
**M. Christian J. DUCAUZE**  
**M. Alain LE BIHAN**  
**Mme Thi My Linh TRAN**

**Professeur, AgroParisTech, Paris**  
**Professeur, Université Paris XI, Orsay**  
**Docteur, CNRS, Université Bordeaux 1**  
**Professeur, AgroParisTech, Paris**  
**Professeur, UBO, Brest**  
**Professeur, Univ. Nationale du Vietnam, Hanoi**

**Président**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examineur**  
**Examineur**  
**Examineur**

## **Remerciements**

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire de Chimie Analytique de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement qui m'a fourni le soutien et tous les moyens nécessaires à sa réalisation. Pour l'aide, les encouragements, l'écoute et le réconfort qui m'ont été apportés, un grand merci à tous !

En premier lieu, je désire adresser des remerciements sincères et respectueux à mon directeur de thèse, le Professeur Christian J. Ducauze, pour sa disponibilité, son soutien, sa confiance, ses conseils avisés et de si grande valeur, sans cesse renouvelés lors de nos rencontres, qui m'ont permis de mener à bien cette recherche. Grâce à lui, j'ai beaucoup appris tant pour mon métier de chercheur que pour ma propre vie. Je lui suis infiniment reconnaissant de tout ce qu'il m'a fait pour moi et ces années de travail avec lui resteront à jamais gravées dans mon cœur.

Je remercie aussi le Professeur Douglas N. Rutledge, Directeur du Laboratoire de Chimie Analytique d'AgroParisTech, d'avoir bien voulu m'accueillir dans son Unité de Recherche.

En même temps, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame la Professeure Tran Thi My Linh, responsable de la Filière Francophone en chimie, Université des Sciences de Hanoi, ma co-directrice de thèse, pour le soutien qu'elle m'a toujours apporté et les conseils qu'elle n'a cessé de me prodiguer depuis de nombreuses années.

Je dis toute ma reconnaissance à Madame Arlette Baillet, Professeur à l'Université Paris-Sud XI, ainsi qu'à Monsieur Philippe Garrigues, Directeur de l'Institut des Sciences Moléculaires, Université de Bordeaux1, d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie très respectueusement les Professeurs Alain Bermond d'AgroParisTech et Alain Le Bihan de l'Université de Bretagne Occidentale qui ont accepté de participer au jury de de ma thèse malgré leurs contraintes de temps en cette fin de l'année.

J'exprime également ma reconnaissance, pour leurs commentaires et leur aide si précieuse, aux professeurs Nguyen Xuan Trung, Luu Van Boi, Nguyen Van Noi, Nguyen Dac Vinh et Nguyen Duc Hue de l'Université Nationale du Vietnam à Hanoi.

Un grand merci au Docteur Hervé This pour son appui et l'intérêt qu'il a su me manifester dans les moments difficiles.

Toute ma gratitude va aussi à Madame Anne-Marie de Kersabiec pour son aide, sa générosité et son soutien moral. Je ne saurais non plus oublier Monsieur Stéphane Besançon, pour toute l'aide qu'il ma donnée et pour sa disponibilité de chaque instant, ni Madame Estelle Rathahao pour ses conseils si judicieux.

J'adresse également mes remerciements à Madame Elisabeth Maltèse qui m'a enseigné le français et beaucoup aidé pour les corrections de mon manuscrit de thèse.

Je tiens beaucoup à remercier encore tous ceux qui ont facilité cette étude en acceptant de me fournir des échantillons de lait cru de vache bien identifiés: Messieurs Jean-Paul Garel et Philippe Pradel du Domaine expérimental de l'INRA à Marcenat et les responsables de plusieurs fermes du Vietnam.

Des remerciements très sincères et toute ma sympathie s'adressent au Dr Luc Eveleigh ainsi qu'au Dr Justin Koffi Houessou et au Dr Le Truong Giang, mes amis, pour leur soutien moral et leur aide de chaque jour.

Un grand merci aussi à tous mes amis du laboratoire, pour les conditions de travail si agréables qu'ils ont su créer autour de moi : Stéphanie, Nastaran, Nongrat, Hamida, Rui, Delphine, Corine, Brigitte, Ali, Camille, Nathalie, Audrey, Kaida, Juan, Hicham, Valérie, Nawel, Yann et Riadh.

Je remercie en particulier Madame Luu The Minh pour son aide précieuse et mon beau-frère Huy ainsi que Tam, son amie, qui m'ont si efficacement soutenu au moment où je devais achever ce travail.

Je dirai enfin, et par dessus tout, mon affectueuse reconnaissance à toute ma famille, à mes parents et à mes beaux parents. Toutes mes pensées vont vers ma femme qui m'a apporté des soutiens considérables pour que je puisse achever ce travail. Que mon fils pardonne à son papa ses quelques absences ou moments de stress.

## Résumé

Le lait peut être utilisé comme indicateur de pollutions environnementales car en général on est assuré de la bonne traçabilité de sa collecte.

De nombreux solvants ont été utilisés pour séparer les principales phases du lait (protéines, lipides, sérum). Le mélange de solvants utilisé pour cette étude est le suivant : 1 vol. de lait, 1 vol. de solution NaCl à 0,9%, 2 vol. d'éthanol et 4 vol. de dichlorométhane. Le plomb et le cadmium se retrouvent alors totalement dans la phase protéique alors qu'aucune trace de ces éléments n'est décelée dans les deux autres fractions. Les dioxines et PCBs se retrouvent en totalité dans le dichlorométhane. Ces deux phases se conservent aisément pour être soumises à une analyse ultérieure.

La méthode analytique qui a été mise au point permet aussi d'abaisser considérablement les seuils de détection. On obtient ainsi des limites de détection dans le lait de  $0,14 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb et de  $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd. En ce qui concerne les PCBs et les dioxines, les limites de détection et de quantification de la méthode d'analyse appliquée au lait sont, grâce à l'étape de traitement de l'échantillon, 100 fois plus basses que celles de la méthode de mesure par elle-même.

**Mots-clés :** Lait, plomb, cadmium, dioxines, PCBs, protéines, lipides, LD

## Abstract

Milk can be used as an excellent indicator of environmental pollution in general because it is assured of good traceability of its collection.

Many solvents were used to separate the main phases of milk (proteins, lipids, serum). The mixture of solvents used in the study is as follows: 1 vol. milk, 1 vol. solution at 0.9% NaCl, 2 vol. ethanol and 4 vol. dichloromethane. Lead and cadmium are totally localised in the protein phase while no trace of these is found in the other two fractions. All the dioxins and PCBs are found in dichloromethane. These two phases are easy to stock for later analysis.

The analytical method which was developed can also significantly lower the limit of detection. This leads to a limit of detection in milk of  $0.14 \mu\text{g.L}^{-1}$  for Pb and  $0.01 \mu\text{g.L}^{-1}$  for Cd. With regard to PCBs and dioxins, thanks to the treatment stage of the sample, the limits of detection and quantification of the method of analysis when applied to milk, 100 times lower than those of the basic method of measurement.

**Key words:** Milk, lead, cadmium, dioxins, PCBs, proteins, lipids, LD

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>2</b>
<b>CHAPITRE 1 : LE LAIT ET SES CONTAMINATIONS .....</b>	<b>6</b>
1.1. LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS .....	6
1.1.1. <i>Caractéristiques essentielles du lait</i> .....	6
1.1.2. <i>Importance du lait et des produits laitiers pour la vie</i> .....	7
1.2. SOURCES DE CONTAMINATION EN METAUX TOXIQUES (PLOMB ET CADMIUM).....	10
1.3. SOURCES DE CONTAMINATION DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS EN COMPOSES ORGANIQUE TOXIQUES (MOLECULES DE LA FAMILLE DES DIOXINES OU PCBs).....	11
<b>CHAPITRE 2 : DETERMINATION DU PLOMB ET DU CADMIUM .....</b>	<b>19</b>
2.1. METHODES D'ANALYSE .....	19
2.1.1. <i>Traitement de l'échantillon</i> .....	19
<b>2.1.1.1. Minéralisation par voie sèche</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.1.2. Minéralisation par voie humide</b> .....	<b>20</b>
2.1.2. <i>Méthodes de mesure</i> .....	21
<b>2.1.2.1. Méthodes électrochimiques</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1.2.2. Méthodes d'absorption atomique</b> .....	<b>22</b>
2.2. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES RELATIVES AU DOSAGE DU PLOMB ET DU CADMIUM DANS LE LAIT.....	25
2.3. DOSAGE DU PLOMB ET DU CADMIUM .....	38
2.3.1. <i>Recherche des meilleures conditions pour la mesure en SAAE</i> .....	38
<b>2.3.1.1. Méthode de mesure</b> .....	<b>38</b>
<b>2.3.1.2. Choix des conditions de temps et de température pour la programmation du four</b> .....	<b>39</b>
2.3.1.2.1. Choix des conditions de temps et de température du four pour le dosage du plomb.....	40
2.3.1.2.2. Choix des conditions de temps et de température du four pour le dosage du cadmium .....	41
<b>2.3.1.3. Limites de détection et de quantification de la méthode</b> .....	<b>41</b>
2.3.1.3.1. Détermination du domaine de linéarité .....	42
2.3.1.3.2. Calcul des limites de détection et de quantification.....	43
2.3.2. <i>Recherche des meilleures conditions de minéralisation</i> .....	46

2.3.2.1 Dosage du plomb et du cadmium contaminant les solutions d'acides, d'oxydants et de modificateurs utilisées pour nos essais .....	46
2.3.2.2. Choix d'un mélange d'acides ou d'un mélange d'acide et d'oxydant pour la minéralisation .....	48
2.3.2.3. Choix du temps pour minéraliser des échantillons analytiques.....	50
2.3.2.4. Choix du volume d'acide et d'oxydant utilisé pour la minéralisation...	52
2.3.2.5. Protocole retenu pour le dosage du plomb et du cadmium dans le lait...	53
2.3.3. Détermination du plomb et du cadmium dans différentes phases du lait (protéines, lipides, sérum) .....	54
2.3.3.1. Séparation du lait en ses 3 phases protéines, lipides, sérum.....	54
2.3.3.2. Recherche des meilleures conditions de minéralisation des protéines...	56
2.3.4. Calcul des limites de détection et de quantification pour le lait par une méthode directe ou à partir des protéines.....	59
2.4. CONCLUSIONS .....	63
<b>CHAPITRE 3 : DETERMINATION DES CONTAMINANTS ORGANIQUES .....</b>	<b>67</b>
3.1. PROTOCOLE ANALYTIQUE.....	67
3.1.1. Traitement de l'échantillon analytique.....	67
3.1.1.1. Méthodes d'extraction appliquées à un échantillon de lait liquide.....	67
3.1.1.1.1. Extraction liquide-liquide (LLE).....	67
3.1.1.1.2. Extraction en phase solide (SPE) .....	67
3.1.1.2. Méthodes d'extraction appliquées à un lait en poudre .....	68
3.1.1.2.1. Extraction au moyen d'un système à micro-ondes.....	68
3.1.1.2.2. Extraction au moyen d'un Soxhlet.....	68
3.1.2. Méthode de dosage .....	69
3.1.3. Détermination des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) .....	72
3.2. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES RELATIVES AU DOSAGE DES DIOXINES ET DES PCBs DANS LE LAIT.....	73
3.2.1. Références bibliographiques sur le dosage des dioxines et PCBs.....	74
3.2.2. Discussion et conclusions .....	103
3.3. DETERMINATION DES DIOXINES ET PCBs PAR GC- MS.....	104
3.3.1. Produits et réactifs.....	104
3.3.1.1. Solvants.....	104
3.3.1.2. Standards et réactifs.....	104
3.3.2 Traitement des échantillons .....	106

<b>3.3.2.1 Extraction liquide-liquide .....</b>	<b>106</b>
<b>3.3.2.2 Séparation, déshydratation et purification de l'échantillon .....</b>	<b>107</b>
3.3.2.2.1 Extraction ou purification sur une phase solide .....	108
3.3.2.2.2 Etude de l'extraction en phase solide sur un support de silice greffée C18 .....	108
3.3.2.2.3. Purification par SPE sur silice (LC-Si, 1 g, 6 mL).....	112
3.3.2.2.4. Purification sur cartouches d'alumine (LC-Alumina-N, 2 g, 6 mL)....	114
<b>3.3.2.3. Taux de récupération des PCBs et dioxines après traitement des échantillons.....</b>	<b>117</b>
<i>3.3.3. Choix des conditions d'analyse pour le dosage des dioxines et des PCBs par GC-MS/MS.....</i>	<i>119</i>
<b>3.3.3.1. Système GC-MS/MS.....</b>	<b>119</b>
3.3.3.1.1. Système d'injection .....	120
3.3.3.1.2 Détection par spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS) .....	120
3.3.3.1.3 Description des trappes ioniques.....	120
<b>3.3.3.2 Conditions expérimentales choisies pour le système GC-MS/MS.....</b>	<b>121</b>
3.3.3.2.1. Choix de la colonne chromatographique.....	121
3.3.3.2.2. Choix du programme de température du four .....	121
3.3.3.2.3. Conditions d'injection .....	122
3.3.3.2.4. Conditions de détection par spectrométrie de masse .....	122
3.3.3.2.5. Séparation des dioxines et PCBs.....	123
3.3.3.2.6. Identification des dioxines et PCBs par GC-MS/MS.....	125
3.3.3.2.7. Détermination des limites de détection et de quantification .....	125
3.3.3.2.8. Quantification des dioxines et PCBs par GC-MS/MS .....	129
<i>3.3.4. Application à des échantillons de lait.....</i>	<i>131</i>
<b>3.3.4.1. Procédure de traitement des échantillons de lait : .....</b>	<b>131</b>
<b>3.3.4.2. Récupération des PCBs après traitement des échantillons.....</b>	<b>131</b>
<b>3.3.4.3. Quantification des dioxines et des PCBs dans les échantillons de lait</b>	<b>132</b>
<b>3.3.4.4. Conclusion .....</b>	<b>134</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>136</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>141</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>155</b>
ANNEXE 1 : IDENTIFICATION .....	155
ANNEXE 2 : QUANTIFICATION .....	157
ANNEXE 3 : CHROMATOGRAMMES OBTENUS POUR L'ECHANTILLON DE LAIT .....	161

# LISTE DES TABLEAUX

<b>CHAPITRE 1 : LE LAIT ET SES CONTAMINATIONS .....</b>	<b>6</b>
Tableau 1 : Teneurs en oligo-éléments du lait humain et du lait de vache.....	9
<b>CHAPITRE 2 : DETERMINATION DU PLOMB ET DU CADMIUM.....</b>	<b>19</b>
Tableau 2 : Travaux réalisés sur le Plomb.....	34
Tableau 3 : Travaux réalisés sur le Cadmium .....	36
Tableau 4 : Série d'échantillons préparés en vue de choisir les conditions de temps et de température pour la programmation du four.....	39
Tableau 5 : Programmes de temps et de température du four pour Pb.....	40
Tableau 6 : Programmes de temps et de température du four pour Cd .....	41
Tableau 7 : Série d'échantillons préparés pour délimiter une droite.....	42
Tableau 8 : droites d'étalonnage pour Cd et Pb (en unités d'absorbance) .....	43
Tableau 9 : Teneurs en Pb et Cd dans les diverses solutions d'acides, oxydants et modificateurs .....	47
Tableau 10 : Série d'échantillons préparés pour choisir les conditions de minéralisation..	48
Tableau 11 : Choix d'un mélange d'acide et d'oxydant (pour Pb) : résultats obtenus .....	49
Tableau 12 : Choix d'un mélange d'acide et d'oxydant (pour Cd) : résultats obtenus .....	49
Tableau 13 : Essais réalisés pour choisir le temps de minéralisation.....	50
Tableau 14 : Choix d'un temps de minéralisation pour le plomb : résultats obtenus.....	51
Tableau 15 : Choix d'un temps de minéralisation pour le cadmium : résultats obtenus.....	51
Tableau 16 : Essais réalisés préparés pour choisir le volume d'acide et d'oxydant.....	52
Tableau 17 : Choix du volume d'acide et d'oxydant pour le plomb : résultats obtenus .....	52
Tableau 18 : Choix du volume d'acide et d'oxydant pour le cadmium : résultats obtenus.	53
Tableau 19 : Comparaison des résultats obtenus pour différentes fractions du lait .....	55
Tableau 20 : Comparaison des résultats obtenus par un dosage direct sur le lait ou par un dosage réalisé, après séparation, sur la phase protéique.....	56
Tableau 21 : Plan d'expériences retenu (plan complet 2 <sup>3</sup> ).....	57
Tableau 22: Matrice des effets.....	58
Tableau 23 : Série d'échantillons préparés pour déterminer la zone de linéarité.....	59
Tableau 24 : Résultats obtenus pour la droite d'étalonnage (en unités d'absorbance) .....	62
Tableau 25 : Limites de détection et de quantification obtenues pour Pb et Cd .....	63

<b>CHAPITRE 3 : DETERMINATION DES CONTAMINANTS ORGANIQUES.....</b>	<b>67</b>
Tableau 26 : Exemples de facteurs d'équivalence toxique pour les dioxines .....	73
Tableau 27 : PCDDs et PCDFs dans le lait humain .....	89
Tableau 28 : Travaux réalisés sur les PCBs .....	92
Tableau 29 : Travaux réalisés sur les dioxines .....	99
Tableau 30 : Meilleures limites de détection et quantification.....	103
Tableau 31 : Liste des solvants utilisés avec leur degré de pureté. ....	104
Tableau 32 : Caractéristiques des produits et réactifs utilisés.....	105
Tableau 33 : Techniques d'extraction liquide-liquide.....	106
Tableau 34 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE pour les PCBs .....	110
Tableau 35 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE pour les dioxines.....	111
Tableau 36 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Si) pour les PCBs.....	112
Tableau 37 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Si) pour les dioxines..	113
Tableau 38 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Alumina) pour les PCBs .....	115
Tableau 39 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Alumina-N) pour les dioxines.....	116
Tableau 40 : Taux de récupération après traitement des échantillons.....	118
Tableau 41 : Choix des conditions de mise en oeuvre de la GC-MS/MS. ....	123
Tableau 42 : Temps de rétention des dioxines et PCBs en GC-MS/MS .....	124
Tableau 43 : LD <sub>mes</sub> , LD <sub>ana</sub> , LQ <sub>mes</sub> et LQ <sub>ana</sub> pour les dioxines et PCBs.....	127
Tableau 44 : Domaine de linéarité et droite de calibration pour les dioxines et PCBs .....	130
Tableau 45 : Taux de recouvrement liés au traitement des échantillons de lait .....	132
Tableau 46 : Concentrations de divers PCBs dans quelques échantillons de lait.....	133



# ***LISTE DES FIGURES***

<b>CHAPITRE 1 : LE LAIT ET SES CONTAMINATIONS .....</b>	<b>6</b>
Figure 1 : Formules de base des PCDDs et PCDFs.....	11
Figure 2 : Formule de base des PCBs.....	12
Figure 3 : Sources de contamination du lait en éléments toxiques.....	13
<b>CHAPITRE 2 : DETERMINATION DU PLOMB ET DU CADMIUM .....</b>	<b>19</b>
Figure 4 : Courbes d'étalonnage obtenues pour Cd et Pb .....	42
Figure 5 : Principe de la méthode des moindres carrés. ....	44
Figure 6 : Limite de détection et niveau critique.....	45
Figure 7 : Séparation du lait en ses 3 phases : protéines, lipides, sérum.....	54
Figure 8 : Courbes d'étalonnage obtenues pour Cd et Pb dans le lait et dans les protéines	60
<b>CHAPITRE 3 : DETERMINATION DES CONTAMINANTS ORGANIQUES .....</b>	<b>67</b>
Figure 9 : Schéma de principe d'un chromatographe en phase gazeuse .....	72
Figure 10 : Séparation des différentes phases du lait .....	107
Figure 11 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE pour les PCBs.....	110
Figure 12 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE pour les dioxines .....	111
Figure 13 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Si) pour les PCBs .....	113
Figure 14 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE pour les dioxines .....	114
Figure 15 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Alumina) pour les PCBs .....	115
Figure 16 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Alumina-N) pour les dioxines.....	116
Figure 17 : Taux de récupération après traitement des échantillons .....	118
Figure 18 : Système Trace GC 2000 - Polaris-Q.....	119
Figure 19 : Structure de la phase des colonnes Rtx-5MS, Rtx-5, MXT-5 et XTI-5.....	121
Figure 20 : Chromatogramme obtenu par GC-MS/MS.....	124
Figure 21 : Exemple du chromatogramme et du spectre de masse obtenus pour le 2,4,4'- trichlorobiphényle (PCB-28).....	128
Figure 22 : Courbe d'étalonnage externe pour le PCB-28 .....	130
Figure 23 : Procédure de détermination des dioxines et PCBs dans le lait par GC-MS ...	131
<b>ANNEXES.....</b>	<b>155</b>

Figure 24 : Spectre de masse du 2,4,4'-trichlorobiphényle (PCB-28) dans la bibliothèque de spectre .....	155
Figure 25 : Spectre de masse du standard 2,4,4'-trichlorobiphényle (PCB-28).....	156
Figure 26 : Spectre de masse du 2,4,4'-trichlorobiphényle (PCB-28) dans l'échantillon de lait N°2.....	156
Figure 27 : Chromatogrammes obtenus pour l'échantillon de lait 1 .....	161
Figure 28 : Chromatogrammes obtenus pour l'échantillon de lait 2 .....	162
Figure 29 : Chromatogrammes obtenus pour l'échantillon de lait 3 .....	162

## ***ABREVIATIONS ET SYMBOLES***

A	Constante d'Arrhénius
ASE	Extraction accélérée par solvant (voir aussi PSE)
C	Catalyseur inconnu
C <sub>i</sub>	Valeurs des neurones
CID	Dissociation induite par collision
Conc	Concentration
C <sub>t</sub>	Coefficient de transfert (en %)
E <sub>a</sub>	Energie d'activation
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IC	Intervalle de confiance (à 95%)
INA P-G	Institut National Agronomique Paris-Grignon
I-TEQ	International-Toxicity Equivalent Quantity
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
m	Ordre de la réaction
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem (ou MS <sup>2</sup> )
nd	Non détecté
np	Expérience non réalisée
ppb	Partie par billion (= 1µg.L <sup>-1</sup> ou 1µg.kg <sup>-1</sup> )
PSE	Extraction par un solvant chaud sous pression (voir aussi ASE)
PTV	Injecteur vaporisateur à température programmable
q	Energie d'excitation maximale
r <sup>2</sup>	Coefficient de corrélation
R	Constante des gaz parfaits
RSD	Ecart-type relatif ( <i>relative standard deviation</i> )
RSI	A reverse search matching factor ignoring any peaks in the unknown that are not in the library spectrum.

SI	A direct matching factor for the unknown and the library spectrum
SIM	En mode de sélection d'un ion ( <i>selected ion monitoring</i> )
SD	Ecart-type absolu ( <i>standard deviation</i> )
SPE	Extraction en phase solide ( <i>solid phase extraction</i> )
TEF	Facteur d'équivalent toxique
TEQ	Equivalent toxique
THF	Tétrahydrofurane
US EPA	Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis

# **Introduction**

# INTRODUCTION

La pollution de notre environnement est devenue une préoccupation majeure à l'échelle mondiale. Pendant de longues années et dans bien des pays, une industrialisation et une urbanisation rapides mais mal contrôlées ont eu pour conséquence des rejets sauvages de déchets industriels et ordures ménagères dans l'environnement. Les guerres chimiques, faisant appel à l'agent orange par exemple, ont laissé de nombreux sites pollués. A l'heure actuelle, les combustions industrielles ou domestiques (sidérurgie, chauffage au charbon ou au fuel, incinération des ordures ménagères ou de déchets industriels, etc.), les feux de forêt, la décomposition des engrais chimiques, des herbicides, des insecticides, etc. représentent autant de sources de contamination. Dans les zones d'élevage et de culture maraîchère polluées par des éléments toxiques, comme certains métaux lourds, la sécurité des produits alimentaires n'est pas assurée : on a pu constater de nombreuses intoxications aiguës chez l'homme, dues à l'absorption d'aliments contaminés. Ceci montre bien l'intérêt qu'il y a de développer des méthodes d'analyse, en vue de contrôler la qualité des produits agro-alimentaires mais aussi pour les utiliser, lorsqu'on connaît leur provenance, comme moyen de détecter certaines pollutions environnementales. Il nous a donc semblé utile de voir dans quelle mesure certaines matrices agro-alimentaires - le lait par exemple - pourraient être prises comme indicateurs de pollutions environnementales.

L'objectif général de notre thèse sera de développer des méthodes rapides d'analyse physico-chimique, ayant des seuils de détection aussi bas que possibles, puis de les valider en vue de leur application à de grandes séries d'échantillons agro-alimentaires, qui pourront être alors utilisés comme indicateurs de pollutions.

Le lait et les produits laitiers jouent un rôle important dans l'alimentation humaine, du moins dans les pays ayant un niveau de vie assez élevé. Le lait est un aliment que produisent les mammifères, dont la physiologie et l'anatomie font qu'il constitue un filtre naturel lors d'une éventuelle contamination par des métaux ou des molécules toxiques. C'est pourquoi nous avons choisi cette matrice pour notre étude, sachant aussi que sa collecte est généralement organisée avec une bonne traçabilité. Les contaminations étudiées seront, d'une part, les pesticides (détermination de molécules toxiques, comme certaines molécules de la famille des PCBs, etc.), d'autre part, les métaux toxiques (le plomb et le cadmium, par exemple).

Les méthodes de mesure mises en œuvre pour ce travail seront celles habituellement employées : d'une part, le couplage GC-ECD et le couplage GC-MS pour les molécules toxiques, d'autre part, la SAA pour les métaux toxiques. Mais, pour accéder à des méthodes rapides de dosage et à des niveaux de concentration aussi bas que possibles, c'est surtout l'étape de traitement de l'échantillon analytique qu'il faudra étudier. Il est en effet nécessaire de faire sauter le verrou que constitue cette étape, limitante quant à la durée et à l'automatisation de l'analyse mais aussi quant à l'erreur, en termes de justesse et de répétabilité. Une voie possible est d'avoir recours à des méthodes rapides d'extraction ou de minéralisation par l'utilisation de micro-ondes en systèmes ouverts ou fermés.

Il sera possible par la suite, en s'appuyant sur les résultats obtenus, d'essayer de mettre au point des méthodes de tri rapide des échantillons (contaminés ou non) en faisant appel à d'autres méthodes de mesure qui ne nécessitent pas ou minimisent le traitement préalable de l'échantillon analytique : on pourra faire appel dans ce but à la fluorimétrie ou à l'ICP-MS.

Ce travail de thèse a une portée générale et concerne donc tous les analyticiens mais, dans l'immédiat, il devrait contribuer à résoudre des problèmes environnementaux qui se posent aujourd'hui au Vietnam.

La pollution de l'environnement est en effet l'un des problèmes majeurs du Vietnam, pays agricole qui, après de longues années de guerre, a connu une industrialisation et une urbanisation rapides. A ce jour, les ressources en eau que constituent le fleuve Rouge et le fleuve Lo, deux fleuves importants du nord du Vietnam, sont gravement polluées par les zones industrielles de Viet Tri, de Bai Bang et de Lam Thao, en raison de technologies de production arriérées et d'un rejet direct à la rivière des eaux usées, sans traitement préalable ; des métaux toxiques aussi bien que des composés organiques contribuent à la pollution. A Hanoi, des usines de piles, de textile, des tanneries... évacuent aussi leurs eaux usées, sans aucun traitement, vers des zones d'élevage de poissons et de cultures maraîchères qui fournissent les marchés de la capitale. Dans le sud aussi, les rejets provenant de la grande zone industrielle de Bien Hoa, qui contiennent des huiles, des contaminants organiques et des métaux toxiques (Ni, Pb, Cr, Cu, Zn, Hg, Cd, As, Mn...), ont tué une part importante des poissons élevés par les paysans des régions voisines. Ainsi, les fortes concentrations en de nombreux métaux toxiques dans les sols et les aquifères s'ajoutent à l'utilisation d'engrais et d'herbicides – dont certains s'inscrivent même dans la liste des engrais interdits en culture – font que les produits qualifiés de « légumes et fruits propres », destinés à la consommation des habitants d'Hanoi et d'autres grandes villes,

contiennent des éléments toxiques dépassant les teneurs autorisées (métaux toxiques, résidus de pesticides). Ces produits ne sont contrôlés par aucune institution avant leur mise sur le marché. De plus, l'utilisation en élevage de stimulants de croissance, d'aliments et d'eaux contaminés rend la qualité des viandes de plus en plus mauvaise. Certaines molécules toxiques de la famille des dioxines ou des PCBs persistent dans certaines régions ( A Luoi, Quang Tri, Binh Duong...) et pénètrent dans des aliments qui sont vendus sur les marchés en de grandes quantités et sans aucun contrôle. On assiste à de nombreuses intoxications aiguës dues à ces aliments contaminés, ce qui implique de trouver des solutions pour le contrôle de leur qualité.



# **Chapitre 1**

## **Le lait et ses contaminations**

# CHAPITRE 1 : LE LAIT ET SES CONTAMINATIONS

## 1.1. LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS

### 1.1.1. Caractéristiques essentielles du lait

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires de la femme ou de la femelle après l'accouchement ou une mise bas. C'est un liquide de composition complexe, blanc et opaque, ayant une saveur douce, avec un pH voisin de la neutralité. Le lait est l'aliment naturel des jeunes mammifères durant la période critique de leur existence qui suit tout juste leur naissance et qui est caractérisée par une croissance rapide nécessitant une alimentation particulière totalement adaptée. La composition complexe du lait répond à cette fonction. La mamelle représente également un émonctoire : on va trouver dans le lait des substances d'élimination sans valeur nutritive (Alais C., 1965).

Le lait est une émulsion de matière grasse, sous forme globulaire, dans un liquide qui présente des analogies avec le plasma sanguin. Ce liquide est lui-même une suspension de matières protéiques dans un sérum ; ce dernier est une solution neutre contenant principalement du lactose et des sels. Il y a donc dans le lait quatre types de constituants importants : graisses, protéines (caséine et albuminoïdes), lactose, sels. Mais il y a aussi de nombreux autres constituants, présents en de faibles quantités : lécithines, vitamines, enzymes, nucléotides, gaz dissous, etc. (Guérault A. M., 1960).

La composition du lait varie au cours du cycle de la lactation et, à l'époque de la naissance, la mamelle sécrète le colostrum, liquide différent du lait, surtout dans ses parties protéiques et salines. L'état de santé influe également sur la composition du lait (lait pathologique), alors que la composition d'un lait «parfait» varie notablement d'une espèce animale à l'autre.

Le lait est un produit très facilement altérable, par la chaleur en particulier : des microorganismes nombreux peuvent proliférer dans le lait, notamment ceux qui dégradent le lactose, avec une production d'acide ayant comme conséquence la floculation d'une partie des protéines. Le lait n'ayant qu'une faible et éphémère protection naturelle, son usage pour l'adulte et pour les transformations industrielles exige des mesures de défense contre l'envahissement par les microbes et contre l'activité des enzymes (Alais C., 1965).

Les laits sont d'origines très diverses : lait humain, lait de jument, lait d'ânesse, lait de vache, lait de chèvre, lait de brebis, lait de bufflesse, lait de renne, lait de truie, lait de

chatte, lait de chienne, lait de lapine, lait de marsouin, lait de baleine, etc. Le lait de vache est l'un des aliments les plus économiques pour l'homme.

La liste des produits laitiers et des produits dérivés du lait est encore plus longue, qu'il s'agisse des laits de consommation non modifiés (lait cru, lait pasteurisé et stérilisé) ; des laits concentrés (condensés ou évaporés) ou desséchés par action de la chaleur (poudre de lait), exceptionnellement par lyophilisation (lait humain) ; des laits modifiés (laits médicaux, aromatisés stérilisés, laits fermentés ou aigris : yaourt, lait acidophile, kéfir) ; de crème (partie du lait très riche en matière grasse, séparée du lait écrémé par décantation ou centrifugation) ; de beurre (obtenu par barattage de la crème ; la matière grasse n'est plus alors dans son état originel car on a séparé le babeurre qui a une composition voisine de celle du lait écrémé) ; des fromages obtenus par coagulation du lait, généralement sous l'action de la présure (le coagulum est séparé du petit-lait – sérum contenant les substances solubles – pour former le fromage après égouttage et affinage ; il contient la caséine et la graisse du lait) ; enfin de sous-produits issus des sérums (lactose et acide lactique, alcool, aliments divers : fromage de petit-lait, concentré de protéines, produits vitaminés, etc.) (Alais C., 1965).

### **1.1.2. Importance du lait et des produits laitiers pour la vie**

La sécrétion lactée de mammifères domestiques a été développée par l'homme qui bénéficie ainsi d'un excédent considérable pour son alimentation. Le lait et les produits laitiers occupent une place importante dans l'alimentation humaine, en particulier dans les pays ayant un niveau de vie assez élevé. Il est souvent dit et écrit que « le lait est un aliment parfait ». Ce qualificatif est excessif. Les données suivantes doivent cependant être prises en compte :

1. Le lait de la mère est un aliment complet pour l'enfant au début de son existence.
2. Le lait d'un animal producteur est un excellent aliment pour l'adulte de la même espèce ou d'autres espèces, mais il ne peut couvrir tous les besoins si l'on considère les quantités normalement ingérées. Pour l'homme, le lait de vache est un aliment de grande valeur car il fournit plus de substances alimentaires essentielles que tout autre aliment naturel. Cependant, il y a des facteurs limitants : on sait, par exemple, que la prolongation d'un régime exclusivement lacté, après le premier âge, a des effets anémiantes (carence en fer). La couverture des besoins énergétiques chez l'adolescent ou l'adulte exigerait l'ingestion de quantités de lait excessives, non tolérées par la plupart des individus. Il faut noter cependant qu'un litre de lait de vache apporte environ 650 calories et couvre près de

la moitié des besoins en énergie de l'enfant de cinq ans, près du quart dans le cas de l'adulte.

3. Le lait de vache est un des aliments les plus économiques pour l'homme. Par exemple, le lait fournit des protides de haute valeur biologique qui reviennent cinq fois moins cher que ceux du beefsteak ou du poulet, trois fois moins cher que ceux du poisson. L'importance alimentaire du lait réside principalement dans les protéines, le calcium, certains oligo-éléments (Voir **tableau 1**) et les vitamines A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, D, etc. En France, compte tenu des habitudes alimentaires, le lait peut être considéré comme un « aliment de sécurité » ou comme un « aliment protecteur ». Ces mêmes désignations s'appliquent également au fromage.

**Tableau 1 : Teneurs en oligo-éléments du lait humain et du lait de vache***(source : Renner E., 1983 et 1989)*

Oligo-éléments	Teneurs ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	
	Lait humain	Lait de vache
Aluminium	500	600-1000
Arsenic	50	<50
Baryum	40	-
Bore	80	150-300
Brome	-	150
<b>Cadmium</b>	<b>114</b>	<b>&lt;1</b>
Chrome	40	15-30
Cobalt	12	0,5
Cuivre	380	20-40
Etain		100-1000
Fer	660	200-500
Fluor	50	70-200
Iode	80	10-300
Manganèse	20	10-300
Mercure	-	<1
Molybdène	2	70
Nichel	25	-
<b>Plomb</b>	<b>30</b>	<b>2-10</b>
Séléniumn	20	10-30
Silicium	700	1000-6000
Strontium	100	350
Titane	100	-
Vanadium	7	-
Zinc	2430	3000-6000

## **1.2. SOURCES DE CONTAMINATION EN METAUX TOXIQUES (Pb, Cd)**

Le lait constitue un filtre naturel des métaux toxiques, les contaminations les plus fréquentes étant celles qui concernent le cadmium, le plomb et le mercure. Une contamination par le mercure, même si elle demeure possible, reste un phénomène extrêmement rare pour les mammifères terrestres.

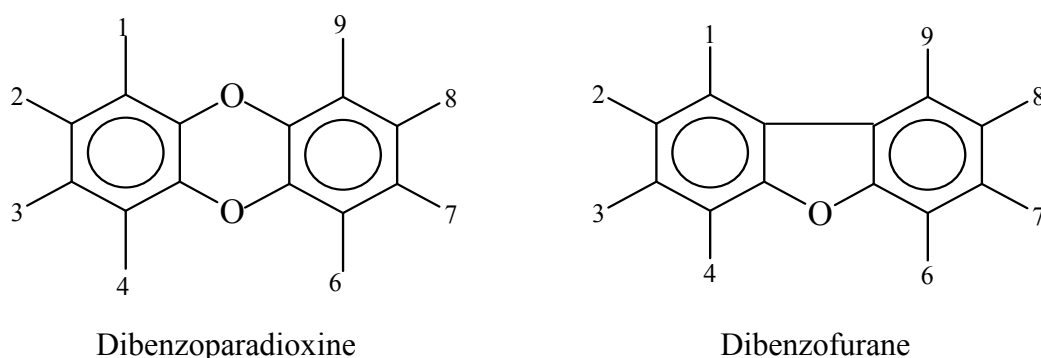
Les principales sources de contamination des produits laitiers par les métaux toxiques sont d'origine industrielle : on peut en particulier citer les nombreuses manipulations de peinture ou d'essence, les batteries (plomb, mercure, cadmium) mais aussi la sidérurgie, la métallurgie, les mines (fumées) et les tanneries (chrome). Il faut également mentionner des contaminations qui, bien que d'origine naturelle, ne sont pas négligeables pour autant : les volcans, les feux de forêt (arsenic) ou des sols riches en minerai (mercure) (Oskarsson A. et al., 1998 ; Swarup D. et al., 1997).

Le plomb est essentiellement ingéré sous la forme d'aliments contaminés ou par le contact mains-bouche après qu'on ait touché des objets sur lesquels du plomb s'est déposé. Il y avait autrefois beaucoup de cas de saturnisme (intoxications par le plomb) chez les travailleurs des mines et fonderies de plomb, chez les typographes dans l'imprimerie, chez les peintres, chez les marins et soldats ravitaillés au moyen de boîtes de conserve qui comportaient autrefois des soudures au plomb. De même, l'utilisation de conduites d'eau potable en plomb dans des régions où l'eau était peu calcaire doit être incriminée. Mentionnons aussi les gaz d'échappement des voitures. Toutefois, la pollution par le plomb a été fortement réduite, grâce à l'amélioration de l'hygiène de travail, à l'interdiction des peintures au plomb, à la réglementation concernant la libération du plomb dans les conserves alimentaires, au remplacement des conduites d'eau en plomb par des tuyaux en matière synthétique et à l'essence sans plomb.

On ne peut absorber que de 5 à 6% du cadmium présent dans notre alimentation mais, lorsque cet élément a pénétré dans l'organisme, il ne peut que difficilement être éliminé, une bonne moitié se fixant dans les reins, un peu moins dans le foie. Le cadmium est extrait du minerai de zinc et surtout utilisé dans l'industrie électrique, électronique et en métallurgie. On le retrouve encore dans certaines peintures anti-rouille et anti-taches et dans la coloration de divers plastiques (jouets, palettes de bière). Pour éliminer de l'environnement les produits contenant du cadmium après leur utilisation, ce sont les moyens mis en œuvre pour la collecte et le traitement qui jouent un rôle important.

### 1.3. SOURCES DE CONTAMINATION DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS EN COMPOSES ORGANIQUES TOXIQUES (MOLECULES DE LA FAMILLE DES DIOXINES OU PCBS)

Le terme « dioxine » est employé pour désigner deux familles d'hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH) dont les structures de base sont présentées sur la **figure 1** : les polychlorodibenzoparadioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF) :

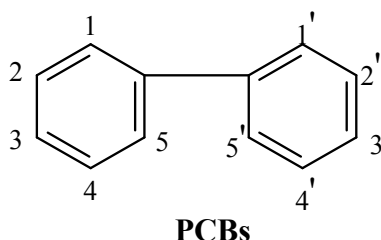


**Figure 1 : Formules de base des PCDDs et PCDFs.**

Les molécules peuvent renfermer de 1 à 8 atomes de chlore occupant différentes positions sur la structure de base, ce qui représente près de 210 molécules de « dioxine ». Seuls les congénères comportant un minimum de 4 atomes de chlore occupant les positions 2,3,7 et 8 sont toxiques. Le congénère le plus toxique est la 2,3,7,8-TCDD et la toxicité diminue lorsque le nombre d'atomes de chlore croît. Dans les produits laitiers, il est convenu de mesurer les teneurs pour 17 congénères (7 dioxines et 10 furanes) (Laloux L., 2003)

Les dioxines sont des substances résultant essentiellement de combustions industrielles ou domestiques (incinération des déchets, sidérurgie, chauffage au charbon et fuel). Les guerres qui ont utilisé l'agent orange (Dwernychuk L. W. et al., 2002) – la concentration de TCDD dans l'agent orange va de 0,005 mg/l à 50,0 mg/l – ou des armes chimiques ont pollué certaines régions par des molécules toxiques de la famille des dioxines, que l'on retrouve aussi dans de nombreux pays car elles peuvent voyager sur de longues distances par voie aérienne. Ces composés peuvent également avoir une origine naturelle, se formant lors de feux de forêt, de réactions photochimiques ou de processus biologiques (composts). Les dioxines sont enfin des sous-produits de réactions chimiques,

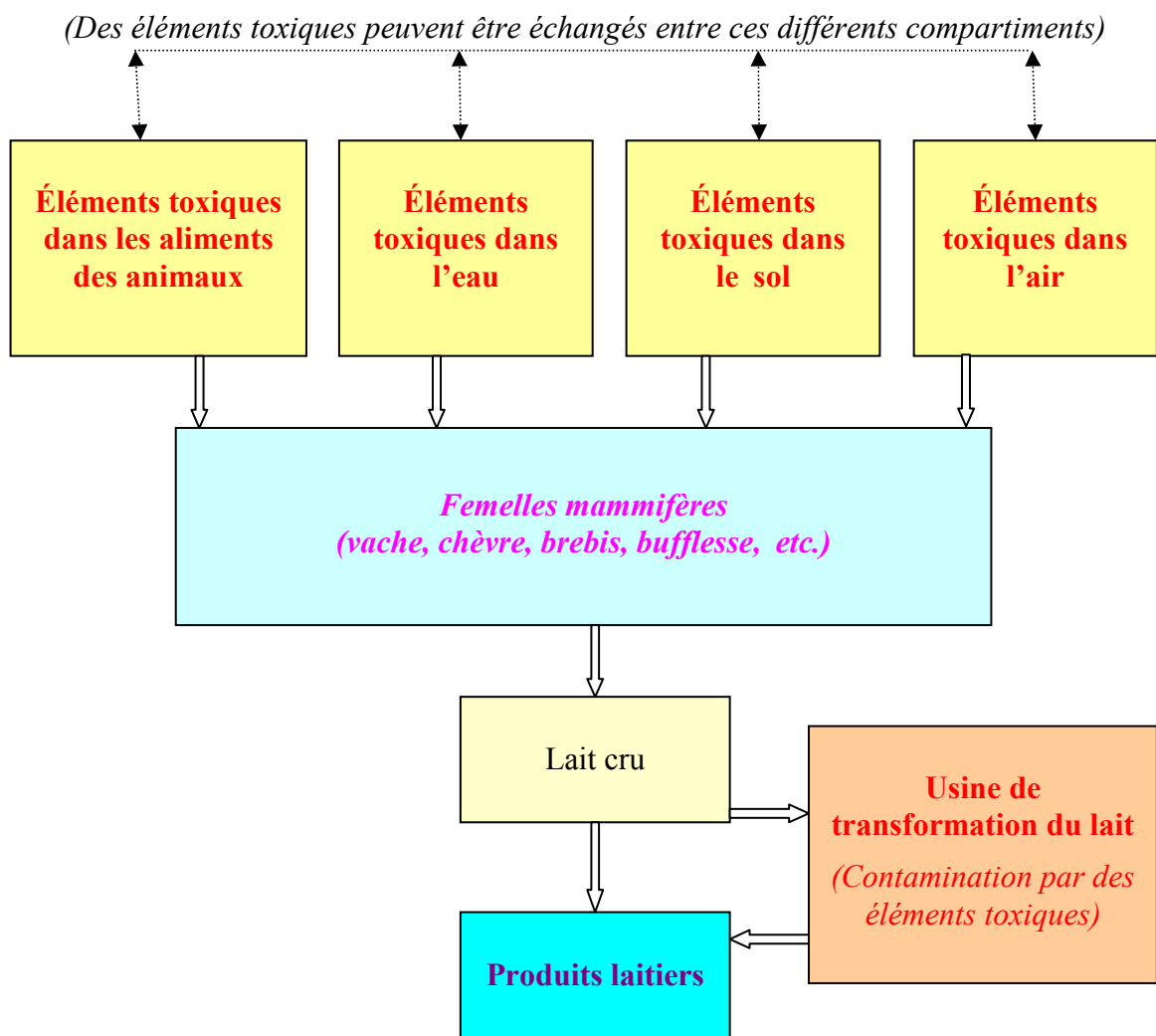
notamment celles faisant intervenir les polychlorobiphényles (PCBs) : ceux-ci, utilisés comme isolants thermique et électrique dans les transformateurs et les condensateurs, conduisent à la formation et à la dissémination de dioxines en cas de combustions accidentelles.



**Figure 2 : Formule de base des PCBs.**

Les PCBs sont produits chimiquement à grande échelle depuis 1930. Théoriquement, ils correspondent à 209 molécules différentes (**Figure 2**). Les PCBs sont difficilement solubles dans l'eau ; ils conduisent bien la chaleur, très mal l'électricité ; ils ne sont ni corrosifs ni inflammables. Toutes ces propriétés spéciales expliquent leur grand succès. Depuis 1930, on estime que la production mondiale a atteint 1,5 millions de tonnes. Comme on vient de le dire, ils sont utilisés dans les transformateurs et condensateurs, comme liquide hydraulique, comme liquide de refroidissement, etc.





**Figure 3 : Sources de contamination du lait en éléments toxiques**

La **figure 3** présente les différentes sources de contamination du lait.

**En ce qui concerne le plomb (Pb) :** des mines de galène sont exploitées depuis très longtemps et le plomb utilisé à des fins diverses, par exemple pour la production de canalisations d'eau, de conteneurs et même, sous forme d'acétate, pour adoucir le vin (acétate de plomb). La production mondiale se chiffre aujourd'hui à plusieurs millions de tonnes. Le plomb sert à la fabrication d'accumulateurs, dans la soudure, dans les câbles, les pigments et agents antirouille (minium/oxyde de plomb), en de grandes quantités également comme agent antidétonant dans l'essence. Les sources de pollution par le plomb sont principalement : certains procédés industriels et leurs émissions, le trafic routier et l'essence au plomb, les émanations de fumée et de poussières des centrales électriques fonctionnant au charbon et au gaz, les feuilles de plomb utilisées par les couvreurs ainsi que l'utilisation de peintures et d'agents antirouille. Les problèmes liés aux denrées alimentaires existent depuis longtemps et, aujourd'hui, il sont encore causés par les

soudures des boîtes de conserve et des boîtes de lait concentré, les bouchons métalliques des bouteilles de vin ou encore les tuyaux de plomb des systèmes d'eau potable (Das A. K. et al., 1996 ; Demirozu-Erdinc B. et al., 2000).

Les peintures anciennes peuvent contenir de 5 à 40 % de plomb. L'ingestion d'écaillés (ou poussières) de peintures déposées par exemple sur le sol d'une habitation ou à l'extérieur constitue une voie d'exposition au plomb, particulièrement pour les enfants. Les poussières de peintures peuvent être également inhalées. De plus, des travaux de rénovation (destruction ou ravalement d'immeubles anciens, ponçage de peintures dans un logement) mal conduits peuvent également constituer une source de contamination pour le voisinage (Stevens J.B., 1991 ; Queirolo F. et al., 1990).

L'inhalation de fines particules émises dans l'atmosphère à partir de sources générant du plomb est une voie d'exposition au plomb : la fumée de cigarettes contient par exemple de très faibles quantités de plomb. Le plomb déposé sur les sols peut aussi passer dans l'air que l'on inhale sous forme de poussières légères. Les poussières peuvent être transférées du lieu de travail au domicile par les chaussures, les vêtements, les cheveux et les mains sales des salariés exposés au plomb, au risque d'augmenter ainsi la plombémie de leurs familles. Elles peuvent être remises en suspension dans l'atmosphère par balayage au lieu d'un nettoyage humide et contaminer ainsi les surfaces et les aliments.

**Le cadmium** (Cd), quant à lui, est un toxique cumulatif. Ses effets à long terme chez l'homme ont été établis grâce à des études épidémiologiques réalisées dans des régions fortement contaminées par les métaux non ferreux, comme la Vallée de la Meuse (Lauwerys R., 1974). Le cadmium apporté par les aliments ou inhalé avec la fumée de cigarette s'accumule dans les reins. Lorsque les concentrations rénales atteignent un certain seuil, des dysfonctionnements apparaissent : augmentation de l'excrétion des protéines de faible poids moléculaire, de calcium et de cadmium. La dose journalière acceptable, évaluée en prenant ces effets en considération, a été fixée à  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Expérimentalement, chez le rat, l'inhalation de sels minéraux de cadmium (sulfate, oxyde) entraîne une forte augmentation des cancers primaires du poumon (Kogevinas M., 2000). En 1983, on a évalué l'ingestion moyenne de cadmium en France à  $220 \mu\text{g.sem}^{-1}$  ( $\sim 30 \mu\text{g.j}^{-1}$ ), dans le cadre de l'Inventaire National de la Qualité : les produits laitiers étaient considérés comme responsables de 18,5 % de l'apport total en cadmium, en deuxième position après les fruits et les légumes qui représentaient 30% (CSHPF, 1996). En 1998, Decloitre évaluait l'apport alimentaire en cadmium à  $137 \mu\text{g.sem}^{-1}$  ( $\sim 20 \mu\text{g.j}^{-1}$ ), les fruits et les légumes étant toujours les premiers vecteurs de cadmium, alors que les produits

laitiers ne représentaient plus que 8,8 % (Decloitre F., 1998). En France, alors que la teneur du lait en cadmium est inférieure à la limite de détection des méthodes d'analyse (0,2 à 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), les concentrations peuvent atteindre 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dans les fromages de vache et 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dans les fromages de brebis et de chèvre (Milhaud G.E. et al., 2000). Le cadmium des fromages provient-il du lait ou de contaminations pendant la fabrication ? Pour répondre à cette question, on a pensé qu'il était utile d'étudier le transfert du cadmium contenu dans le lait vers la crème et les caillés présure ou lactique au moyen de préparations en laboratoire. On a déjà réalisé des études sur les laits de brebis et de vache (Milhaud G. et al., 1998 ; Mehennaoui S. et al., 1999).

Le cadmium (production mondiale de 15 000 t en 1972) est présent à de faibles concentrations dans tous les sols. On l'extrait activement à des fins commerciales mais il provient également de processus industriels comme la fabrication de la fonte et le raffinage de métaux, de centrales électriques fonctionnant au charbon et au pétrole, des sites d'argenterie, etc. Par l'action de l'air et de l'eau (boue d'émouillage), il est dispersé au loin sur mer et sur terre, mais surtout dans les environs des grands sites industriels. Le cadmium est aujourd'hui considéré comme l'un des contaminants les plus dangereux. Il est absorbé par de nombreuses plantes et organismes aquatiques et, en raison de sa toxicité, il représente un risque majeur pour les denrées alimentaires. Contrairement au plomb, le cadmium contaminant les plantes ne peut être éliminé par un simple lavage, car il pénètre celles-ci (Mata L. et al., 1995 ; Lopez A. M. et al., 2003). Il est par ailleurs souvent difficile d'être certain de l'origine du cadmium détecté dans les fruits et les légumes, car il existe naturellement partout dans le sol et est absorbé par les racines. Toutefois, il a été possible de démontrer que la plus grande teneur en cadmium du cacao d'Amérique centrale était liée à la composition spécifique du sol local. Contrairement au cacao africain qui contient de 0,08 à 0,14  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , des teneurs allant de 0,18 à 1,5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ont été mesurées dans des variétés de cacao fin, en provenance du Venezuela et de l'Équateur par exemple. Les nouvelles variétés provenant d'Extrême-Orient contiennent également un taux élevé de cadmium (Eklund G. et al., 1999 ; Faugere J.-G. et al., 1995)

**Pour les PCBs et les Dioxines**, différentes voies de contamination de notre alimentation doivent être prises en compte. La contamination de l'environnement par des dioxines est principalement causée par le transport atmosphérique et les retombées d'émissions diverses (incinération de déchets, production de produits chimiques, circulation automobile, etc.) (Arfi C. et al., 2001). L'utilisation et l'élimination de substances chimiques peuvent entraîner une contamination localisée plus grave. De ce

point de vue, les sols constituent un puits naturel pour les dioxines : en dehors des retombées atmosphériques, ils peuvent être pollués par des boues d'épuration ou des composts, des déversements et l'érosion de zones contaminées avoisinantes. La terre est absorbée, directement ou indirectement via des dépôts de poussière sur les végétaux, par du bétail, des chèvres, des moutons et des poulets en liberté qui se nourrissent de plantes, ainsi que par des sangliers et des cochons qui fouissent et mangent aussi des végétaux (Meneses M. et al., 2002). A la suite d'un transport atmosphérique, les retombées de dioxines ou de certains PCBs ayant des toxicités comparables sont également les principales sources de contamination des végétaux à feuilles, des pâturages et des fourrages grossiers. Les feuilles sont soit directement mangées par des animaux en liberté, soit cultivées puis conservées sous forme sèche (foin) ou sous forme d'ensilage. L'épandage de boues d'épuration sur la végétation peut donc augmenter, dans une certaine mesure, l'exposition du bétail (Berg M. V. D. et al., 2000). Les dioxines et les PCBs sont faiblement solubles dans l'eau, mais se fixent sur les particules minérales ou organiques en suspension dans l'eau. Lorsque des émissions de dioxines sont transportées par voie atmosphérique à la surface des mers et océans, elles finissent par s'accumuler dans la chaîne alimentaire aquatique. Les dioxines se concentrent aussi dans les tissus adipeux des bovins, du cheptel laitier, de la volaille, des porcs et des fruits de mer (Weigert P. et al., 1997 ; Wuthe J., 1992). Théoriquement, plus la durée de vie de l'animal est longue, plus les dioxines sont susceptibles de s'accumuler dans ses tissus adipeux. De manière générale, les denrées alimentaires d'origine animale contribuent, à concurrence de 80%, environ à l'exposition humaine globale. La contamination peut varier beaucoup selon l'origine de la denrée alimentaire. La viande, les oeufs, le lait, les poissons d'élevage et d'autres produits alimentaires peuvent être contaminés, à des niveaux dépassant les niveaux de référence, par des dioxines provenant d'aliments pour animaux (Vaz R., 1995 et Vaz R. et al., 1993). Cette contamination peut être également due au niveau élevé d'une contamination environnementale locale, provenant par exemple d'un incinérateur de déchets local, à des accidents, tels que celui qui s'est produit en Belgique en 1999, ou à la teneur élevée en dioxines d'une farine ou d'une huile de poisson. Un exemple récent – et qui a fait grand bruit – de contamination par des « dioxines » est la crise, qui a frappé la Belgique en 1999 : cette contamination a été détectée à travers les effets biologiques directs observés sur des volailles et non à la suite d'un programme de surveillance. Face à cette crise, face à cette contamination par des dioxines de produits alimentaires belges, consécutive elle-même à la contamination d'aliments pour animaux par des PCBs, l'UE a imposé des restrictions

temporaires sur les échanges intra- et extra-communautaires de lait et de produits laitiers, de bœuf, de porc, de volaille, d'œufs et de produits à base d'œufs (mayonnaise et plats préparés, par exemple), ainsi que d'aliments pour bétail (Bernard A. et al., 2002 ; Focant J-F. et al., 2002 et 2003 ). En fait, depuis 1997, quatre autres cas de contamination par des dioxines (pulpe d'agrumes, argile kaolinitique, farine d'herbes déshydratées artificiellement et chlorure de choline) ont été signalés en Europe dans le cadre de programmes locaux de surveillance.

**Chapitre 2**

**Détermination  
du Plomb et du Cadmium**

# **CHAPITRE 2 : DETERMINATION DU PLOMB ET DU CADMIUM**

## **2.1. METHODES D'ANALYSE**

### **2.1.1. Traitement de l'échantillon**

Lors d'une analyse chimique, un traitement des échantillons est généralement nécessaire avant la mesure. Il consiste à détruire la matière organique soit par calcination soit par une attaque à chaud à l'aide d'acides oxydants. Deux voies sont ainsi utilisées : la minéralisation par voie sèche et la minéralisation par voie humide.

#### **2.1.1.1. Minéralisation par voie sèche**

La minéralisation par voie sèche est essentiellement appliquée aux matériaux de nature organique, aux tissus biologiques ou aux échantillons végétaux. En bref, cette méthode consiste en une calcination suivie d'une reprise des cendres par un acide approprié. La calcination réalisée à une température convenablement choisie assure la décomposition de la matière organique. Les éléments minéraux qui y sont liés sont alors transformés en carbonates ou en oxydes. Lors du choix de la température de calcination, il faut s'assurer d'une élimination complète de la matière organique, sans pour autant provoquer une volatilisation partielle ou totale des éléments à doser. Actuellement, les températures communément acceptées pour une minéralisation sont de l'ordre de 450°C à 550°C. Cependant le dosage de certains éléments (As, Se, etc.) sera exclu après un traitement de ce type car ils seraient déjà largement volatilisés. D'autres éléments volatils tels que le plomb et le cadmium supportent ces températures sans pertes, à la condition que la montée en température soit très lente et que toute combustion brusque soit ainsi évitée. (Hoenig M. et Kersabiec A.-M., 1990 et 1995).

Le danger de piéger certains éléments traces dans un résidu qui restera insoluble lors de la dissolution des cendres est également un inconvénient des méthodes par voie sèche : on parle alors d'un phénomène d'insolubilisation ; il peut résulter de la formation d'oxydes réfractaires ou de combinaisons avec d'autres constituants présents ou encore de réactions avec les parois du récipient de calcination (creusets en silice ou en porcelaine) et, pour cette raison, il est préférable d'utiliser des capsules de platine. Pour un dosage par

spectrométrie d'absorption atomique (SAA), les cendres sont généralement reprises par de l'acide nitrique.

Comme exemple pratique, on peut donner le mode opératoire suivant :

- Verser 5 g de lait dans un creuset en quartz
- Ajouter 8 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45% et 2 g de KNO<sub>3</sub>
- Evaporer à sec
- Passer le creuset en quartz dans un four à moufle
- Monter à 350°C en 3 h
- Monter à 450°C en 1 h. Si les cendres sont grises, on reste à 450°C pendant 1 h
- Reprendre par 15 mL d'une solution HCl à 18%
- Chauffer pour solubiliser des échantillons et évaporer sans aller à sec
- Diluer à 25 mL dans une fiole par HCl à 2%.

#### **2.1.1.2. Minéralisation par voie humide**

La minéralisation par voie humide, généralement rapide et efficace, utilise des mélanges d'acides ou des mélanges d'agents à la fois acides et oxydants. Les digestions acides (mise en solution à chaud) peuvent être réalisées en système ouvert (ballon, tube, etc.) ou fermé (bombes en téflon avec ou sans gaine en acier) ; dans ce dernier cas, la minéralisation est effectuée sous pression, ce qui permet d'éviter les pertes d'éléments volatils, la décomposition de l'échantillon étant favorisée par un double effet pression-température. Le chauffage peut être assuré par des moyens conventionnels (plaque chauffante, étuve, etc.) mais on s'oriente aujourd'hui progressivement vers des systèmes utilisant les micro-ondes comme source d'énergie : pour ce mode de chauffage, on distingue les fours utilisant des récipients fermés (bombes) ou les systèmes de micro-ondes focalisées avec des récipients ouverts ou fermés. Pour limiter les pertes éventuelles d'éléments volatils lors de l'utilisation de systèmes ouverts (avec micro-ondes ou non), les récipients de minéralisation doivent être équipés d'un système à reflux.

La plupart des méthodes par voie humide font appel à des mélanges d'agents à la fois acides et oxydants. L'acide nitrique est l'un d'eux, le plus communément utilisé dans les mélanges d'attaque. Son action est souvent renforcée par de l'acide sulfurique, qui permet de dégrader les composés organiques plus résistants et d'augmenter la température d'ébullition du mélange, ou par de l'acide chlorhydrique, plus puissant au moment de la décomposition de la partie minérale de l'échantillon (eau régale). L'addition d'eau



oxygénée aux mélanges d'attaque est particulièrement recommandée pour l'oxydation d'échantillons de nature organique (Hoenig M. et Kersabiec A.-M., 1990 et 1995).

## **2.1.2. Méthodes de mesure**

La spectrométrie d'absorption atomique est la méthode la plus courante pour le dosage des métaux lourds mais parfois, on a pu faire appel à des méthodes électrochimiques.

### **2.1.2.1. Méthodes électrochimiques**

Ces méthodes sont dérivées de la polarographie classique : celle-ci consiste à faire varier le potentiel d'une électrode à gouttes de mercure – c'est l'électrode de travail – par rapport à une électrode de référence et à enregistrer l'intensité du courant qui passe alors entre l'électrode de travail, généralement utilisée comme cathode, et une troisième électrode, appelée contre-électrode. On peut ainsi tracer une courbe intensité/potentiel  $I = f(E)$  qui fait apparaître une vague chaque fois qu'une espèce est réduite. Le potentiel de demi-vague est caractéristique de chaque espèce physico-chimique et la hauteur de chaque pallier est proportionnelle à la concentration de celle-ci dans la solution. Cette méthode ancienne est peu utilisée car elle est longue à mettre en œuvre et assez peu sensible. On lui a substitué différentes techniques qui consistent à effectuer tout d'abord un dépôt de l'espèce à analyser sur l'électrode de travail par réduction cathodique ; ceci revient à réaliser un enrichissement des traces métalliques sur cette électrode qui peut être une électrode de mercure à goutte pendante ou une électrode solide, comme par exemple une électrode de carbone vitreux. Puis on va procéder à une redissolution anodique du dépôt.

Deux techniques peuvent être alors appliquées à cette redissolution anodique: d'une part, la voltampérométrie dans laquelle, imposant à l'électrode de travail un balayage vers des potentiels positifs, on enregistre la courbe  $I = f(V)$  ; d'autre part, la potentiométrie dans laquelle la redissolution est une réoxydation par voie chimique. Dans ce cas, un film de mercure a été préalablement déposé par électrolyse sur une électrode de carbone vitreux pour obtenir ainsi une électrode à film de mercure qui va donner un amalgame avec le métal à analyser; la réoxydation sera ensuite obtenue grâce à des ions mercuriques qui ont été ajoutés au préalable à l'échantillon. On enregistre alors une courbe qui donne le potentiel de l'électrode de travail en fonction du temps : c'est une chronopotentiométrie.

Ces deux techniques ont l'avantage d'être peu coûteuses. Mais elles restent lentes pour un dosage de traces et peuvent conduire à des résultats erronés si elles ne sont pas

étalonnées avec rigueur à différentes concentrations, les pentes des droites n'étant pas identiques pour les valeurs basses, moyennes ou élevées (Gandeboeuf J., 1971 ; Robin J. et al., 1967).

### **2.1.2.2. Méthodes d'absorption atomique**

La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) est une méthode aujourd'hui bien maîtrisée. Avec le même principe de base, on peut faire appel à deux techniques d'atomisation – dans une flamme (SAAF) ou dans un four, par voie électrothermique (SAAE) – qui aboutissent à des limites de détection très différentes, la SAAE étant, selon l'élément analysé, au moins 100 fois plus sensible que la SAAF.

La SAAF, de loin la plus facile à mettre en œuvre, est une méthode applicable au dosage du calcium, du magnésium, du lithium, du zinc, du cuivre et du fer dans les milieux biologiques. Les autres oligo-éléments se trouvant à des teneurs trop faibles ne sont pas accessibles à l'analyse. L'installation de l'appareil, qui est relativement peu onéreux, est aisée ; cependant, on a besoin de gaz, de l'acétylène le plus souvent, du protoxyde d'azote parfois, ce qui implique l'installation d'une hotte d'aspiration et d'un dispositif de sécurité incompatible parfois avec certains bâtiments.

La SAAE est un système dont le fonctionnement et l'apprentissage sont beaucoup plus délicats. L'appareil, nettement plus onéreux que le précédent, offre des possibilités beaucoup plus intéressantes puisque la grande majorité des éléments devient accessible à l'analyse.

En SAA, l'absorption d'un rayonnement électromagnétique par les atomes fournit un puissant instrument analytique, pour l'analyse quantitative surtout. La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) est basée sur ce principe que des atomes libres peuvent spécifiquement absorber un rayonnement électromagnétique à certaines longueurs d'ondes, principalement dans l'UV. La SAA est une méthode mono-élémentaire, utilisée pour l'analyse des métaux dans des échantillons biologiques, métallurgiques, pharmaceutiques ou atmosphériques par exemple. La détermination des espèces atomiques ne peut être réalisée qu'à partir d'un échantillon à l'état gazeux, dans lequel des atomes comme Ag, Al, Au, Fe ou Mg sont dissociés les uns des autres (Hoenig M. et Kersabiec A.-M., 1990).

« En SAA, la source le plus souvent utilisée est une lampe à cathode creuse dont l'anticathode est constituée du même métal que celui à doser ; elle émet un signal, dans le domaine de l'ultraviolet, aux fréquences caractéristiques de cet élément. Le rayonnement émis traverse une vapeur d'atomes générée à haute température, à partir de la solution de

mesure, dans une flamme ou par voie électrothermique (ET-AAS), généralement dans un four graphite (GFAAS- Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry), ce qui permet un gain de sensibilité considérable. Il est absorbé aux mêmes fréquences spécifiques et l'on choisit l'une d'elles, en fonction de la sélectivité, du domaine de linéarité et de la sensibilité recherchés, pour effectuer le dosage qui s'appuie sur un étalonnage préalable dans le milieu de mesure et sur l'utilisation parfois d'un étalon externe » (Ducauze C.J., 2003).

Pour notre étude, nous avons utilisé un système SAA HITACHI – ZEEMAN Z.5000, ayant une température maximale de four à 3000 °C et un atomiseur à 60 positions. Comme il a été précisé par M. Hoenig et A.-M. de Kersabiec (1990) :

« L'avantage de ce système est incontestablement lié à l'effet Zeeman : l'absorbance totale corrigible peut atteindre une valeur voisine de 1,7 UA avec l'effet Zeeman, alors qu'elle est de 0,6 à 0,8 UA avec une source continue au deutérium.

Le fond est mesuré à la longueur d'onde exacte de la raie de l'analyte en spectrométrie Zeeman à effet indirect, alors qu'avec une lampe à deutérium il l'est dans un intervalle défini par la bande passante du spectromètre ; il s'agit donc d'une valeur moyenne. En spectrométrie Zeeman la correction est possible quelle que soit la longueur d'onde ; avec une lampe à deutérium, le domaine spectral est limité à la région de 190 à 360 nm ; de plus, aux courtes longueurs d'onde, la faible intensité du signal émis par cette lampe exige de réduire de façon importante l'intensité du flux de la cathode creuse pour respecter l'équilibre énergétique des deux faisceaux, nécessaire pour un fonctionnement efficace du système. Ceci peut alors avoir pour conséquence une augmentation du bruit de fond, ce qui se traduit par des limites de détection plus élevées.

Toutefois, pour aucune de ces deux méthodes on ne peut affirmer de manière théorique qu'on a l'éventuelle possibilité de corriger efficacement les fonds structurés et les superpositions de raies spectrales. On ne dispose encore que de peu d'information sur les caractéristiques comparées des différents types d'effet Zeeman pour départager objectivement les avantages et inconvénients qu'ils apportent.

Quant à la méthode Smith-Hieftje, basée sur le renversement de raies, les applications sont encore trop peu nombreuses pour que l'on puisse se faire une opinion valable. On peut citer une étude réalisée sur la comparaison des moyens de correction à l'aide d'un arc au deutérium, d'un système Smith-Hieftje et de l'effet Zeeman.

En ce qui concerne la correction de fond par modulation de longueur d'onde, il pourrait s'agir d'une des techniques de l'avenir si les constructeurs consentaient à

s'intéresser au principe et à exploiter les nouveaux types de spectromètres (avec réseau à échelle) ».

On peut ici décrire brièvement la mise en œuvre d'une analyse par SAAE. Après l'introduction de l'échantillon à l'intérieur du tube graphite ou sur la plate-forme, le cycle thermique se déroule en trois étapes principales : séchage, décomposition et atomisation. L'étape de séchage doit assurer l'évaporation du solvant. Ce concept apparemment simple doit être étudié en détail pour éviter des problèmes qui se manifesteraient lors des étapes suivantes et qui se répercuteraient sur la qualité des résultats. L'étape de décomposition de la matrice (pyrolyse, minéralisation) permet ensuite de simplifier la matrice de l'échantillon, d'éliminer les fumées, les vapeurs moléculaires et autres constituants formés lors de la minéralisation des substances organiques. Durant cette étape, des réactions chimiques telles que la formation d'oxydes ou de carbures, ont également lieu. Elle représente par conséquent l'un des paramètres les plus critiques du programme électrothermique. L'étape d'atomisation permet enfin de dissocier la matrice résiduelle et d'atomiser le plus sélectivement possible l'élément dosé. La température appliquée et la durée de l'étape doivent être suffisantes pour entraîner l'atomisation complète de l'analyte en évitant les effets de mémoire pouvant apparaître ultérieurement. (Hoenig M. et Kersabiec A.-M., 1995).

L'intensité de l'absorption dépend directement du nombre de particules absorbant la lumière et, selon la loi de Beer Lambert, l'absorbance est proportionnelle au coefficient d'absorption spécifique  $\epsilon$ , au trajet optique  $\ell$  et à la concentration  $C$ .

$$A = \log I_0/I = \epsilon \ell C$$

où  $I$  = intensité après absorption par les atomes

$I_0$  = intensité initiale de la source lumineuse.

En pratique cependant, cette relation n'est pas toujours vérifiée : on n'obtient pas toujours une droite. C'est le cas si la concentration devient trop élevée. On préférera choisir pour le dosage le domaine dans lequel la courbe d'étalonnage est pratiquement une droite. Il est limité pour les faibles concentrations par la limite de détection et, pour les fortes concentrations, par le fait qu'à une très forte variation de la concentration correspond une faible variation de l'absorbance. La gamme de dosage est généralement donnée par le constructeur. Elle dépend de la raie choisie pour la mesure.

## 2.2. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES RELATIVES AU DOSAGE DU PLOMB ET DU CADMIUM DANS LE LAIT

D'après Galal-Gorchev H. (1993), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recommandé en 1987 des seuils à ne pas dépasser, en doses hebdomadaires tolérables provisoires (DHTP) : exprimées en microgramme par kg de poids corporel ( $\mu\text{g/Kc}$ ), elles sont de  $25 \mu\text{g/Kc}$  pour le plomb et de  $7 \mu\text{g/Kc}$  pour le cadmium. Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France a émis une recommandation pour les produits laitiers fixant à  $0,050 \text{ mg.kg}^{-1}$  la teneur maximale en plomb et préconisant l'absence de cadmium. Le codex alimentarius recommande en revanche une teneur maximale de  $0,020 \text{ mg.kg}^{-1}$  de plomb dans les produits laitiers. Les analyses de risques actuelles, fortement imprégnées du principe de précaution, devraient conduire à adopter prochainement cette recommandation au niveau français.

L'introduction des micro-ondes comme technique rapide de chauffage et l'utilisation d'eau oxygénée comme agent oxydant ont permis de diminuer dans un rapport de 1 à 10 les durées de minéralisation de certaines matrices agro-alimentaires. L'apport d'énergie est ici basé sur l'action directe des micro-ondes sur le milieu réactionnel qui permet d'agir sur la cinétique de la réaction. L'attaque acide est menée sans catalyseur ni produit anti-mousse et l'eau oxygénée est choisie comme agent oxydant pour compléter la minéralisation. L'acide nitrique est l'un des agents les plus utilisés dans les mélanges d'attaque, lors qu'on applique la technique des micro-ondes à la minéralisation d'échantillons de lait.

Frkovic A. et al. (1997) ont déterminé le plomb et le cadmium dans 29 échantillons de lait humain du nord de la Croatie par SAAE avec correction Zeeman : la limite de détection de la méthode sur le blanc est d'environ  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb et  $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium.

Swarup D. et al. (1997) ont minéralisé par l'acide nitrique des échantillons de sang et de lait de vache récoltés à Kanfur, une ville de l'Inde. Ils ont dosé le plomb et le cadmium par SAA. La teneur des métaux dans le lait est comprise entre  $0,28 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $0,36 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le plomb ; entre  $0,004 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $0,014 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le cadmium.

Pour le traitement des échantillons avant la mesure, Jorhem L. et al. (2000) ont utilisé une méthode de minéralisation par voie humide avec des mélanges de  $\text{HNO}_3$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans un système à micro-ondes. Une méthode de minéralisation par voie sèche dans un four à  $450^\circ\text{C}$  a également été utilisée. Le plomb, le cadmium, le zinc, le cuivre et le fer

ont été déterminés dans divers aliments (lait, poisson, blé etc.) en utilisant les techniques de flamme et de four. Les quantités détectées vont de  $0,155 \text{ mg.kg}^{-1}$  à  $1,62 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour le plomb et de  $0,0124 \text{ mg.kg}^{-1}$  à  $0,482 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour le cadmium.

Larsen E. H. et al. (1991) ont minéralisé des échantillons de lait danois au moyen d'acide nitrique dans une bombe à  $160^{\circ}\text{C}$  durant 4 heures. Ils ont ajouté un mélange de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  et  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  pour modifier la matrice d'échantillon. Puis ils ont appliqué la spectrométrie d'absorption atomique électrothermique avec une correction Zeeman pour le dosage du plomb, du cadmium et du chrome. La limite de détection de la méthode est d'environ  $0,7 \text{ ng.g}^{-1}$  pour le cadmium.

Pour déterminer des métaux dans le lait de chèvre, Krelowska-Kulas M. et al. (1999) ont directement collecté 294 échantillons de lait dans six fermes d'élevage du sud de la Pologne. Les échantillons de lait cru et de lait pasteurisé ont été séchés à sec dans des creusets en quartz. Puis, ceux-ci ont été mis dans un four à moufle pour une minéralisation à  $400^{\circ}\text{C}$ . Le temps de calcination est de 10 à 20 heures jusqu'à l'obtention de cendres blanches. Ils ont utilisé de l'acide nitrique pour la reprise des cendres et ont ensuite déterminé le plomb et le cadmium par SAA : les teneurs mesurées dans le lait vont de  $2 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  à  $212 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb ; de  $2 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  à  $60 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd.

Plockinger B. et al. (1996), en Pologne encore, ont déterminé le plomb, le cuivre et le cadmium par SAA dans 64 échantillons de sérum d'enfants nouveaux-nés et du lait de leurs mères. La concentration des métaux lourds dans le lait humain est d'environ  $88,4 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb ;  $0,14 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le mercure et  $2,75 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium.

Tahvonen R. et al. (1995) ont déterminé par SAAE les métaux lourds dans des échantillons de laits bas-gras, de fromages et d'œufs de consommation en Finlande. Ils ont obtenu une teneur en plomb qui varie entre 1 et  $7 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour le lait, 17 et  $60 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour le fromage, et qui est de  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour l'œuf.

Ayyadurai K et al. (1998) ont dosé certains métaux lourds dans le lait de Madras, ville située en Inde, par ICP-MS (Spectrométrie d'émission dans un plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie de masse). Ils ont obtenu une teneur en plomb dans le lait de vache et le lait de bufflesse qui va respectivement de  $4,0 \text{ ng.mL}^{-1}$  à  $36,6 \text{ ng.mL}^{-1}$ , et de  $4,0 \text{ ng.mL}^{-1}$  à  $25,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ . La teneur en cadmium est inférieure à la limite de détection.

Hallen I. P. et al. (1995) ont déterminé le plomb et le cadmium par SAA dans le lait et le sang des mères, six semaines après leur accouchement. Ils ont trouvé une teneur dans le lait qui se situe entre  $0,3$  et  $1,1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb, entre  $0,02$  et  $0,1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium ; et dans le sang, entre  $24$  et  $40 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb, entre  $0,6$  et  $1,2 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  pour

le cadmium. La teneur en plomb est de  $0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans le lait de femmes vivant dans une région où il y a des usines métallurgiques, de  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans le lait de femmes vivant dans une région où il n'y a pas d'usines métallurgiques. La teneur en cadmium dans le sang des fumeuses est de  $1,12 \mu\text{g.L}^{-1}$  et de  $0,87 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans le sang des non-fumeuses.

Pour doser des métaux toxiques (Pb et Cd) et des métaux essentiels (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn) par SAAF, Sikiric M. et al. (2003) ont eu recours à des mélanges de  $\text{HNO}_3$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans un système à micro-ondes pour minéraliser des échantillons de lait provenant de la région de Zagreb en Croatie. La limite de détection de la méthode sur le blanc est d'environ  $0,10 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour le plomb et  $0,032 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour le cadmium. Après la minéralisation des échantillons, ils ont utilisé des mélanges de APDC (pyrrolidine-1-dithiocarboxylic ammonium) et MIBK (méthyl-isobutylcétone) pour extraire plomb et cadmium. La teneur des métaux dans le lait est comprise entre  $23,06 \mu\text{g.kg}^{-1}$  et  $70,56 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (moins de  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) pour le plomb ; entre  $3,02 \mu\text{g.kg}^{-1}$  et  $6,47 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (moins de  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) pour le cadmium.

Cerkvenik V et al. (2000) ont déterminé des éléments traces, des pesticides organochlorés et PCBs dans le lait de vache : sur 108 échantillons provenant de 19 laiteries slovènes. Les échantillons ont été minéralisés par voie sèche à  $450^\circ\text{C}$ , puis le plomb et le cadmium ont été dosés par SAAF. La concentration en plomb est d'environ  $0,07 \text{ mg.kg}^{-1}$ , avec une limite de détection d'environ  $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$  ; la limite de détection pour le cadmium est d'environ  $0,003 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Le lait de chèvre tient un rôle important dans la nutrition des enfants allergiques au lait de vache. Hejtmankova A. et al. (2002) ont déterminé des métaux lourds (Cd, Cu, Fr, Pb, Zn) et des macroéléments (Ca, Cl et Mg) dans le lait de chèvre de deux fermes privées en République Tchèque. Ils ont utilisé la une SAAF pour doser le calcium, le magnésium et le zinc ; la SAAE pour doser le plomb, le cadmium et le cuivre. La limite de détection de la méthode sur l'échantillon est d'environ  $30,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le plomb et  $2,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le cadmium. La concentration des métaux lourds dans le lait de chèvre est d'environ  $18,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour le plomb et  $2,91 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour le cadmium.

Leotsinidis M. et al. (2005) ont présenté les résultats de leurs recherches en Grèce sur le lait de 180 femmes après leur accouchement. Les échantillons de lait ont été collectés durant les années 2000-2002 : au total, 85 échantillons de 50 mL de lait ont été collectés, trois jours après l'accouchement et 95 échantillons de 50 mL, quatorze jours après l'accouchement. Ils ont utilisé  $\text{HNO}_3$  pour minéraliser à  $150^\circ\text{C}$  10 mL de lait dans un tube en polyéthylène. Ils ont déterminé un ensemble de métaux lourds (Zn, Fe, Mn, Cu, Cd, Pb)

par SAAE : la limite de détection de la méthode appliquée au blanc est d'environ  $0,010 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd ;  $0,20 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb ;  $0,10 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Mn ;  $0,15 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cu ;  $39 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Fe et  $11 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Zn. Ils ont trouvé une teneur dans le lait est d'environ  $0,190 \pm 0,150 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd ;  $0,48 \pm 0,60 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb ;  $381 \pm 132 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cu ;  $4905 \pm 1725 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Zn ;  $4,79 \pm 3,23 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Mn ;  $544 \pm 348 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Fe. Mais, ils ont utilisé un standard ( $0,218 \mu\text{g.g}^{-1}$  pour Cd ;  $1,0 \mu\text{g.g}^{-1}$  pour Pb...) pour vérifier la méthode utilisant la SAAE (Perkin Elmer avec HGA 400). Les résultats trouvés se situent entre  $0,197$  et  $0,223 \mu\text{g.g}^{-1}$  pour Cd ; entre  $0,95$  et  $1,17 \mu\text{g.g}^{-1}$  pour Pb. Ce résultat se répond qu'a un problème sur le résultat de la limite de détection de leur méthode.

En Espagne, Cava-Montesinos P. et al. (2005) ont utilisé 3 méthodes pour le traitement d'échantillons de lait:

- Méthode A :

- +  $2 \text{ g } (\pm 0,1 \text{ mg})$  de lait liquide ou  $0,5 \text{ g } (\pm 0,1 \text{ mg})$  de lait en poudre
- + Ajouter  $2 \text{ mL}$  d'eau
- + Passer aux ultrasons durant  $10$  minutes
- + Diluer à  $10 \text{ mL}$  par la solution  $\text{HNO}_3$  ( $2 \%$ )

- Méthode B :

- +  $2 \text{ g } (\pm 0,1 \text{ mg})$  de lait liquide ou  $0,5 \text{ g } (\pm 0,1 \text{ mg})$  de lait en poudre avec  $2 \text{ ml}$  d'eau nano-pure.
- + Utiliser un mélange  $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$  dans un système à micro-ondes pour minéraliser l'échantillon
- + Diluer à  $10 \text{ mL}$  par la solution  $\text{HNO}_3$  ( $2 \%$ )

- Méthode C :

- +  $2 \text{ g } (\pm 0,1 \text{ mg})$  de lait liquide ou  $0,5 \text{ g } (\pm 0,1 \text{ mg})$  de lait en poudre
- + Diluer à  $10 \text{ mL}$  par de l'eau nano-pure

Ils ont ainsi déterminé 45 éléments par ICP-MS avec une limite de détection de la méthode sur le blanc qui est d'environ  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd ;  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb. La concentration des métaux lourds dans le lait est d'environ  $4,2 \pm 0,2 \text{ ng.g}^{-1}$  pour le plomb et  $3,6 \pm 0,2 \text{ ng.g}^{-1}$  pour le cadmium.

Leotsinidis M. et al. (2005) et Cava-Montesinos P. et al. (2005) ont donné les résultats de la limite de détection très bas (la limite de détection comme trois fois de l'écart-type des blancs). Nous n'avons pas utilisé cette méthode de calcul dans nos recherches.



Santos E.E et al. (2004) ont utilisé l'ICP-MS pour doser divers éléments traces (Al, Cu, Mn, Zn, Cd, Cr, Ni, Pb, U) dans des aliments au Brésil. Ils ont prélevé un échantillon de 0,20g sur 1 litre de lait évaporé à sec puis ajouté 10 mL d'acide nitrique à 65 % dans un tube en polypropylène. Les échantillons ont été minéralisés au 90 °C durant 72 heures. La teneur des métaux dans le lait est comprise entre 46  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 397  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le plomb ; entre 0,03  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 5,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le cadmium ; entre 0,07  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 0,1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour l'aluminium ; entre 0,001  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 0,012  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le cuivre ; entre 0,05  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 0,07  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le manganèse ; entre 0,05  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 0,1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le zinc ; entre 0,4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 1,7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le chrome ; entre 1,1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 12  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le nickel ; entre 0,1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 0,7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour l'uranium.

Licata P. et al. (2004) ont prélevé 40 échantillons de lait en Calabre (Italie) qui ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ils ont utilisé un mélange  $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$  (5 :2) dans un système à micro-ondes pour minéraliser 1,0 g d'échantillon, étendu à 25 mL et des modificateurs ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  et l'acide ascorbique) pour modifier les matrices d'échantillons de lait. Ils ont appliqué la SAAE pour doser des métaux (Cd, Pb, As, Zn, Cu, Se, Cr). La teneur des métaux dans le lait de Calabre est comprise entre  $<0,01$  et 22,80  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le cadmium ; entre 0,10 et 9,92  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le plomb ; entre 0,15 et 684,00  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour l'arsenic ; entre 24,76 et 4961  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le zinc ; entre 0,136 et 737,58  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le cuivre ; entre 1,5 et 82,08  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le chrome ; entre 1,060 et 110,58  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le sélénium.

Pour déterminer la teneur de 26 éléments dans les formules infantiles aux Etats-Unis, au Royaume-Uni, au Nigeria, Ikem A. et al. (2002) ont utilisé un mélange  $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$  pour minéraliser des échantillons dans un système à micro-ondes, le dosage étant réalisé par ICP-OES (spectrométrie d'émission optique par plasma à couplage inductif). Ils n'ont pas détecté de cadmium dans les formules infantiles aux Etats-Unis et au Nigeria, ni dans les formules infantiles en poudre au Royaume-Uni. La teneur en cadmium dans les formules infantiles liquides au Royaume-Uni est d'environ  $0,3 \pm 0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Ils n'ont pas détecté de plomb dans les formules infantiles aux Etats-Unis. Cependant, ils ont trouvé une teneur en plomb dans les formules infantiles qui était d'environ  $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  au Nigeria ; de  $0,8 \pm 1,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  au Royaume-Uni.

Après avoir minéralisé les échantillons de lait dans un système à micro-ondes avec un mélange  $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$ , Martino F.A.R et al. (2001) ont dosé 15 métaux par ICP-MS. La limite de détection de la méthode sur le blanc (standards dans de l'eau ultrapure) est d'environ 0,25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd et de 0,92  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb. La teneur en cadmium est

d'environ  $0,53 \pm 0,17 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le lait humain ;  $0,50 \pm 0,19 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le lait de vache UHT ;  $0,47 \pm 0,13 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le lait de vache et  $0,71 \pm 0,18 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour les formules de lait infantile. La teneur en plomb est d'environ  $1,5 \pm 0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le lait humain ;  $2,1 \pm 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le lait de vache UHT ;  $1,8 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le lait de vache et  $5,6 \pm 0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour les formules de lait infantile.

Coni E. et al. (2000) ont prélevé 30 échantillons et dosé 12 éléments traces et éléments mineurs dans le lait humain par ICP-MS. Ils ont utilisé un mélange de 1,5 mL  $\text{HNO}_3$  (65%) et 0,5 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) pour minéraliser 1,5 g d'échantillon de lait dans un système à micro-ondes. La teneur des éléments est d'environ  $0,7 - 4,6 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le cadmium ;  $2 - 30 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le plomb ;  $0,9 - 4,7 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le baryum ;  $0,09 - 20 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le bismuth ;  $180 - 751 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le cuivre ;  $700 - 4000 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le zinc ;  $3 - 40 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le manganèse ;  $9500 - 62500 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le magnésium ...

Tripathi R.M et al. (1999) ont minéralisé des échantillons par voie sèche à  $400^\circ\text{C}$  et déterminé la teneur des métaux dans le lait et les produits laitiers : elle est comprise entre  $1,7$  et  $3,35 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb, entre  $0,07$  et  $0,10 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium, entre  $43,2$  et  $195 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cuivre et entre  $1772$  et  $4230 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le zinc. Ils ont utilisé la SAAF pour doser le cuivre et le zinc, la redissolution anodique par voltampérométrie impulsionnelle différentielle pour doser le plomb et le cadmium.

Rossipal E. et al. (1998) ont dosé 19 éléments traces dans 79 d'échantillons de lait de 46 mères en bonne santé, prélevés entre 1 et 293 jours après leur accouchement. Voici les teneurs de quelques éléments : pour le cadmium,  $1,3 \pm 1,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  (1-3 jours) ;  $0,22 \pm 0,26 \mu\text{g.L}^{-1}$  (42-60 jours) ;  $0,26 \pm 0,19 \mu\text{g.L}^{-1}$  (97-293 jours) ;  $2,3 \pm 2,9 \mu\text{g.L}^{-1}$  (1-3 jours) ; pour le plomb,  $2,4 \pm 3,3 \mu\text{g.L}^{-1}$  (42-60 jours) et  $0,9 \pm 1,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  (97-293 jours) ... Ils ont utilisé un mélange de 1,5 mL  $\text{HNO}_3$  et 0,5 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) pour minéraliser 1,5 mL d'échantillon de lait dans un système à micro-ondes. Les dosages du plomb et du cadmium ont été réalisés par ICP-MS. La limite de détection de la méthode est d'environ  $0,90 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium et  $0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb.

Coni E. et al. (1996) ont déterminé des éléments traces et des éléments mineurs dans les laits de mouton et de chèvre dans divers produits laitiers par SAAE – Zeeman et par ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif). Les échantillons de lait ont été minéralisés par voie sèche à  $420^\circ\text{C}$ . La concentration du cadmium est en moyenne  $< 0,03 \mu\text{g.g}^{-1}$  de matière sèche (MS) pour le lait cru de vache,  $< 0,17 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS pour le lait cru de mouton,  $< 0,15 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS pour le lait cru de chèvre. La

teneur en plomb est en moyenne  $< 0,07 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS pour le lait cru de vache,  $< 0,10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS pour le lait cru de mouton et  $< 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS pour le lait cru de chèvre.

Dans le cadre d'un grand programme de recherche sur le lait et les produits laitiers initié en Italie par le Conseil National de la Recherche, Coni E. et al. (1995) ont déterminé un ensemble d'éléments traces (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Pt, Sr, et Zn) par SAAE-Zeeman et ICP-AES. Une méthode de minéralisation par voie sèche à  $420^{\circ}\text{C}$  a été appliquée aux échantillons de lait. Les teneurs des éléments, exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de M.S., sont comprises dans les intervalles 0,095 – 0,160 pour le plomb ; 0,066 – 0,130 pour le cadmium ; 0,010 – 0,079 pour le cobalt ; 0,198 – 0,284 pour le chrome ...

Caggiano R. et al. (2005) ont déterminé les niveaux de concentration de certains métaux dans le fourrage, le lait, les produits laitiers, et les tissus prélevés dans les fermes ovines en Italie méridionale par SAAE. Ils ont utilisé un mélange de 6,0 mL  $\text{HNO}_3$  (65%), 1,0 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) et de 0,5 mL HF pour minéraliser 0,5g d'échantillon ou un mélange de 6,0 mL  $\text{HNO}_3$  (65%), 1,0 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) pour minéraliser 0,3g d'échantillon dans un système à micro-ondes à  $70^{\circ}\text{C}$ , durant 48 heures. Les concentrations dans le lait, en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS, sont d'environ  $0,20 \pm 0,06$  pour le plomb ;  $0,06 \pm 0,02$  pour le cadmium ;  $0,20 \pm 0,13$  pour le chrome ;  $0,13 \pm 0,03$  pour le manganèse et  $0,0025 \pm 0,0008$  pour le mercure.

Pour doser le plomb, le cadmium, l'arsenic et le zinc dans du lait en poudre par ICP-MS, Ho C.-Y. et al. (2002) ont utilisé des modificateurs de matrice (acide ascorbique, Triton X-100) après avoir minéralisé les échantillons par voie sèche à  $400^{\circ}\text{C}$  ou dilué à 1,0% (m/v). La limite de détection de la méthode est d'environ  $0,20 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  pour le cadmium ;  $2,0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  pour le plomb ;  $37,0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  pour le zinc et  $3,0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  pour le chrome. La teneur des éléments dans le lait en  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  est d'environ  $50 \pm 5$  pour le plomb ;  $0,2 \pm 0,1$  pour le cadmium ;  $3,0 \pm 0,8$  pour le chrome et  $28600 \pm 600$  pour le zinc.

Antunovic Z. et al. (2005) ont déterminé par SAA la concentration de quelques éléments toxiques (Cd, Pb, Hg, As) dans le lait de brebis pour essayer d'établir un lien avec l'étape de lactation. Ils ont utilisé un mélange de  $\text{HNO}_3$  et  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pour minéraliser les échantillons de lait avec des paliers de température à  $120^{\circ}\text{C}$ ,  $240^{\circ}\text{C}$  et  $200^{\circ}\text{C}$ . Les teneurs trouvées sont les suivantes :

- $0,035 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le plomb ;  $0,011 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le cadmium ;  $0,026 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le mercure et  $0,011 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour l'arsenic (2 jours après la mise bas).
- $0,022 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le plomb ;  $0,004 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le cadmium ;  $0,023 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour le mercure et  $0,025 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  pour l'arsenic (10 jours après la mise bas).

- 0,024 mg.kg<sup>-1</sup> pour le plomb ; 0,005 mg.kg<sup>-1</sup> pour le cadmium ; 0,025 mg.kg<sup>-1</sup> pour le mercure et 0,028 mg.kg<sup>-1</sup> pour l'arsenic (30 jours après la mise bas).
- 0,026 mg.kg<sup>-1</sup> pour le plomb ; 0,006 mg.kg<sup>-1</sup> pour le cadmium ; 0,021 mg.kg<sup>-1</sup> pour le mercure et 0,029 mg.kg<sup>-1</sup> pour l'arsenic (60 jours après la mise bas).

En Slovaquie, Ursinyova M. et al. (2005) ont étudié les teneurs en cadmium, plomb et mercure dans le lait de femmes, 4 jours après leur accouchement. Ils ont prélevé 158 échantillons de femmes en bonne santé mais avec des conditions différentes (fumeuse ou non-fumeuse, âge, endroit, taille du bébé ...). Ces échantillons ont été placés dans un congélateur à - 18 °C puis minéralisé au moyen d'un mélange HNO<sub>3</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La teneur des éléments toxiques dans le lait est d'environ 0,43 µg.kg<sup>-1</sup> pour le cadmium ; 4,7 µg.kg<sup>-1</sup> pour le plomb et 0,94 µg.kg<sup>-1</sup> pour le mercure. La limite de détection de la méthode est d'environ, 032 µg.kg<sup>-1</sup> pour le cadmium ; 0,65 µg.kg<sup>-1</sup> pour le plomb ; 0,18 µg.kg<sup>-1</sup> pour le mercure.

Deux méthodes ont été appliquées par Karadjova I. et al. (2000) pour le traitement des échantillons en vue d'un dosage par SAAE du cadmium, du cobalt, du chrome, du cuivre, du fer, du nickel et du plomb dans du lait, du fromage et du chocolat : dans l'une, la minéralisation a été réalisée au moyen d'un mélange d'acide nitrique et d'acide perchlorique ; dans l'autre, c'est un mélange d'acide nitrique et d'eau oxygénée qui a été utilisé pour la minéralisation, et le Triton X-100 comme modificateur de matrice.

Les limites de détection sont d'environ 0,3 ng.g<sup>-1</sup> pour Cd ; 20 ng.g<sup>-1</sup> pour Co ; 3,0 ng.g<sup>-1</sup> pour Cr ; 7 ng.g<sup>-1</sup> pour Cu ; 20 ng.g<sup>-1</sup> pour Fe ; 15 ng.g<sup>-1</sup> pour Ni ; 15 ng.g<sup>-1</sup> pour Pb. Les teneurs dans le lait, exprimées en ng.g<sup>-1</sup>, sont d'environ 19,0 ± 8% pour Cd ; 190 ± 3,6% pour Cr ; 770 ± 2,3% pour Cu ; 9,1 ± 4,1% pour Fe ; 150 ± 5,2% pour Ni ; 21,0 ± 6,3% pour Pb.

Milačić R. et al. (2003) ont effectué des déterminations de zinc, de cuivre, de cadmium, de plomb, de nickel et de chrome dans les produits alimentaires en Slovénie. Ils ont utilisé un mélange de HNO<sub>3</sub> et HF pour minéraliser les échantillons dans un système à micro-ondes et la SAAE pour le dosage des métaux. La limite de détermination de la méthode est d'environ 0,35 mg.kg<sup>-1</sup> pour Zn ; 1,0 mg.kg<sup>-1</sup> pour Cu ; 0,03 mg.kg<sup>-1</sup> pour Cd ; 0,2 mg.kg<sup>-1</sup> pour Pb ; 0,2 mg.kg<sup>-1</sup> pour Ni et 0,05 mg.kg<sup>-1</sup> pour Cr. La teneur des métaux dans les laits des formules infantiles est en moyenne < 0,03 mg.kg<sup>-1</sup> pour Cd ; < 0,2 mg.kg<sup>-1</sup> pour Pb...

Les concentrations de cadmium et de plomb dans différents types de lait ont été déterminées par Rodriguez E.M.R et al. (1999) par SAAE. Ils ont utilisé un mélange HNO<sub>3</sub>

/ HClO<sub>4</sub> (9 :1) pour minéraliser les échantillons dans un système à micro-ondes. La teneur en cadmium est comprise entre 0,6 et 11,3 µg.L<sup>-1</sup> dans le lait humain ; entre 0,7 et 23,1 µg.L<sup>-1</sup> dans le lait de vache ; entre 3,4 et 5,9 µg.L<sup>-1</sup> dans le lait pasteurisé de vache ; entre 1,0 et 18,4 µg.L<sup>-1</sup> dans le lait de chèvre et entre 3,4 et 4,1 µg.L<sup>-1</sup> dans les formules infantiles. La teneur en plomb est comprise entre 0,1 et 32,3 µg.L<sup>-1</sup> dans le lait humain ; entre 1,3 et 39,1 µg.L<sup>-1</sup> dans le lait de vache ; entre 6,9 et 19,6 µg.L<sup>-1</sup> dans le lait pasteurisé de vache ; entre 0,4 et 38,5 µg.L<sup>-1</sup> dans le lait de chèvre et entre 5,1 et 10,6 µg.L<sup>-1</sup> dans les formules infantiles.

Karavoltzos S. et al. (2002) ont dosé le cadmium dans les produits alimentaires du marché grec par SAAE-Zeeman. Ils ont utilisé de 8 à 12 mL d'acide nitrique pour minéraliser des échantillons analytiques de 0,5g dans un système à micro-ondes à 120°C, durant 5 heures. Les teneurs en cadmium, exprimées en ng.g<sup>-1</sup>, sont d'environ 0,6 ± 0,2 pour le lait entier cru ; 1,0 ± 1,0 pour le lait entier déshydraté ; 1,5 ± 0,2 pour le lait maigre du chocolat.

**Tableau 2 : Travaux réalisés sur le Plomb**

Auteur, année	Méthode de traitement	Méthode de dosage	Teneur dans le lait	Limite de détection
Frkovic A. et al. (1997)	Micro-ondes	SAAE-Zeeman	-	1 µg.L <sup>-1</sup>
Swarup D. et al. (1997) ( <i>Kanfur en Inde</i> )	Voie humide	SAA	0,28-0,36 mg.L <sup>-1</sup>	-
Jorhem L. et al. (2000)	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	SAA	0,155-1,620 mg.kg <sup>-1</sup>	
Krelowska-Kulas M. et al. (1999) ( <i>Pologne</i> )	Voie sèche	SAAE	2-212 µg.L <sup>-1</sup>	-
Plockinger B. et al. (1996) ( <i>Pologne</i> )	-	SAAE	88,4 µg.L <sup>-1</sup> (lait humain)	-
Hallen I. P. et al. (1995)	-	SAAE	0,3-1,1 µg.L <sup>-1</sup>	-
Tahvonen R. et al. (1995) ( <i>Finlande</i> )	-	SAAE	1-7 g.kg <sup>-1</sup>	
Ayyadurai K et al. (1998) ( <i>Inde</i> )	-	ICP-MS	4,0-36,6 ng.mL <sup>-1</sup>	-
Sikiric M. et al. (2003) ( <i>Croatie</i> )	(HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	SAAF	23,06-70,56 µg.kg <sup>-1</sup>	100 µg.kg <sup>-1</sup> (blanc)
Cerkvenik V. (2000) ( <i>Slovénie</i> )	Voie sèche à 450 °C	SAAF	0,07 mg.kg <sup>-1</sup>	50 µg.kg <sup>-1</sup>
Hejtmankova A. et al. (2002) ( <i>République Tchèque</i> )		SAAE	18,5 mg.kg <sup>-1</sup>	30 µg.kg <sup>-1</sup>
Leotsinidis M. et al. (2005) ( <i>Grèce</i> )	(HNO <sub>3</sub> ) 150°C, 3h	SAA	< 2,36 µg.L <sup>-1</sup>	0,2 µg.kg <sup>-1</sup> (blanc)
Cava-Montesinos P. et al. (2005) ( <i>Espagne</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-MS	4,2 ± 0,2 ng.g <sup>-1</sup>	0,05 µg.kg <sup>-1</sup> (blanc)
Santos E.E. et al. (2004) ( <i>Brésil</i> )	(HNO <sub>3</sub> )	ICP-MS	46-397 µg.kg <sup>-1</sup>	-
Licata P. et al. (2004) ( <i>Italie</i> )		SAAE	0,10-9,92 µg.kg <sup>-1</sup>	-
Ikem A. et al. (2002) ( <i>Nigeria</i> ) ( <i>UK</i> ) ( <i>USA</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-OES	en µg. L <sup>-1</sup>  0,4±0,1 0,8±0,4 -	-
Martino F.A.R. et al. (2001) ( <i>Espagne</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-MS	1,5±0,4 µg.L <sup>-1</sup>	0,92 µg.L <sup>-1</sup>
Coni E. et al. (2000) ( <i>Italie</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-MS	2-30 µg.L <sup>-1</sup>	-
Tripathi R.M. et al. (1999) ( <i>Inde</i> )	Voie sèche à 400 °C	SAAF	1,70- 3,35 µg.L <sup>-1</sup>	-
Rossipal E. et al. (1998) ( <i>Autriche</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-MS	0,9- 2,4 µg.L <sup>-1</sup>	0,6 µg.L <sup>-1</sup>

Coni E. et al. (1996) ( <i>Italie</i> )	Voie sèche à 420 °C	ICP-AES	0,05-0,10 µg.g <sup>-1</sup>	-
Coni E. et al. (1995) ( <i>Italie</i> )	Voie sèche à 420 °C	ICP-AES	0,095-0,160 µg.g <sup>-1</sup>	-
Caggiano R. et al. (2005) ( <i>Italie</i> )	(HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	SAA	0,20±0,06 µg.g <sup>-1</sup>	-
Ho C.-Y. et al.(2002) ( <i>Taiwan</i> )	400°C	ICP-MS	50±5 ng.g <sup>-1</sup>	2,0 µg.kg <sup>-1</sup>
Antunovic Z. et al. (2005) ( <i>Croatie</i> )	HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	SAAE	0,022-0,035 mg.kg <sup>-1</sup>	-
Ursinyova M. et al. (2005) ( <i>Slovakia</i> )	(HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	SAAE	4,7 µg.kg <sup>-1</sup>	0,65 µg.kg <sup>-1</sup>
Karadjova I. et al. (2000) ( <i>Bulgarie</i> )	HNO <sub>3</sub> + HClO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SAAE	21,0±6,3% ng.g <sup>-1</sup>	15 µg.kg <sup>-1</sup>
Milacic R. et al. (2003) ( <i>Slovénie</i> )	HNO <sub>3</sub> + HF	SAAE	< 0,2 mg.kg <sup>-1</sup>	200 µg.kg <sup>-1</sup>
Rodriguez E. M. et al. (1999) ( <i>Espagne</i> )	HNO <sub>3</sub> + HClO <sub>4</sub>	SAAE	0,1-32,3 (LH) 1,3-39,1 (LV) 5,1-10,6 (LI) µg.L <sup>-1</sup>	-

**Tableau 3 : Travaux réalisés sur le Cadmium**

Auteur, année	Méthode de traitement	Méthode de dosage	Teneur dans le lait	Limite de détection
Frkovic A. et al. (1997)	<b>Micro-ondes</b>	SAAE-Zeeman	-	0,3 µg.L <sup>-1</sup>
Swarup D. et al. (1997) ( <i>Kanfur en Inde</i> )	Par voie humide	SAA	0,004-0,014 mg.L <sup>-1</sup>	-
Jorhem L. et al. (2000)	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	SAAE	0,012-0,482 mg.kg <sup>-1</sup>	
Larsen E.H. et al. (1991)	Dans une bombe (160 <sup>0</sup> C), HNO <sub>3</sub>	SAAE	-	0,7 µg.kg <sup>-1</sup>
Krelowska-Kulas M. et al.(1999) ( <i>Pologne</i> )	Voie sèche	SAAE	2-60µg.L <sup>-1</sup>	-
Plockinger B. et al. (1996) ( <i>Pologne</i> )	-	SAA	2,75 µg.L <sup>-1</sup> (lait humain)	-
Hallen I. P. et al. (1995)	-	SAA	0,02-0,1µg.L <sup>-1</sup>	-
Milhaud G.E et al. (2000) ( <i>France</i> )	-	SAAE	1,44- 3,54 µg.L <sup>-1</sup>	0,2 µg.L <sup>-1</sup>
Sikiric M. et al. (2003) ( <i>Croatie</i> )	(HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	SAAF	3,02-6,47 µg.kg <sup>-1</sup>	32 µg.kg <sup>-1</sup> (blanc)
Cerkvenik V. (2000) ( <i>Slovénie</i> )	Voie sèche à 450 °C	SAAF	-	3 µg.kg <sup>-1</sup>
Hejtmankova A. et al. (2002) ( <i>République Tchèque</i> )		SAAE	2,91 mg.kg <sup>-1</sup>	2 µg.kg <sup>-1</sup>
Leotsinidis M. et al. (2005) ( <i>Grèce</i> )	(HNO <sub>3</sub> ) 150°C, 3h	SAA	< 0,696 µg.L <sup>-1</sup>	0,01 µg.kg <sup>-1</sup> (blanc)
Cava-Montesinos P. et al.(2005) ( <i>Espagne</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-MS	3,6 ± 0,1 ng.g <sup>-1</sup>	0,05 µg.kg <sup>-1</sup> (blanc)
Santos E.E. et al. (2004) ( <i>Brésil</i> )	(HNO <sub>3</sub> )	ICP-MS	0,03-5,0 µg.kg <sup>-1</sup>	-
Licata P. et al. (2004) ( <i>Italie</i> )		SAAE	<0,01- 2,80µg.kg <sup>-1</sup>	-
Ikem A. et al. (2002) ( <i>Nigeria</i> ) ( <i>UK</i> ) ( <i>USA</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-OES	en µg.mL <sup>-1</sup> - 0,3±0,9 -	-
Martino F.A.R. et al. (2001) ( <i>Espagne</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-MS	0,50±0,19 µg.L <sup>-1</sup>	0,25 µg.L <sup>-1</sup>
Coni E. et al. (2000) ( <i>Italie</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-MS	0,7-4,6 µg.L <sup>-1</sup>	-
Tripathi R.M. et al. (1999) ( <i>Inde</i> )	Voie sèche à 400 °C	SAAF	0,07-0,10 µg.L <sup>-1</sup>	-
Rossipal E. et al. (1998) ( <i>Autriche</i> )	Micro-ondes (HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ICP-MS	0,2-1,3 µg.L <sup>-1</sup>	0,9 µg.L <sup>-1</sup>



Coni E. et al. (1996) (Italie)	Voie sèche à 420 °C	ICP-AES	0,03-0,17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	-
Coni E. et al. (1995) (Italie)	Voie sèche à 420 °C	ICP-AES	0,066-0,130 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	-
Caggiano R. et al. (2005) (Italie)	( $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$ )	SAA	0,06±0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	-
Karavoltos S. et al. (2002) (Grèce)	$\text{HNO}_3$	SAAE	0,6±0,2 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	-
Ho C.-Y. et al.(2002) (Taiwan)	400°C	ICP-MS	0,2±0,1 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
Antunovic Z. et al. (2005) (Croatie)	$\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$	SAAE	0,004-0,011 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	-
Ursinyova M. et al. (2005) (Slovaquie)	( $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$ )	SAAE	0,43 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0,032 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
Karadjova I. et al. (2000) (Bulgarie)	$\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ + $\text{H}_2\text{O}_2$	SAAE	19,0±8,0 % $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
Milacic R. et al. (2003) (Slovénie)	$\text{HNO}_3 + \text{HF}$	SAAE	< 0,03 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
Rodriguez E. M. et al. (1999) (Espagne)	$\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$	SAAE	0,6-11,3 (LH) 0,7-23,1 (LV) 3,4-4,1 (LI) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	-
Karavoltos S. et al. (2002) (Grèce)	Micro-ondes ( $\text{HNO}_3$ )	SAAE- Zeeman	0,6±0,2 (LV) 1,0±1,0(LD) $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	-

Une synthèse des travaux de recherches sur le dosage du plomb et du cadmium dans le lait nous conduit à retenir :

- qu'on trouve généralement du plomb et du cadmium dans les laits, qu'il s'agisse de lait humain, de lait de vache, de brebis, de lait de chèvre, ... et que la meilleure limite de détection obtenue sur la solution synthétique (standards dans de l'eau ultrapure à 1% de  $\text{HNO}_3$ ) est d'environ 0,92  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le plomb (Frkovic A. et al., 1997) et 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le cadmium (Milhaud G.E. et al., 2000).

- Pour essayer d'améliorer la méthode de détermination des métaux dans le lait, nous allons rechercher les meilleures conditions possibles pour la mesure puis pour le traitement des échantillons.

Rappelons que l'objectif général de notre thèse est de développer des méthodes rapides d'analyse physico-chimique, ayant des seuils de détection aussi bas que possibles, et de les valider en vue de leur application à de grandes séries d'échantillons agro-alimentaires, qui pourront être alors utilisés comme indicateurs de pollutions environnementales.

## **2.3. DOSAGE DU PLOMB ET DU CADMIUM**

Nous avons utilisé le *DigiPREP* pour minéraliser les échantillons de lait par voie humide et la SAAE pour le dosage du plomb et du cadmium. Le bloc *DigiPREP* dispose de 24 puits et offre les dernières avancées technologiques des blocs de digestion en graphite. Les blocs en graphite sont recouverts de téflon, pour résister aux attaques corrosives et garantir une longue durée d'utilisation du bloc dans l'environnement d'un laboratoire. Les dispositifs suivants ont été prévus :

- Contrôle par clavier, écran tactile multi-étapes ou ordinateur déporté
- Versions capotables avec filtration de l'air entrant
- Sonde de température dans l'échantillon pour contrôler les réactions exothermiques et maintenir des conditions de température, quels que soient les volume et le nombre d'échantillons, les conditions climatiques
- Sonde de niveau pour évaporation HF et concentration avant analyse,...
- Les tubes de digestion les plus propres sur le marché : SCP SCIENCE affirme utiliser le polypropylène le plus propre possible, qui garde une bonne résistance aux acides et une bonne transparence (Graduations faciles à lire à 10, 20, 25, 30, 40 et 50 mL). Les bouchons permettant une fermeture hermétique sont en polyéthylène sans contaminants. Les verres de montre fabriqués en polypropylène avec un taux d'impuretés métalliques extrêmement bas, ont été spécialement conçus pour une digestion avec reflux.

### **2.3.1. Recherche des meilleures conditions pour la mesure en SAAE**

#### **2.3.1.1. Méthode de mesure**

Le lait pouvant être une matrice de composition très variable pour une même série d'échantillons analysés, on utilise pour la mesure la méthode des ajouts dosés : celle-ci consiste à additionner une quantité connue de l'élément considéré à la prise d'essai de la solution étudiée. Le volume de cet ajout doit être suffisamment faible pour que l'on puisse négliger la variation de volume de la solution d'échantillon ou, si nécessaire, on effectue une correction de volume. On mesure ensuite l'absorbance des solutions avec ou sans ajout pour tracer la droite qui représente l'absorbance en fonction de la concentration. Son intersection avec l'axe des abscisses donne la concentration de l'analyte dans la solution sans ajout. Cette façon d'opérer suppose bien sûr qu'on se place dans le domaine de linéarité de la méthode qui aura donc été préalablement déterminé. Si la méthode des

ajouts dosés peut être considérée comme un mode d'étalonnage intéressant pour l'analyse de matrices complexes, il n'en reste pas moins vrai qu'elle ne résout pas tous les problèmes : elle ne permet pas en particulier de corriger les interférences non spécifiques, c'est-à-dire les effets additifs.

### 2.3.1.2. Choix des conditions de temps et de température pour la programmation du four

Nous avons préparé la série d'échantillons qui est présentée ci-dessous :

**Tableau 4 : Série d'échantillons préparés en vue de choisir les conditions de temps et de température pour la programmation du four**

Echantillons	Commentaires
Blanc	HNO <sub>3</sub> 1%
1,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 10,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb	dans HNO <sub>3</sub> 1%
2,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 20,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb	dans HNO <sub>3</sub> 1%
5 mL de lait + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 250 µL St. → (minéraliser avec le <i>Digi</i> PREP) → 25 mL	C ajoutée = 1,0 µg.L <sup>-1</sup> de Cd + 10,0 µg.L <sup>-1</sup> de Pb dans HNO <sub>3</sub> 1%
1,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 10,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	dans HNO <sub>3</sub> 1% + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (de 0,03 à 0,1 %)
2,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 20,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	dans HNO <sub>3</sub> 1% + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (de 0,03 à 0,1 %)
5 mL de lait + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 250 µL St. → (minéraliser avec le <i>Digi</i> PREP) → 25 mL + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C ajoutée = 1,0 µg.L <sup>-1</sup> de Cd + 10,0 µg.L <sup>-1</sup> de Pb dans HNO <sub>3</sub> 1% + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (de 0,03 à 0,1 %)
1,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 10,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	dans HNO <sub>3</sub> 1% + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (de 0,03 à 0,1 %)
2,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 20,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	dans HNO <sub>3</sub> 1% + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (de 0,03 à 0,1 %)
5 mL de lait + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 250 µL St. → (minéraliser avec le <i>Digi</i> PREP) → 25 ml + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	C ajoutée = 1,0 µg.L <sup>-1</sup> de Cd + 10,0 µg.L <sup>-1</sup> de Pb dans HNO <sub>3</sub> 1% + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (de 0,03 à 0,1 %)
1,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 10,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HNO <sub>3</sub> 1% + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (de 0,03 à 0,1 %) + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (de 0,03 à 0,1 %)
2,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 20,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HNO <sub>3</sub> 1% + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (de 0,03 à 0,1 %) + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (de 0,03 à 0,1 %)
5 mL de lait + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 250 µL St. → (minéraliser avec le <i>Digi</i> PREP) → 25 mL + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	C ajoutée = 1,0 µg.L <sup>-1</sup> de Cd + 10,0 µg.L <sup>-1</sup> de Pb dans HNO <sub>3</sub> 1% + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (de 0,03 à 0,1 %) + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (de 0,03 à 0,1 %)

St. : représente une solution standard contenant 1000 µg.L<sup>-1</sup> de Pb et 100 µg.L<sup>-1</sup> de Cd

Tous les programmes de temps et de température du four, tels qu'ils sont présentés dans les **tableaux 5 et 6**, ont été essayés sur toute la série d'échantillons du **tableau 4**.

### 2.3.1.2.1. Choix des conditions de temps et de température du four pour le dosage du plomb

On a fait varier la température de décomposition (la température d'atomisation étant fixe), puis la température d'atomisation étant variable. Pour le plomb dans HNO<sub>3</sub> à 1%, la meilleure température de décomposition est moins de 500°C comme meilleure et plus de 1800°C comme meilleure température d'atomisation. Pour trouver les meilleures conditions de temps et de température pour le dosage du plomb, les programmes suivants ont été essayés :

**Tableau 5 : Programmes de temps et de température du four pour Pb**

Séchage (1)	Pyrolyse (2)	Atomisation (3)	Nettoyage (4)	Résultats (*)
50/140 °C, 30/5 s	140/400 °C, 30/10 s	400/1600°C, 0/5 s	1600/1900°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/400 °C, 30/10 s	400/1700°C, 0/5 s	1700/2000°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/400 °C, 30/10 s	400/1800°C, 0/5 s	1800/2100°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/400 °C, 30/10 s	400/1900°C, 0/5 s	1900/2200°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/400 °C, 30/10 s	400/2000°C, 0/5 s	2000/2300°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/400 °C, 30/10 s	400/2100°C, 0/5 s	2100/2400°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/400 °C, 30/10 s	400/2200°C, 0/5 s	2200/2500°C, 0/5 s	plusieurs pics
<b>50/140 °C, 30/5 s</b>	<b>140/400 °C, 30/10 s</b>	<b>400/2300°C, 0/5 s</b>	<b>2300/2600°C, 0/5 s</b>	<b>(**) un seul pic</b>
50/140 °C, 30/5 s	140/400 °C, 30/10 s	400/2400°C, 0/5 s	2400/2700°C, 0/5 s	Le signal ne revient pas à la ligne de base

*(\*) Nous présentons ici des résultats qualitatifs obtenus pour la majeure partie des échantillons du tableau 4.*

- (1) 50/140°C, 30/5s : monter de 50°C à 140°C en 30s et rester à 140°C durant 5s
- (2) 140/400 °C, 30/10s : monter de 140°C à 400°C en 30s et rester à 400°C durant 10s
- (3) 400/1600°C, 0/5s : monter de 400°C à 1600°C en 0s et rester à 1600°C durant 5s
- (4) 1600/1900°C, 0/5s : monter de 1600°C à 1900°C en 0s et rester à 1900°C durant 5s

### 2.3.1.2.2. Choix des conditions de temps et de température du four pour le dosage du cadmium

Ayant montré de même, pour le cadmium dans HNO<sub>3</sub> à 1%, que la température de décomposition doit rester inférieure à 300°C et celle d'atomisation supérieure à 1 300°C, on a exécuté les programmes du **tableau 6** pour rechercher les meilleures conditions.

**Tableau 6 : Programmes de temps et de température du four pour Cd**

Séchage	Pyrolyse	Atomisation	Nettoyage	Résultats (*)
50/140 °C, 30/5 s	140/300 °C, 30/10 s	300/1400°C, 0/5 s	1400/2500°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/300 °C, 30/10 s	300/1500°C, 0/5 s	1500/2500°C , 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/300 °C, 30/10 s	300/1600°C, 0/5 s	1600/2500°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/300 °C, 30/10 s	300/1700°C, 0/5 s	1700/2500°C, 0/5 s	plusieurs pics
<b>50/140 °C, 30/5 s</b>	<b>140/300 °C, 30/10 s</b>	<b>300/1800°C, 0/5 s</b>	<b>1800/2500°C, 0/5 s</b>	<b>(**)un seul pic</b>
50/140 °C, 30/5 s	140/300 °C, 30/10 s	300/1900°C, 0/5 s	1900/2500°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/300 °C, 30/10 s	300/2000°C, 0/5 s	2000/2500°C, 0/5 s	plusieurs pics
50/140 °C, 30/5 s	140/300 °C, 30/10 s	300/2100°C, 0/5 s	2100/2500°C, 0/5 s	Le signal ne revient pas à la ligne de base
50/140 °C, 30/5 s	140/300 °C, 30/10 s	300/2200°C, 0/5 s	2200/2500°C, 0/5 s	Le signal ne revient pas à la ligne de base

**(\*\*) Pour les études qui suivent nous avons choisi le programme indiqué en caractères gras : ce programme permet d'obtenir des signaux qui sont bien symétriques, avec une bonne répétabilité.**

### 2.3.1.3. Limites de détection et de quantification de la méthode

La limite de détection (LD) est définie comme la plus faible concentration d'un élément qui peut être déterminée avec un degré de confiance de 95%, ce qui correspond en général à une concentration de l'analyte qui produit un signal à peu près égal à trois fois la valeur du bruit de fond ; cette valeur est en pratique estimée sur la moyenne d'une dizaine de mesures successives.

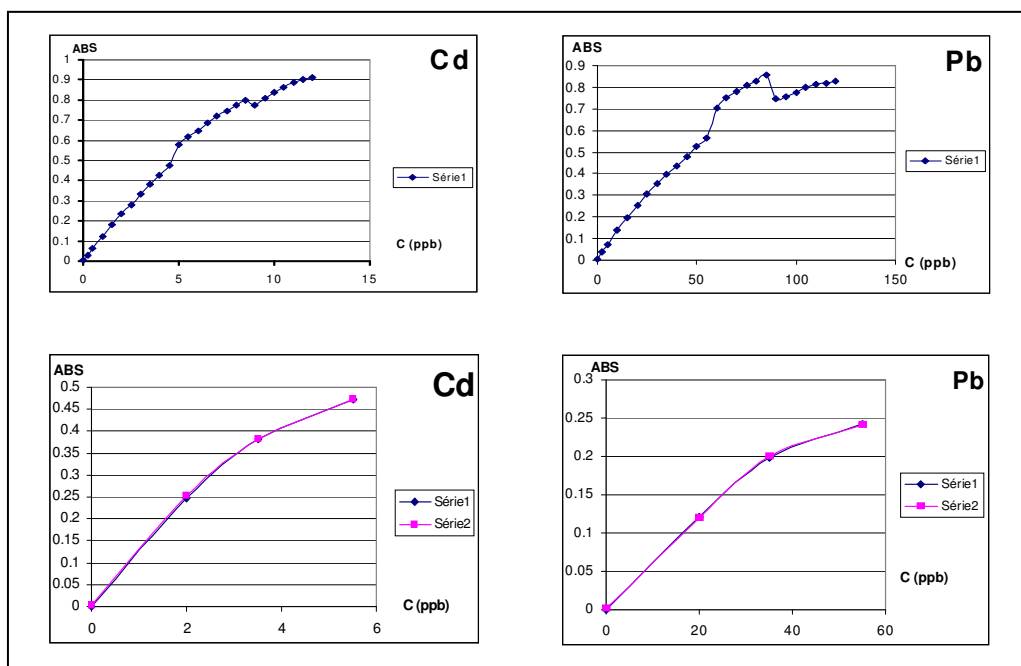
A cette définition vient s'ajouter celle d'une limite de quantification (LQ), correspondant à la plus faible concentration de l'analyte qui peut être raisonnablement déterminée dans la matrice envisagée.

### 2.3.1.3.1. Détermination du domaine de linéarité

Nous avons préparé une série de solutions synthétiques de plomb et de cadmium aux concentrations indiquées dans le **tableau 7**.

**Tableau 7 : Série d'échantillons préparés pour délimiter une droite**

Pb ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
0	60	0	6
2.5	65	0.25	6.5
5	70	0.5	7
10	75	1	7.5
15	80	1.5	8
20	85	2	8.5
25	90	2.5	9
30	95	3	9.5
35	100	3.5	10
40	105	4	10.5
45	110	4.5	11
50	115	5	11.5
55	120	5.5	12



**Figure 4 : Courbes d'étalonnage obtenues pour Cd et Pb**

D'après la **figure 5**, il semble qu'on puisse choisir comme limite supérieure du domaine de linéarité une concentration de  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium et de  $35 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb

### 2.3.1.3.2. Calcul des limites de détection et de quantification

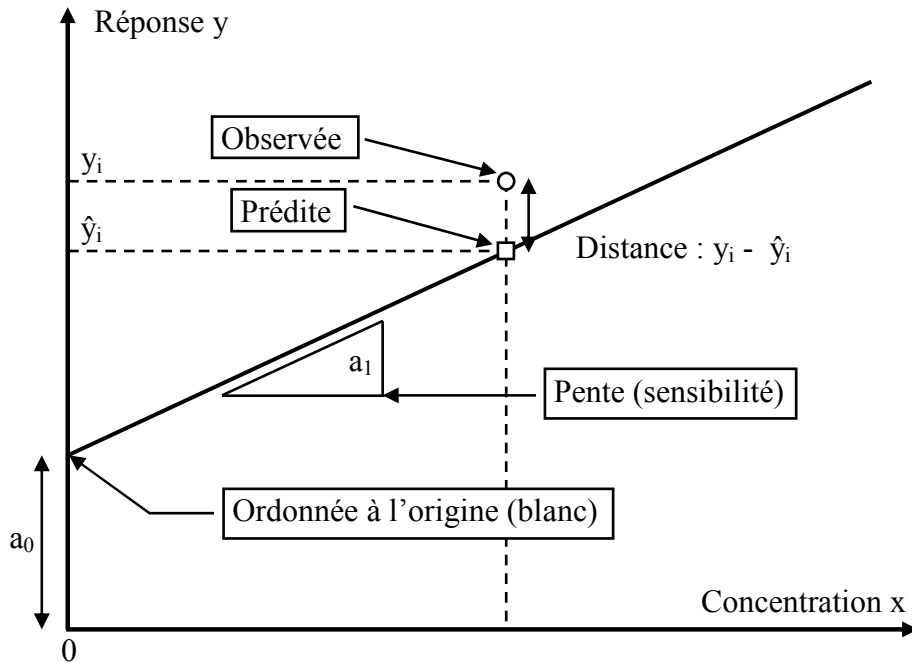
Pour tracer les deux droites d'étalonnage qui correspondent au plomb et au cadmium, on prépare 3 solutions en milieu  $\text{HNO}_3$  1%, à des concentrations  $C_1 = 30,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb et  $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium ; par ailleurs, pour construire chacune des deux droites, on prépare 3 fioles d'une solution  $\text{HNO}_3$  1%. On effectue ainsi 6 mesures pour chacun des 2 éléments : nos résultats sont présentés dans le **tableau 8**.

**Tableau 8 : droites d'étalonnage pour Cd et Pb (en unités d'absorbance)**

Cd		Pb	
$\text{HNO}_3$ 1%	Cd $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$	$\text{HNO}_3$ 1%	Pb $30,0 \mu\text{g.L}^{-1}$
0,0010	0,2688	0,0008	0,1686
0,0012	0,2701	0,0011	0,1677
0,0009	0,2693	0,0010	0,1680
<b>Moyenne = 0,0010</b>	<b>0,2694</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,1681</b>

Les résultats obtenus permettent de calculer des limites de détection et de quantification (Feinberg M., 2003), en s'appuyant sur le modèle mathématique classique  $y = a_0 + a_1x + e$  (1) dans lequel :

- x désigne la concentration de la solution étalon
- y, l'absorbance mesurée
- e, le bruit de fond
- $a_0$  représente le blanc, c'est-à-dire la réponse en l'absence d'analyte
- $a_1$ , la sensibilité ou pente du modèle d'étalonnage



**Figure 5 : Principe de la méthode des moindres carrés.**

La **figure 5** illustre le modèle (1):  $a_0$  est le blanc qui correspond à la réponse en absence d'analyte et  $a_1$  la sensibilité ou pente du modèle d'étalonnage. Déterminer la droite d'étalonnage revient à calculer  $a_0$  et  $a_1$  à l'aide des réponses  $y_i$  de  $p$  solutions étalons  $x_i$  ( $1 \leq i \leq p$ ). L'estimation de la variance résiduelle, notée  $s_e^2$ , est donnée par la formule (2) :

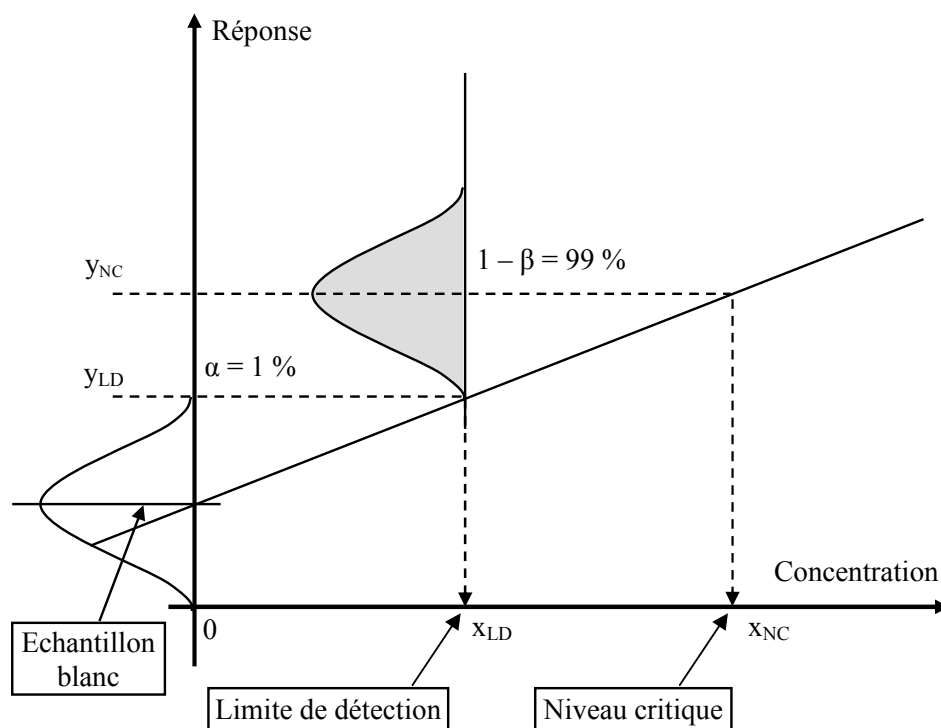
$$s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (y_i - \hat{y}_i)^2}{p-2} \quad (2)$$

Dans la formule (2),  $p$  représente le nombre de solutions étalons. La variance résiduelle sert ensuite à calculer les variances de la sensibilité et du blanc. En effet, les coefficients  $a_0$  et  $a_1$  ne sont pas des constantes mais des variables aléatoires car, si l'on répète l'étalonnage, on ne trouvera pas en effet deux fois les mêmes valeurs :

$$s_{a_1}^2 = \frac{s_e^2}{\sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2} = \frac{4s_e^2}{pC_1^2} \quad (3)$$

$$s_{a_0}^2 = s_e^2 \left( \frac{1}{p} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2} \right) = s_e^2 \left( \frac{1}{p} + \frac{p}{4} \right) \quad (4)$$





**Figure 6 : Limite de détection et niveau critique**

La limite de détection (LD) se définit en termes statistiques. Elle correspond à la concentration en dessous de laquelle la probabilité de se tromper en rejetant l'hypothèse qu'un échantillon blanc contient l'analyte est très petite. C'est un risque d'erreur de type I, noté  $\alpha$ . De même, il est aussi possible d'introduire le risque d'erreur de type II, noté  $\beta$ , pour définir ce qu'on appelle parfois le niveau critique (NC). C'est la concentration en dessous de laquelle on a peu de risque faible d'affirmer qu'un échantillon qui contient réellement l'analyte est un échantillon blanc. Le niveau critique se place à une concentration plus élevée que la limite de détection. La **figure 6** illustre ces deux concepts complémentaires.

En pratique, le calcul de la limite de détection revient à faire un test de conformité entre la réponse pour un échantillon blanc et 0. En fait, on recherche la limite, notée  $y_{LD}$ , à partir de laquelle on rejeterait l'hypothèse au niveau de confiance  $1-\alpha$  (dans ce cas on choisit un test unilatéral car on ne s'intéresse, bien entendu, qu'aux concentrations supérieures au blanc). Finalement, on débouche sur les deux formules suivantes où  $s_{bl}$  est l'écart type du blanc :

$$y_{LD} = t_{1-\alpha} s_{bl}$$

$$y_{NC} = y_{LD} + t_{1-\beta} s_{bl} = (t_{1-\alpha} + t_{1-\beta}) s_{bl}$$

Dans ce cas, le nombre de degrés de libertés de la variable de Student est égal à n-1 ou n représente le nombre de mesures effectuées pour calculer  $s_{bl}$ . La limite de détection (LD) est calculée au moyen des formules (5) :

$$x_{LD} = \frac{y_{LD}}{a_1} = \frac{t_{1-\alpha} s_{bl}}{a_1} = \frac{a_0 + 3s_{a_0}}{a_1} \quad (5)$$

Quant à la limite de quantification (LQ), elle n'a pas de signification statistique mais correspond plutôt à une pratique des analystes qui font la différence entre un échantillon réellement blanc et un échantillon non quantifiable. Selon les mêmes notations, sa valeur est par convention :

$$x_{LQ} = \frac{a_0 + 10s_{a_0}}{a_1} \quad (6)$$

$$(\alpha = 1\%)$$

Pour la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ), nous trouvons ainsi :

$$LD = 0,5 \mu\text{g.L}^{-1} \quad ; \quad LQ = 1,4 \mu\text{g.L}^{-1} \quad \text{pour Pb}$$

$$LD = 0,04 \mu\text{g.L}^{-1} \quad ; \quad LQ = 0,11 \mu\text{g.L}^{-1} \quad \text{pour Cd}$$

Ces valeurs doivent être comparées à celles des **tableaux 2 et 3** qui donnent comme valeurs inférieures des LD :

- pour le plomb,  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  par SAAE-Zeeman (Frkovic A. et al., 1997) et  $0,92 \mu\text{g.L}^{-1}$  par ICP-MS (Martino F.A.R et al., 2001) ;

- et pour le cadmium,  $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  par SAAE (Milhaud G.E. et al., 2000).

Avec les conditions que nous avons choisies, nos résultats semblent donc meilleurs que ceux trouvés dans la littérature.

## 2.3.2. Recherche des meilleures conditions de minéralisation

### 2.3.2.1 Dosage du plomb et du cadmium contaminant les solutions d'acides, d'oxydants et de modificateurs utilisés pour nos essais

Nous avons préparé des solutions d'acides, d'oxydants et de modificateurs pour vérifier leurs teneurs en plomb et cadmium. Nous avons trouvé une teneur en cadmium significative pour le modificateur  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  : elle est de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans la solution à 2,0% de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (Voir **tableau 9**). Mais, comme nous allons utiliser un mélange de modificateur dont la concentration dans la solution finale reste comprise entre 0,03 et 0,1 %, la teneur en cadmium ainsi apportée aux solutions de mesure restera très faible ( $\leq 0,0075 \mu\text{g.L}^{-1}$ , soit  $0,15 \times 0,1/2,0$ ) (\*)

**Tableau 9 : Teneurs en Pb et Cd dans les diverses solutions d'acides, oxydants et modificateurs**

Echantillons	Pb		Cd	
	Absorbance	Concentration	Absorbance	Concentration
HNO <sub>3</sub> 1%	0,0010	-	0,0015	-
1,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 10,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb/ HNO <sub>3</sub> 1%	0,0453	10 µg.L <sup>-1</sup>	0,0910	1,0 µg.L <sup>-1</sup>
2,0 µg.L <sup>-1</sup> Cd + 20,0 µg.L <sup>-1</sup> Pb / HNO <sub>3</sub> 1%	0,0904	20 µg.L <sup>-1</sup>	0,1904	2,0 µg.L <sup>-1</sup>
HNO <sub>3</sub> 3%	0,0024	-	0,0016	-
HNO <sub>3</sub> 1% + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (10%) (4 : 1)	0,0009	-	0,0011	-
HNO <sub>3</sub> 1% + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10%) (4 : 1) (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2%)	0,0013	-	<b>0,0140</b>	<b>0,15 µg.L<sup>-1</sup></b> <b>(*)</b>
HNO <sub>3</sub> 1% + HCl (20 : 1)	0,0036	-	0,0013	-
HNO <sub>3</sub> 1% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (20 : 1)	0,0028	-	0,0018	-
HNO <sub>3</sub> 1% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 : 1)	0,0002	-	0,0016	-
HNO <sub>3</sub> 1% + Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (40%) (4 : 1)	0,0014	-	0,0026	-
HNO <sub>3</sub> 1% + NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (40%) (4 : 1) (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8%)	0,0005	-	<b>0,0745</b>	<b>0,82 µg.L<sup>-1</sup></b>

### 2.3.2.2. Choix d'un mélange d'acides ou d'un mélange d'acide et d'oxydant pour la minéralisation

**Tableau 10 : Série d'échantillons préparés pour choisir les conditions de minéralisation**

Echantillons	Agents de minéralisation	Commentaires
5 mL de lait + 250 µl St.	2 mL HNO <sub>3</sub> 65%	St. : Pb 1000 µg.L <sup>-1</sup> Cd 100 µg.L <sup>-1</sup> Ajout final : Pb – 10,0 µg.L <sup>-1</sup> (~ppb) Cd – 1,0 µg.L <sup>-1</sup> (~ppb)
5 mL de lait + 250 µl St.	2 mL HCl	
5 mL de lait + 250 µl St.	2 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
5 mL de lait + 250 µl St.	0,5 mL HNO <sub>3</sub> + 1,5 mL HCl (1:3)	
5 mL de lait + 250 µl St.	2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	
5 mL de lait + 250 µl St.	2 mL HCl + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	
5 mL de lait + 250 µl St.	2 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	
5 mL de lait	2 mL HNO <sub>3</sub> 65%	Lait (*)
5 mL de lait	2 mL HCl	
5 mL de lait	2 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
5 mL de lait	0,5 mL HNO <sub>3</sub> + 1,5 mL HCl (1:3)	
5 mL de lait	2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	
5 mL de lait	2 mL HCl + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	
5 mL de lait	2 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	
	2 mL HNO <sub>3</sub> 65%	Blanc
	2 mL HCl	
	2 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	0,5 mL HNO <sub>3</sub> + 1,5 mL HCl (1:3)	
	2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	
	2 mL HCl + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	
	2 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	

(\*) Pour préparer les échantillons, nous avons utilisé du lait pasteurisé entier « pasteurisation haute, à conserver au froid »

La pasteurisation est un traitement moins sévère que la stérilisation ; elle peut être obtenue en maintenant le lait 20 secondes à 80-85 °C ou 30 minutes à 63 °C. Moins coûteuse et plus simple que la stérilisation, elle nécessite de contrôler avec attention la durée et la température du traitement, puis d'assurer un refroidissement rapide du lait pour ne pas l'exposer trop longtemps à des températures très favorables au développement de micro-organismes (20-30 °C). Le lait pasteurisé ne se conserve que quelques jours au froid.

Le protocole expérimental appliqué pour les mesures sur le lait est le suivant :

- Verser 5 mL de l'échantillon de lait dans un tube plastique
- Ajouter les agents de minéralisation
- Mélanger et évaporer à sec sur le *Digi*PREP à 95°C
- Reprendre par 30 mL de HNO<sub>3</sub> 1% et évaporer jusqu'à 20 mL
- Diluer à 25 mL dans une fiole par HNO<sub>3</sub> 1 %.

Nos résultats, qui sont présentés dans les **tableaux 11 et 12**, correspondent chacun à la moyenne de 2 répétitions.

**Tableau 11 : Choix d'un mélange d'acide et d'oxydant (pour Pb) : résultats obtenus**

Agents de minéralisation	Etat de la solution	Résultats pour Pb (ajout final ~ 10 µg.L <sup>-1</sup> )		Résultats pour Pb (lait sans ajout)	
		Absorbance	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )	Absorbance	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )
HNO <sub>3</sub> 65%	jaune clair	0,0444	<b>9,12</b>	0,0038	-
HCl	noir	0,0426	<b>8,75</b>	0,0081	1,6 (1)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	noir	0,0187	<b>3,90</b>	0,0016	-
HNO <sub>3</sub> + HCl (1 :3)	jaune clair	0,0327	<b>6,71</b>	0,0029	-
HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	jaune clair	<b>0,0457</b>	<b>9,38</b>	<b>0,0043</b>	-
HCl + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	noir	0,0383	<b>7,86</b>	0,0089	1,8 (1)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	noir	0,0214	<b>4,39</b>	0,0007	-
Standard Pb- 10,0 µg.L <sup>-1</sup> / HNO <sub>3</sub> 1%		<b>0,0487</b>	<b>10,00</b>		

(1) Nous pensons pouvoir attribuer ces valeurs de 1,6 et 1,8 µg.L<sup>-1</sup>, obtenues pour le plomb dans le lait sans ajout, à une pollution lors de la minéralisation.

**Tableau 12 : Choix d'un mélange d'acide et d'oxydant (pour Cd) : résultats obtenus**

Agents de minéralisation	Etat de la solution	Résultats pour Cd (ajout final ~ 1,0 µg.L <sup>-1</sup> )		Résultats pour Cd (lait sans ajout)	
		Absorbance	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )	Absorbance	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )
HNO <sub>3</sub> 65%	jaune clair	0,0832	<b>0,91</b>	0,0043	-
HCl	noir	0,0811	<b>0,89</b>	0,0079	-
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	noir	0,0487	<b>0,53</b>	0,0019	-
HNO <sub>3</sub> + HCl (1 :3)	jaune clair	0,0637	<b>0,70</b>	0,0032	-
HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	jaune clair	<b>0,0898</b>	<b>0,98</b>	<b>0,0045</b>	-
HCl + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	noir	0,0685	<b>0,75</b>	0,0084	-
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 :1)	noir	0,0434	<b>0,47</b>	0,0011	-
Standard Cd – 1,0 mg.L <sup>-1</sup> / HNO <sub>3</sub> 1%		<b>0,0914</b>	<b>1,00</b>		

Nous allons donc choisir un mélange d'acide (HNO<sub>3</sub>) et d'oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour la minéralisation des échantillons de lait au moyen du minéralisateur *DigiPREP* car :

- les résultats obtenus pour le plomb et cadmium sont les plus élevés (meilleure sensibilité) ;
- ce mélange est bien adapté à une reprise des cendres par HNO<sub>3</sub> 1%, bien adapté également au dosage du plomb et du cadmium par SAAE.

### 2.3.2.3. Choix du temps pour minéraliser des échantillons analytiques

On a réalisé une série d'essais qui sont présentés dans le **tableau 13** :

**Tableau 13 : Essais réalisés pour choisir le temps de minéralisation**

X1	X2	X3	X4	X5
5 mL de lait + 250 µL St. + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <b>(à sec ~ 4 heures)</b>	5 mL de lait + 250 µL St. + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <b>(6 heures)</b>	5 mL de lait + 250 µL St. + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <b>(8 heures)</b>	5 mL de lait + 250 µL St. + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <b>(10 heures)</b>	2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <b>(Blanc)</b>

Z1	Z2	Z3	Z4	Z5
5 mL de lait + 250 µL St. + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 mL H <sub>2</sub> O <b>(à sec ~ 5 heures)</b>	5 mL de lait + 250 µL St. + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 mL H <sub>2</sub> O <b>(7 heures)</b>	5 mL de lait + 250 µL St. + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 mL H <sub>2</sub> O <b>(9 heures)</b>	5 mL de lait + 250 µL St. + 2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 mL H <sub>2</sub> O <b>(11 heures)</b>	2 mL HNO <sub>3</sub> + 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 mL H <sub>2</sub> O <b>(Blanc)</b>

St. : représente une solution standard contenant 1000 µg.L<sup>-1</sup> de Pb et 100 µg.L<sup>-1</sup> de Cd

**Tableau 14 : Choix d'un temps de minéralisation pour le plomb : résultats obtenus**

Echantillons	Résultats pour Pb (ajout final ~ 10 µg.L <sup>-1</sup> )	Résultats pour Pb (ajout final ~ 10,0 µg.L <sup>-1</sup> ) On utilise le modificateur Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> et NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,03-0,1 %)
	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )
X1 (4 heures)	4,60	8,84
X2 (6 heures)	4,55	8,39
X3 (8 heures)	3,43	8,31
X4 (10 heures)	7,87	9,32
X5 Blanc		
Z1 (5 heures)	1,30	9,07
Z2 (7 heures)	1,22	8,45
Z3 (9 heures)	2,54	8,22
Z4 (11 heures)	8,37	9,59
Z5 Blanc		
Standard Pb-10,0 µg.L <sup>-1</sup> / HNO <sub>3</sub> 1%	10,00	10,00

**Tableau 15 : Choix d'un temps de minéralisation pour le cadmium : résultats obtenus**

Echantillons	Résultats pour Cd (ajout final ~ 1,0 µg.L <sup>-1</sup> )	Résultats pour Cd (ajout final ~ 1,0 µg.L <sup>-1</sup> ) On utilise le modificateur Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> et NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,03-0,1 %)
	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )
X1 (4 heures)	1,09	2,00
X2 (6 heures)	0,98	1,85
X3 (8 heures)	0,68	1,80
X4 (10 heures)	1,31	1,59
X5 Blanc		
Z1 (5 heures)	1,22	2,02
Z2 (7 heures)	0,98	1,87
Z3 (9 heures)	0,96	1,81
Z4 (11 heures)	1,39	1,60
Z5 Blanc		
Standard Cd -1,0 µg.L <sup>-1</sup> / HNO <sub>3</sub> 1%	1,00	1,00

Les résultats des **tableaux 14 et 15**, indiquent qu'une bonne minéralisation des échantillons de lait conduit à une concentration maximale d'environ 8,37 µg.L<sup>-1</sup> pour Pb et

de 1,39  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd ; si la minéralisation n'est pas bonne, on utilise des modificateurs et les concentrations maximales trouvées sont alors d'environ 9,59  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb et de 2,02  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd. En définitive, nous préférons choisir les conditions de l'essai Z1 qui, avec un modificateur de matrice, permet de réduire à 5 heures le temps de minéralisation.

#### 2.3.2.4. Choix du volume d'acide et d'oxydant utilisé pour la minéralisation

On a réalisé une série d'essais qui sont présentés dans le **tableau 16** :

**Tableau 16 : Essais réalisés préparés pour choisir le volume d'acide et d'oxydant**

Y1(1)	Y2	Y3	Y4	Y5
5 mL de lait + 250 $\mu\text{L}$ St. + 2 mL $\text{HNO}_3$ + 1 mL $\text{H}_2\text{O}_2$ (10 heures)	5 mL de lait + 250 $\mu\text{L}$ St. + 3 mL $\text{HNO}_3$ + 1,5 mL $\text{H}_2\text{O}_2$ (10 heures)	5 mL de lait + 250 $\mu\text{L}$ St. + 4 mL $\text{HNO}_3$ + 2 mL $\text{H}_2\text{O}_2$ (10 heures)	5 mL de lait + 250 $\mu\text{L}$ St. + 5 mL $\text{HNO}_3$ + 2,5 mL $\text{H}_2\text{O}_2$ (10 heures)	5 mL $\text{HNO}_3$ + 2,5 ml $\text{H}_2\text{O}_2$  (Blanc)

(1) Contrairement à notre choix précédent d'un temps de 5 heures pour la minéralisation, nous avons dû prendre ici un temps de 10 heures, nécessaire pour pouvoir réaliser une évaporation à sec lorsque le volume des réactifs de minéralisation est augmenté, passant au total de 3 à 7,5 mL.

**Tableau 17 : Choix du volume d'acide et d'oxydant pour le plomb : résultats obtenus**

Echantillons	Résultats pour Pb (ajout final ~ 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Résultats pour Pb (ajout final ~ 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) On utilise le modificateur $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ et $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,03-0,1%)
	Concentration ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Concentration ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
Y1	8,26	8,33
Y2	9,06	8,83
Y3	8,66	8,51
Y4	8,40	8,25
Y5 (Blanc)		
Standard Pb-10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ / $\text{HNO}_3$ 1%	10,00	10,00



**Tableau 18 : Choix du volume d'acide et d'oxydant pour le cadmium : résultats obtenus**

Echantillons	Résultats pour Cd (ajout final ~ 1,0 µg.L <sup>-1</sup> )	Résultats pour Cd (ajout final ~ 1,0 µg.L <sup>-1</sup> ) On utilise le modificateur Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> et NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,03-0,1 %)
	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )	Concentration (µg.L <sup>-1</sup> )
Y1	1,26	1,54
Y2	1,33	1,47
Y3	1,34	1,36
Y4	1,33	1,28
Y5 (Blanc)		
Standard Cd -1,0 µg.L <sup>-1</sup> / HNO <sub>3</sub> 1%	1,00	1,00

Considérant les résultats des **tableaux 17 et 18**, on va choisir les conditions de l'essai Y2, c'est-à-dire un mélange de 3 mL HNO<sub>3</sub> et 1,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour minéraliser 5 mL de lait. Il est à noter que les résultats de l'essai Y1 diffèrent légèrement des résultats de l'essai X4 car le lait utilisé n'est pas le même dans ces 2 séries d'essais. De plus, nous avons constaté, pour l'essai Y<sub>2</sub>, que 5 heures suffisent pour évaporer à sec. On peut donc retenir le protocole décrit ci-après.

#### **2.3.2.5. Protocole retenu pour le dosage du plomb et du cadmium dans le lait**

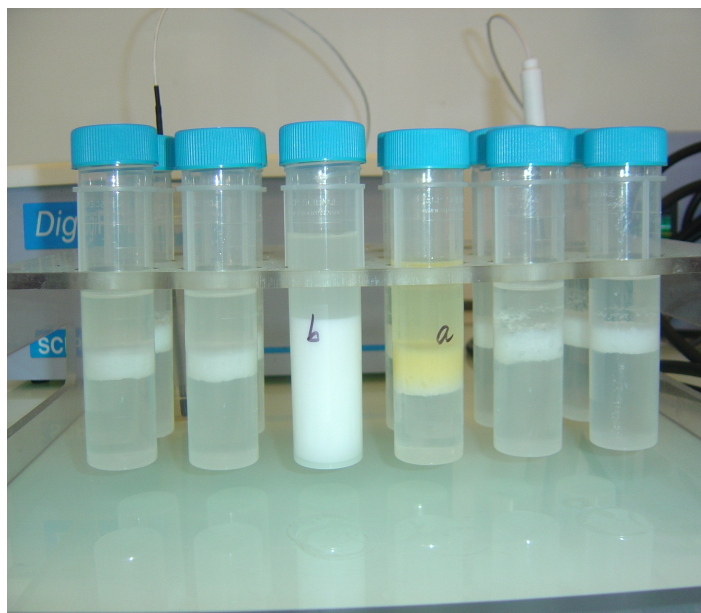
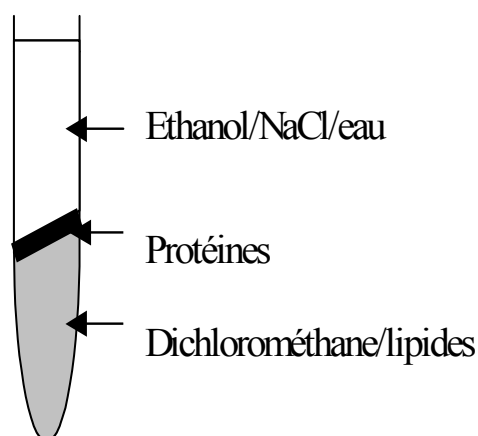
- Verser 5 mL de l'échantillon de lait dans un tube plastique
- Ajouter 10 mL H<sub>2</sub>O, 3 mL HNO<sub>3</sub> et 1,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Puis, ajouter le mélange de modificateur Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> et NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> qui représente de 0,03 à 0,1% de la solution de mesure finale
- Mélanger et évaporer à sec sur le *DigiPREP* à 95°C
- Reprendre par 30 mL HNO<sub>3</sub> 1% et évaporer jusqu'à 20 mL
- Diluer à 25 mL dans une fiole par HNO<sub>3</sub> 1 %
- Utiliser la SAAE pour la mesure
- Le temps total nécessaire pour le traitement des échantillons sera effectivement de  
5 h 30, avec un temps de minéralisation de 5 heures.

## 2.3.3. Détermination du plomb et du cadmium dans les différentes phases du lait (protéines, lipides, sérum)

### 2.3.3.1. Séparation du lait en ses 3 phases : protéines, lipides, sérum

Pour séparer les principales phases du lait, le protocole suivant a été appliqué :

- 1 Vol de lait (la prise d'essai est de 3 mL de lait, volume compatible avec la capacité de notre centrifugeur)
- 1 Vol de NaCl (0,9 %)
- 2 Vol d'éthanol ( $C_2H_5OH$ )
- 4 Vol de dichlorométhane ( $CH_2Cl_2$ )
- Centrifuger à 9000 tours durant 15 minutes



**Figure 7 : Séparation du lait en ses 3 phases : protéines, lipides, sérum**

- Au milieu : les protéines constituent une phase solide
- Au dessus : le sérum (Ethanol / NaCl / eau ...) se retrouve en phase liquide
- En bas du tube : les lipides sont en solution dans le dichlorométhane

Des études préliminaires nous ont permis de montrer (voir **tableau 19**) qu'après séparation du lait en ces 3 fractions, le plomb et le cadmium se retrouvent exclusivement dans la phase protéique. Aucune trace de ces éléments n'a pu être décelée dans les deux autres fractions (BUI X.T. et al. 2007).

**Tableau 19 : Comparaison des résultats obtenus pour différentes fractions du lait**

Résultats pour Pb ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )				Résultats pour Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )			
Matrice étudiée	Pb dans protéines	Pb dans lipides	Pb dans sérum	Matrice étudiée	Cd dans protéines	Cd dans lipides	Cd dans sérum
H <sub>2</sub> O + HNO <sub>3</sub> 1%	-	-	-	H <sub>2</sub> O + HNO <sub>3</sub> 1%	-	-	-
lait	2,77	-	-	lait	0,80	-	-
	2,53	-	-		0,75	-	-
	2,37	-	-		0,90	-	-
	<b>2,56</b>				<b>0,82</b>		
lait + 20,0 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	22,3	-	-	lait + 2,0 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	2,60	-	-
	21,7	-	-		2,71	-	-
	22,9	-	-		2,50	-	-
	<b>22,3</b>				<b>2,60</b>		

On aura donc intérêt à déterminer Pb et Cd dans les protéines du lait, puisqu'on dispose ainsi d'un moyen de concentrer ces éléments traces. La séparation ayant été réalisée comme indiqué précédemment, on prélève les 2 phases liquides à l'aide d'une micro-pipette, les protéines restant ainsi dans le tube. On utilisera ensuite un volume de 2 mL HNO<sub>3</sub> et de 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour la minéralisation des protéines initialement contenues dans la prise d'essai, soit 3 mL de lait. On va donc opérer comme suit :

***Protocole retenu pour le dosage du plomb et du cadmium dans les protéines du lait***

- Transférer 0,1 g des protéines du lait (~ 3 mL de lait) dans un tube plastique
- Ajouter alors 5 mL H<sub>2</sub>O, 2 mL HNO<sub>3</sub> et 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Puis, ajouter le mélange de modificateur Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> et NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> qui représente de 0,03 à 0,1% de la solution de mesure finale
- Mélanger et évaporer à sec sur le *Digi*PREP à 95°C
- Reprendre par 20 mL HNO<sub>3</sub> 1% et évaporer jusqu'à 10 mL
- Utiliser la SAAE pour la mesure

Les échantillons étudiés ont été préparés de la façon suivante :

- On a initialement ajouté au lait différents volumes de la solution St pour obtenir, comme indiqué dans le **tableau 20**, des concentrations de 5,0 ; 10,0 et 20,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb et de 0,5 ; 1,0 et 2,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium.
- Les échantillons ainsi préparés ont été laissés au réfrigérateur pendant 48 heures avant d'effectuer les analyses.

Les résultats, qui sont présentés dans le tableau 19 en unités de concentration, ont été calculés comme indiqué ci-dessous à partir des mesures en unités d'absorbance:

$$\frac{y_0}{y_i} = \frac{x_0}{x_0 + \Delta x_i}, \text{ avec :}$$

- $y_0$  : valeur de l'absorbance pour l'échantillon de lait
- $y_i$  : valeur de l'absorbance pour l'échantillon de lait après ajout
- $x_0$  : concentration du plomb ou du cadmium dans la solution de mesure
- $\Delta x_i$  : concentration d'ajout

Les concentrations en plomb et en cadmium dans le lait sont calculées en tenant compte de la dilution, soit:  $C_{Pb (Cd),lait} = x_{o \text{ lait}} \cdot d_l$  et  $C_{Pb (Cd),lait (protéines)} = x_{o \text{ protéines}} \cdot d_p$ , si  $d_l$  est le coefficient de dilution pour le lait (soit  $25\text{mL}/5\text{mL} = 5$ ) et  $d_p$ , le coefficient de dilution pour les protéines (soit  $10\text{mL}/3\text{mL} = 10/3$ )

**Tableau 20 : Comparaison des résultats obtenus par un dosage direct sur le lait ou par un dosage réalisé, après séparation, sur la phase protéique.**

Résultats pour Pb ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )			Résultats pour Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )		
Matrice étudiée	Séparation (protéines)	Sans séparation	Matrice étudiée	Séparation (protéines)	Sans séparation
H <sub>2</sub> O + HNO <sub>3</sub> 1%	-	-	H <sub>2</sub> O + HNO <sub>3</sub> 1%	-	-
lait	2,77	1,90	lait	0,80	0,58
	2,53	1,75		0,75	0,47
	2,37	2,01		0,90	0,68
lait + 20,0 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	22,3	21,03	lait + 2,0 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	2,60	2,50
	21,7	20,1		2,71	2,43
	22,9	22,4		2,50	2,60
lait	2,58	1,73	lait	0,78	0,62
	2,51	1,91		0,71	0,56
	2,73	1,88		0,86	0,60
lait + 10,0 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	13,4	11,90	lait + 1,0 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	1,60	1,58
	14,1	11,50		1,56	1,51
	12,8	12,30		1,63	1,64
lait	2,63	1,92	lait	0,81	0,66
	2,71	1,86		0,73	0,52
	2,52	1,79		0,84	0,63
lait + 5,0 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	4,0	6,90	lait + 0,5 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	1,30	1,08
	3,70	7,10		1,24	1,12
	5,0	6,50		1,37	1,01

### 2.3.3.2. Recherche des meilleures conditions de minéralisation des protéines

Pour optimiser les conditions de minéralisation des protéines du lait, nous avons choisi d'étudier les 3 facteurs suivants, en ayant recours à la méthode des plans d'expériences :

- VRM / PE : volume des réactifs de minéralisation / Prise d'essai (facteur 1)
- PE : prise d'essai (facteur 2)
- TM : température de minéralisation (facteur 3)
- Les réponses mesurées sont les concentrations en plomb et en cadmium

Pour chaque essai, on a effectué - comme indiqué précédemment - une minéralisation à sec en présence de HNO<sub>3</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sans se préoccuper du temps nécessaire pour réaliser ce traitement.

**Tableau 21 : Plan d'expériences retenu (plan complet 2<sup>3</sup>)**

Numéro de l'essai	VRM/PE	PE	TM	Résultats pour Pb			Résultats pour Cd		
				Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	$\bar{Y}_{Pb}$	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	$\bar{Y}_{Cd}$
1	-	-	-	4,2	4,5	$y_1 = 4,4$	1,5	1,2	$y_1 = 1,4$
2	+	-	-	4,0	4,3	$y_2 = 4,2$	1,1	1,2	$y_2 = 1,2$
3	-	+	-	39,1	37,9	$y_3 = 38,5$	10,2	10,9	$y_3 = 10,6$
4	+	+	-	33,7	34,8	$y_4 = 34,3$	9,6	9,0	$y_4 = 9,3$
5	-	-	+	4,4	4,1	$y_5 = 4,3$	1,6	1,4	$y_5 = 1,5$
6	+	-	+	3,9	4,2	$y_6 = 4,1$	1,3	1,1	$y_6 = 1,2$
7	-	+	+	40,6	38,9	$y_7 = 39,8$	11,7	10,6	$y_7 = 11,2$
8	+	+	+	36,5	37,0	$y_8 = 36,8$	10,4	9,7	$y_8 = 10,1$

Notation	VRM / PE	PE	TM
Niveau -	12	0,2 g	90 °C
Niveau +	24	2,0 g	100 °C

(VRM) : HNO<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ~ 2:1

(PE) : 1 L de lait ~ 34,0 – 37,0 g de protéine.

{VRM/PE (-) x PE (-) = 12 x 0,2 = 2,40 mL VRM }

{VRM/PE (-) x PE (+) = 12 x 2,0 = 24,0 mL VRM }

{VRM/PE (+) x PE (-) = 24 x 0,2 = 4,80 mL VRM }

{VRM/PE (+) x PE (+) = 24 x 2,0 = 48,0 mL VRM }

Total : 8,80 g x 2 = 17,60 g protéines

**Tableau 22: Matrices de effets**

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Interaction 12	Interaction 13	Interaction 23	Interaction 123	Résultats pour Pb
1	+	-	-	-	+	+	+	-	$y_1 = 4,4$
2	+	+	-	-	-	-	+	+	$y_2 = 4,2$
3	+	-	+	-	-	+	-	+	$y_3 = 38,5$
4	+	+	+	-	+	-	-	-	$y_4 = 34,3$
5	+	-	-	+	+	-	-	+	$y_5 = 4,3$
6	+	+	-	+	-	+	-	-	$y_6 = 4,1$
7	+	-	+	+	-	-	+	-	$y_7 = 39,8$
8	+	+	+	+	+	+	+	+	$y_8 = 36,8$

Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8
----------	---	---	---	---	---	---	---	---

Effets	$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	$a_{12}$	$a_{13}$	$a_{23}$	$a_{123}$
Pb	+ 20,8	- 0,95	<b>+16,55</b>	+ 0,45	- 0,85	+ 0,15	+ 0,5	+ 0,15

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Interaction 12	Interaction 13	Interaction 23	Interaction 123	Résultats pour Cd
1	+	-	-	-	+	+	+	-	$y_1 = 1,4$
2	+	+	-	-	-	-	+	+	$y_2 = 1,2$
3	+	-	+	-	-	+	-	+	$y_3 = 10,6$
4	+	+	+	-	+	-	-	-	$y_4 = 9,3$
5	+	-	-	+	+	-	-	+	$y_5 = 1,5$
6	+	+	-	+	-	+	-	-	$y_6 = 1,2$
7	+	-	+	+	-	-	+	-	$y_7 = 11,2$
8	+	+	+	+	+	+	+	+	$y_8 = 10,1$

Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8
----------	---	---	---	---	---	---	---	---

Effets	$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	$a_{12}$	$a_{13}$	$a_{23}$	$a_{123}$
Cd	+ 5,81	- 0,36	<b>+ 4,15</b>	+ 0,19	- 0,24	+ 0,01	+ 0,16	+ 0,04

Modèle :  $Y \sim a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{123}x_1x_2x_3$   
 $Y_{Pb} \sim 20,8 - 0,95x_1 + 16,55x_2 + 0,45x_3 - 0,85x_1x_2 + 0,15x_1x_3 + 0,5x_2x_3 + 0,15x_1x_2x_3$   
 $Y_{Cd} \sim 5,81 - 0,36x_1 + 4,15x_2 + 0,19x_3 - 0,24x_1x_2 + 0,01x_1x_3 + 0,16x_2x_3 + 0,04x_1x_2x_3$

Sans qu'il soit besoin de recourir à une analyse statistique, ces résultats montrent clairement que seul le facteur 2 a un effet significatif ou, autrement dit, ce qui ne va d'ailleurs pas nous surprendre, que la réponse mesurée est d'autant plus élevée que la prise d'essai est plus grande. Mais on constate aussi que le facteur 1 n'a pas d'effet et qu'il est donc suffisant d'utiliser un VRM de 24mL pour minéraliser 2g de protéines.

### 2.3.4. Calcul des limites de détection et de quantification pour le lait, par une méthode directe ou à partir des protéines

Nous avons préparé deux séries d'échantillons pour le lait et pour les protéines de lait, avec des ajouts de plomb et cadmium tels que les concentrations d'ajouts dans les échantillons avant minéralisation soient celles indiquées dans le **tableau 23**.

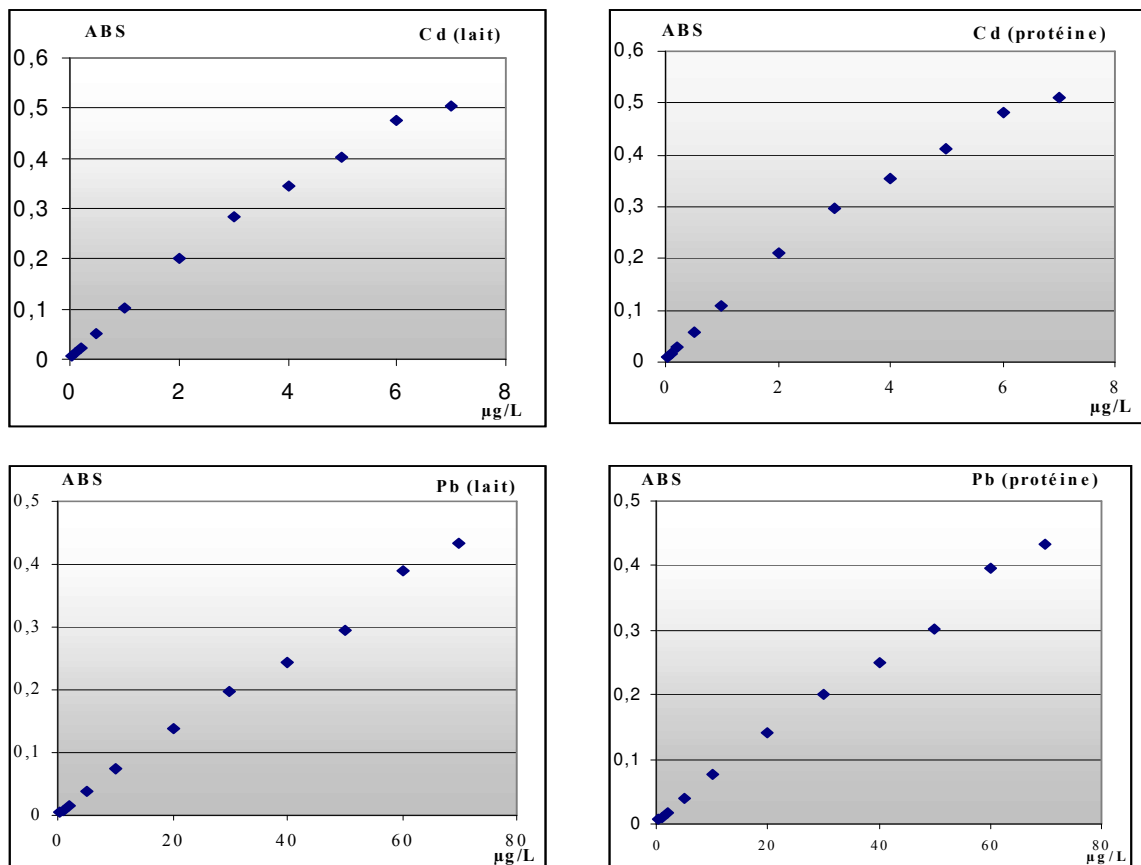
**Tableau 23 : Série d'échantillons préparés pour déterminer la zone de linéarité.**

Lait		Protéine	
Cd (ppb)	Pb (ppb)	Cd (ppb)	Pb (ppb)
Blanc	Blanc	Blanc	Blanc
0,05	0,5	0,05	0,5
0,1	1	0,1	1
0,2	2	0,2	2
0,5	5	0,5	5
1	10	1	10
2	20	2	20
3	30	3	30
4	40	4	40
5	50	5	50
6	60	6	60
7	70	7	70

Il est ainsi possible, à partir de ces 2 séries d'échantillons de tracer les courbes d'étalonnage correspondant au plomb et au cadmium, telles qu'elles sont présentées sur la **figure 8**. Dans ce but, on a retenu les protocoles décrits ci-après :

- Pour les mesures effectuées sur le lait :
  - Prélever 5 mL de l'échantillon de lait dans un tube plastique et pratiquer les ajouts de concentrations en plomb et en cadmium tels que prévus dans le tableau 23
  - Ajouter 10 mL H<sub>2</sub>O, 3 mL HNO<sub>3</sub> et 1,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- Puis, ajouter le mélange de modificateur  $Mg(NO_3)_2$  et  $NH_4H_2PO_4$  qui représente de 0,03 à 0,1% de la solution de mesure finale
- Mélanger et évaporer à sec sur le *DigiPREP* à 95°C
- Reprendre par 30 mL  $HNO_3$  1% et évaporer jusqu'à 20 mL
- Diluer à 25 mL dans une fiole par  $HNO_3$  1 %
- Utiliser la SAAE pour les mesures de plomb et de cadmium
- Pour les mesures effectuées sur protéines :
  - Verser 2,0 g des protéines du lait (~ 50 mL de lait) dans un tube plastique
  - Ajouter 5 mL  $H_2O$  et ajouter au total 20 mL  $HNO_3$  et 10 mL  $H_2O_2$  en 3 fois
  - Puis, ajouter le mélange de modificateur  $Mg(NO_3)_2$  et  $NH_4H_2PO_4$  qui représente de 0,03 à 0,1% de la solution de mesure finale
  - Mélanger et évaporer à sec sur le *DigiPREP* à 95°C
  - Reprendre par 20 mL  $HNO_3$  1% et évaporer jusqu'à 10 mL
  - Utiliser la SAAE pour les mesures



**Figure 8 : Courbes d'étalonnage obtenues pour Cd et Pb dans le lait et dans les protéines**



A partir des courbes d'étalonnages de Cd et Pb, il apparaît qu'on retrouve le même domaine de linéarité que celui observé précédemment sur les solutions étalons : on peut placer la limite supérieure du domaine de linéarité à une concentration d'environ  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium et d'environ  $35 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb.

Pour calculer des limites de détection et de quantification du plomb et du cadmium sur le lait, nous avons donc préparé 3 essais pour le lait (5mL), 3 essais pour les protéines (2,0g), ainsi que 3 blancs analytiques pour le lait et 3 blancs analytiques pour les protéines en appliquant les protocoles suivants :

- Pour chaque essai sur le lait, prélever un échantillon analytique de 5mL
  - + Effectuer un ajout, tel qu'on obtienne une concentration d'ajout sur la solution de mesure de  $30,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb et de  $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium
  - + Ajouter 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 3 mL  $\text{HNO}_3$  et 1,5 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$
  - + Puis, ajouter le mélange de modificateur  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  et  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  qui représente de 0,03 à 0,1% de la solution de mesure finale
  - + Mélanger et évaporer à sec sur le *Digi*PREP à  $95^\circ\text{C}$
  - + Reprendre par 30 mL  $\text{HNO}_3$  1% et évaporer jusqu'à 20 mL
  - + Diluer à 25 mL dans une fiole par  $\text{HNO}_3$  1 %
  - + Utiliser la SAAE pour la mesure
- Pour chaque essai sur les protéines, prélever un échantillon analytique de 2g de protéines
  - + Effectuer un ajout, tel qu'on obtienne une concentration d'ajout sur la solution de mesure de  $30,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb et de  $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium
  - + Ajouter 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  et ajouter en 3 fois 20 mL  $\text{HNO}_3$  et 10 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  au total
  - + Puis, ajouter le mélange de modificateur  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  et  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  qui représente de 0,03 à 0,1% de la solution de mesure finale
  - + Mélanger et évaporer à sec sur le *Digi*PREP à  $95^\circ\text{C}$
  - + Reprendre par 30 mL  $\text{HNO}_3$  1% et évaporer jusqu'à 10 mL
  - + Utiliser la SAAE pour la mesure
- Pour les 3 blancs analytiques du lait :
  - + Ajouter 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 3 mL  $\text{HNO}_3$  et 1,5 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$
  - + Puis, ajouter le mélange de modificateur  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  et  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  qui représente de 0,03 à 0,1% de la solution de mesure finale
  - + Mélanger et évaporer à sec sur le *Digi*PREP à  $95^\circ\text{C}$

- + Reprendre par 30 mL HNO<sub>3</sub> 1% et évaporer jusqu'à 20 mL
- + Diluer à 25 mL dans une fiole par HNO<sub>3</sub> 1 %
- + Utiliser la SAAE pour la mesure
- Pour les 3 blancs analytiques des protéines
  - + Ajouter 5 mL H<sub>2</sub>O et ajouter en 3 fois 20 mL HNO<sub>3</sub> et 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au total
  - + Puis, ajouter le mélange de modificateur Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> et NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> qui représente de 0,03 à 0,1% de la solution de mesure finale
  - + Mélanger et évaporer à sec sur le *DigiPREP* à 95°C
  - + Reprendre par 30 mL HNO<sub>3</sub> 1% et évaporer jusqu'à 10 mL
  - + Utiliser la SAAE pour la mesure

On effectue ainsi 6 mesures pour chacun des 2 éléments sur l'échantillon de lait et sur les protéines : nos résultats sont présentés dans le **tableau 24**

**Tableau 24 : Résultats obtenus pour la droite d'étalonnage (en unités d'absorbance)**

Lait				Protéines			
Cd (µg.L <sup>-1</sup> )		Pb (µg.L <sup>-1</sup> )		Cd (µg.L <sup>-1</sup> )		Pb (µg.L <sup>-1</sup> )	
Blanc	3,0 (ppb)	Blanc	30 (ppb)	Blanc	3,0 (ppb)	Blanc	30 (ppb)
0,0021	0,2717	0,0021	0,1707	0,0019	0,2739	0,0018	0,1745
0,0024	0,2706	0,0024	0,1718	0,0021	0,2726	0,0021	0,1751
0,0022	0,2713	0,0020	0,1710	0,0022	0,2731	0,0020	0,1742
0,0022	0,2712	0,0022	0,1712	0,0021	0,2732	0,0020	0,1746

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été calculées comme au paragraphe 2.3.1.3.2 sur les solutions de mesure. Mais ces limites doivent être multipliées ensuite par un facteur de dilution qui permettra de déterminer les limites de détection et de quantification effectives sur le lait.

$$LD_{\text{lait}} = LD_{\text{s.l.}} \times d_1$$

$$LQ_{\text{lait}} = LQ_{\text{s.l.}} \times d_1$$

$$LD_{\text{lait (par les protéines)}} = LD_{\text{s.p.}} \times d_p$$

$$LQ_{\text{lait (par les protéines)}} = LQ_{\text{s.p.}} \times d_p$$

$d_1$  est le coefficient de dilution pour le lait (soit 25mL/5mL = 5)

$d_p$  est le coefficient de dilution pour les protéines (soit 10mL/50mL (2g) = 1/5)

s.l. : solution de mesure pour le lait

s.p. : solution de mesure pour les protéines

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) du plomb et du cadmium sont les suivantes :

Pour Pb :

$$LD_{\text{lait}} = LD_{\text{s.l.}} \times d_l = 0,8 \times 5 = 4,0 \mu\text{g.L}^{-1}$$

$$LQ_{\text{lait}} = LQ_{\text{s.l.}} \times d_l = 1,8 \times 5 = 9,0 \mu\text{g.L}^{-1}$$

$$LD_{\text{lait (par les protéines)}} = LD_{\text{s.p.}} \times d_p = 0,7 / 5 = 0,14 \mu\text{g.L}^{-1}$$

$$LQ_{\text{lait (par les protéines)}} = LQ_{\text{s.p.}} \times d_p = 1,5 / 5 = 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$$

Pour Cd :

$$LD_{\text{lait}} = LD_{\text{s.l.}} \times d_l = 0,05 \times 5 = 0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$$

$$LQ_{\text{lait}} = LQ_{\text{s.l.}} \times d_l = 0,12 \times 5 = 0,60 \mu\text{g.L}^{-1}$$

$$LD_{\text{lait (par les protéines)}} = LD_{\text{s.p.}} \times d_p = 0,05 / 5 = 0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$$

$$LQ_{\text{lait (par les protéines)}} = LQ_{\text{s.p.}} \times d_p = 0,128 / 5 = 0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$$

Nous avons trouvé les meilleures limites de détection et de quantification après séparer des composants du lait. Les résultats sont présentés dans le tableau 24.

**Tableau 25 : Limites de détection et de quantification obtenues pour Pb et Cd**

	Pour le cadmium ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )			Pour le plomb ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )		
	Solution synthétique	Lait	Lait par protéines	Solution synthétique	Lait	Lait par protéines
Limite de détection (LD)	0,04	0,25	0,01	0,5	4,0	0,14
Limite de quantification (LQ)	0,11	0,60	0,03	1,4	9,0	0,30

## 2.4. CONCLUSIONS

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi la spectrométrie d'absorption atomique pour doser le plomb et le cadmium, après minéralisation des échantillons par le *DigiPREP*

En ce qui concerne le traitement des échantillons de lait, la première étape consiste à séparer le lait en 3 phases (protéines, lipides, sérum) et, parmi les différentes méthodes proposées, nous avons choisi d'opérer avec le mélange de solvants suivant :

- 1 Vol. de lait

- 1 Vol. d'une solution NaCl 0,9%
- 2 Vol. d'éthanol
- 4 Vol. de dichlorométhane

Deux modes de séparation ont été testés : une centrifugation et une décantation. Avec le centrifugeur, le temps de séparation est court (30 minutes environ), alors que le temps de séparation est beaucoup plus long (environ 24 heures) avec une ampoule à décanter. Après cette première séparation, les protéines se retrouvent sous forme solide entre les deux phases liquides, les lipides ayant été solubilisés par le dichlorométhane qui constitue la phase liquide du dessous.

Nous avons effectivement montré qu'après séparation du lait en ses 3 principales fractions, le plomb et le cadmium se retrouvent totalement dans la phase protéique et qu'aucune trace de ces éléments n'est décelée dans les deux autres fractions : on aura donc intérêt à déterminer Pb et Cd sur les protéines du lait, puisqu'on dispose ainsi d'un moyen simple pour effectuer une pré-concentration de ces éléments traces.

Nous avons cherché à optimiser les conditions de minéralisation, en considérant 3 facteurs :

- VRM / PE : volume des réactifs de minéralisation / Prise d'essai  
(facteur 1 :  $X_1 = 12 \text{ mL.g}^{-1}$  ou  $24 \text{ mL.g}^{-1}$ )
- PE : taille de la prise d'essai (facteur 2 :  $X_2 = 0,2\text{g}$  ou  $2\text{g}$ )
- TM : température de minéralisation (facteur 3 :  $X_3 = 90^\circ\text{C}$  ou  $100^\circ\text{C}$ )
- Les réponses mesurées sont les concentrations du plomb et du cadmium

Un plan d'expérience complet  $2^3$  a permis de montrer que seule la taille de la prise d'essai a un effet positif et qu'en conséquence, on a intérêt à choisir une prise d'essai de 2g, en se contentant d'utiliser un volume de réactifs de 24 mL.

On a initialement ajouté au lait différents volumes de la solution standard pour obtenir, dans la solution de mesure finale, une gamme de concentrations allant de 0,05 à 7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium et de 0,5 à 70  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb. Les échantillons ainsi préparés ont été laissés au réfrigérateur pendant 48 heures avant d'effectuer les analyses. Les courbes d'étalonnage obtenues montrent que la limite supérieure du domaine de linéarité semble se placer à une concentration de 3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium et de 35  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb. Il est alors possible de calculer les paramètres de la droite d'étalonnage pour en tirer les limites de détection (LD) et de quantification (LQ). A partir de 2g de protéines qui représentent environ 50 mL de lait, les limites de détection  $LD_{\text{lait}}$  et de quantification  $LQ_{\text{lait}}$  sont en fait abaissées d'un facteur 5. On a donc abouti à des limites de détection de 0,14

$\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb et de  $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd, qui étaient respectivement au mieux jusqu'ici de  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb (Frkovic A et al. 1997) et de  $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd (Milhaud G.E. et al. 2000). Il reste encore tout à fait possible d'améliorer ces seuils de détection en se basant sur le même principe mais en améliorant la technique de séparation initiale du lait en ses phases ; par exemple faire une prise d'essai de 5g de protéines et plus, au lieu de 2g.

# **Chapitre 3**

## **Détermination des contaminants organiques**

# CHAPITRE 3 : DETERMINATION DES CONTAMINANTS ORGANIQUES

## 3.1. PROTOCOLE ANALYTIQUE

### 3.1.1. Traitement de l'échantillon analytique

Nous allons présenter ici quelques-unes des méthodes d'extraction qui sont appliquées à l'analyse des composés organiques dans des échantillons de lait et de produits laitiers.

#### 3.1.1.1. Méthodes d'extraction appliquées à un échantillon de lait liquide

Pour le traitement de tels échantillons, on a le plus souvent recours soit à une méthode d'extraction liquide-liquide (LLE), soit à une méthode d'extraction en phase solide (SPE).

##### 3.1.1.1.1. *Extraction liquide-liquide (LLE)*

Le principe de cette méthode peut se résumer en 3 points :

1. on joue sur la différence de distribution de la molécule recherchée entre deux phases liquides non miscibles, un solvant d'extraction et une solution de l'échantillon ;
2. l'échantillon en solution est placé en même temps que le solvant dans une ampoule à décanter ;
3. après agitation, la molécule à extraire est récupérée dans la phase organique.

L'extraction liquide-liquide a été appliquée dans de nombreuses études pour extraire la phase lipidique du lait et, dans ce but, on a souvent utilisé des solvants ou des mélanges de solvants, comme par exemple : hexane (Shi J. 1998, Greizerstein H.B. 1999, etc.), diéthyl-éther/éther de pétrole (Iida T 1999, Ramos L. 2000, etc.), acétone/hexane (Glynn A.W. 2001, Var R. 1993, etc.), oxalate/méthanol/pétrole (Costopoulou D. 2006, Yu Zhiwei 2006, etc.), dichlorométhane/cyclohexane/toluène (Krokos F 1996, etc.)...

##### 3.1.1.1.2. *Extraction en phase solide (SPE)*

Cette méthode comprend 4 étapes :

1. un conditionnement de l'adsorbant ;

2. le passage de la matrice aqueuse à travers l'adsorbant ;
3. une élimination des interférences par passage d'un solvant organique ;
4. la récupération des molécules recherchées à l'aide d'un autre solvant organique.

Pour cette méthode, les phases solides les plus utilisées sont apparemment les suivantes : C<sub>18</sub> (Pycó Y 1995, Focant J.-F. 2005, etc.), Bio-Beads SX-3 (Schoula R. 1996, Kunisue T. 2004, etc.), diatomites (Minh N.H. 2004, Sudaryanto A. 2006 etc.)...

### **3.1.1.2. Méthodes d'extraction appliquées à un lait en poudre**

Les méthodes d'extraction en phase liquide les plus couramment utilisées pour traiter des échantillons de lait en poudre font appel aux micro-ondes ou à un appareil de Soxhlet .

#### ***3.1.1.2.1. Extraction au moyen d'un système à micro-ondes***

Le principe de cette méthode peut être très simplement décrit : l'échantillon et un solvant d'extraction sont placés dans un réacteur fermé ou ouvert. Si le solvant absorbe les micro-ondes, échantillon et solvant sont placés dans un réacteur fermé. Les radiations chauffent alors le solvant à une température supérieure à son point d'ébullition et l'on réalise ainsi une extraction rapide par le solvant chaud sous pression modérée. Par contre, si le solvant n'absorbe pas les micro-ondes, échantillon et solvant sont placés dans un réacteur fermé ou ouvert. L'échantillon absorbe les radiations mais le solvant reste froid et l'échantillon libère alors les molécules recherchées dans le solvant froid.

Les avantages d'un tel procédé sont d'utiliser moins de solvant que dans les extractions classiques mais aussi de mieux contrôler l'échange de chaleur entre échantillon et solvant, en jouant sur la capacité des solvants à absorber les micro-ondes ;

Les inconvénients résident surtout dans les précautions qu'il va falloir prendre concernant le rayonnement des micro-ondes ou le fait qu'on opère parfois dans une cellule sous pression.

#### ***3.1.1.2.2. Extraction au moyen d'un Soxhlet***

Cette méthode d'extraction en continu peut être décomposée en 4 étapes :

1. une vaporisation du solvant d'extraction placé dans un ballon ;
2. la condensation des vapeurs de solvant dans un réfrigérant ;
3. l'écoulement du solvant condensé dans la cartouche d'extraction qui contient l'échantillon ;



4. le retour du solvant, après extraction, à travers un siphon, dans le ballon qui contient le solvant, lequel subit ainsi progressivement un enrichissement en molécules recherchées.

Cette méthode a été souvent appliquée et plusieurs études peuvent être citées : Abad E. 2002, Pitarch E. 2003, Thomas G.O. 1997, Sewart A. 1996, Ott M. 1999, Papadopoulos A. 2004, etc.

Par ailleurs, une technique d'extraction par un solvant sous pression à chaud (PSE) – ou extraction accélérée par solvant (ASE) – est une autre méthode qui a été appliquée à des matrices solides ou semi-solides : pour extraire les composés organiques, on utilise alors un système semi-automatisé où les solvants, portés à des températures très élevées, sont maintenus à l'état liquide par une forte pression. Outre la nature du solvant d'extraction, le paramètre d'extraction le plus important est alors la température, dont l'augmentation permet d'accroître la vitesse d'extraction et d'en réduire ainsi la durée. On constate qu'une augmentation de 10°C suffit à accroître de façon notable la vitesse d'extraction et que, simultanément, la diminution de viscosité du solvant facilite sa pénétration dans la matrice, ce qui se traduit par un accroissement de la solubilité des analytes. (Costera A et al., 2006).

### **3.1.2. Méthode de dosage**

La détermination des dioxines et des PCBs fait essentiellement appel à la chromatographie en phase gazeuse : la figure 9 rappelle le schéma de principe d'un chromatographe.

C'est ainsi que sont rapidement réalisées de nombreuses analyses de routine. Dans le domaine de l'environnement par exemple, de nombreux pays ont choisi ce moyen pour mesurer en continu les niveaux d'émission des dioxydes d'azote, de carbone et du monoxyde de carbone en certains points de contrôle. La chromatographie gazeuse est également utile dans le cadre de l'analyse des produits pharmaceutiques, de l'alcool dans le sang, des huiles essentielles, des produits alimentaires, etc.

Cette méthode consiste à injecter l'échantillon à analyser dans un courant de gaz inerte, en général de l'hélium ou de l'argon ; c'est le gaz porteur. Les échantillons liquides doivent être vaporisés dans ce gaz vecteur avant l'injection. Le flux gazeux traverse alors une colonne qui contient la phase stationnaire et les composés qui se trouvent dans l'échantillon avancent à des vitesses qui dépendent du degré d'interaction de chaque constituant avec la phase non-volatile stationnaire. Les substances ayant le plus d'affinité pour la phase stationnaire sont les plus fortement retardées. Au moment de leur élution de

la colonne, les différents composés peuvent être quantifiés au moyen d'un détecteur puis éventuellement récupérés pour des analyses complémentaires.

Le choix du gaz porteur dépend essentiellement du type de détecteur qui est utilisé et des composants qui doivent être déterminés. Ce gaz doit être de haute pureté et chimiquement inerte vis-à-vis de l'échantillon : on va choisir par exemple de l'hélium (He), de l'argon (Ar), de l'azote (N<sub>2</sub>), du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) ou de l'hydrogène (H<sub>2</sub>), ce gaz traversant éventuellement un tamis moléculaire afin d'éliminer l'eau ou d'autres impuretés.

Les échantillons gazeux et liquides peuvent être injectés au moyen d'une seringue ; dans le cas le plus simple, l'échantillon est d'abord injecté dans une chambre chauffée, où il est vaporisé avant d'être transféré vers la colonne. Lorsqu'on utilise des colonnes remplies, la première partie de la colonne, localement chauffée à la bonne température, sert souvent de chambre d'injection. Dans le cas des colonnes capillaires, on a recours à une chambre d'injection séparée et seule une petite partie de l'échantillon vaporisé ou gazeux est transférée vers la colonne : c'est ce que l'on appelle une injection à débit divisé. Cette opération est nécessaire pour ne pas surcharger la colonne par un trop grand volume d'échantillon. Lorsqu'on est en présence de quantités à l'état de traces dans l'échantillon, on peut effectuer une injection directe dans le chromatographe en phase gazeuse : l'échantillon liquide est directement injecté dans la colonne capillaire avec une seringue et on laisse ensuite le solvant s'évaporer, ce qui conduit à une concentration des composants de l'échantillon. Si l'échantillon est gazeux la concentration peut être réalisée par condensation à froid (« cryo focusing ») : les composants de l'échantillon sont concentrés et séparés de la matrice par condensation dans un piège à froid avant la séparation chromatographique (Tranchant J. et al., 1982)

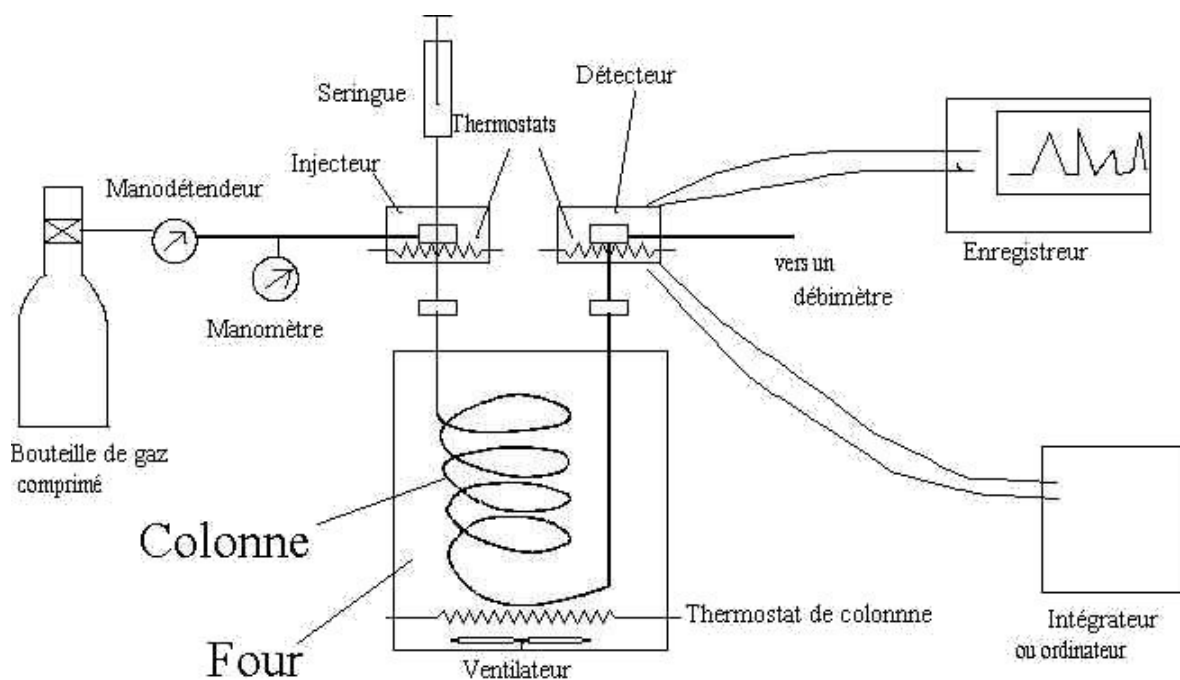
La colonne capillaire est enfermée dans un four qui permet de la maintenir, à un degré près, à la température souhaitée. Cette température est homogène dans tout le four, grâce à un système de ventilation. Les échanges de chaleur avec les autres éléments (injecteur, détecteur) doivent être faibles, et les pertes de chaleur (par conduction, radiation, convection) limitées. L'accès à la colonne est aisé pour faciliter son montage et démontage. La température initiale du four est de 100°C et sa température maximum de 325°C. La température finale d'analyse, qui est de 295°C, sera atteinte au bout de 11mn 30s. Les colonnes capillaires, même si elles permettent certaines séparations qui seraient autrement impossibles (Jennings W., 1980), présentent cependant quelques inconvénients,

le plus important d'entre eux étant leur faible capacité d'échantillonnage, ce qui exige l'utilisation de détecteurs très sensibles ainsi que des techniques d'injection spéciales.

Pour le dosage des PCBs, on utilise habituellement un détecteur à capture d'électrons (ECD), spécifique des composés halogénés. Le gaz vecteur – ici l'azote – est ionisé au moyen d'une source radioactive ( $\text{Ni}^{63}$ ) qui émet des particules  $\beta$  avec formation d'électrons lents. Ces électrons produisent un courant constant dont l'intensité diminue lors du passage de composés contenant un halogénure ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ) car ces composés captent une partie des électrons; cette diminution se traduit par un pic (Zweig G. et Sherma J., 1972).

Pour les PCBs, la spectrométrie de masse est aussi un excellent détecteur : celle-ci permet à la fois l'identification et le dosage des composés organiques préalablement séparés.

Deux modes différents peuvent être utilisés pour l'enregistrement : le mode SCAN (balayage) et le mode SIM (suivi d'un ion sélectionné). En mode SCAN, l'analyseur de masse du spectromètre va effectuer un balayage pas à pas depuis les masses élevées jusqu'aux plus basses : c'est le mode approprié pour analyser un composé inconnu. On peut alors sommer le courant correspondant à chacun des fragments ioniques pour obtenir ainsi le courant ionique total (TIC) à partir duquel on effectuera le dosage ; Le mode SIM permet quant à lui de détecter certains composés spécifiques avec une très grande sensibilité : on effectue dans ce cas un balayage sélectif qui consiste à donner comme consigne à l'analyseur de ne prendre en compte que certaines masses intéressantes, les ions qualifiants. Ce mode n'est pas conseillé bien sûr pour l'analyse d'un mélange inconnu car on n'accède pas ainsi à une information spectrale complète (De Graeve J. et al., 1986).



**Figure 9 : Schéma de principe d'un chromatographe en phase gazeuse**

(source : [http://www.ac-nancy-metz.fr/enseignement/physique/CHIM/Jumber/CPG/chromato\\_gaz.htm](http://www.ac-nancy-metz.fr/enseignement/physique/CHIM/Jumber/CPG/chromato_gaz.htm))

### 3.1.3. Détermination des limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

Les limites de détection et de quantification sont souvent estimées à partir du bruit de fond de l'enregistrement réalisé sur un blanc d'analyse de l'échantillon.

$$LD = 3 \times h \times R$$

$$LQ = 10 \times h \times R$$

h représente ici l'amplitude moyenne ou maximum du signal sur une fenêtre correspondant à 10 fois la largeur du pic à mi-hauteur de part et d'autre du temps de rétention selon la stabilité

R est le facteur de réponse (quantité/signal), exprimé en quantité (matière/hauteur).

Chaque fois, on réalise trois séries de trois injections des blancs à plusieurs jours d'intervalle.

Si le pic est parasite stable, on va calculer LD et LQ par son amplitude moyenne

Si le pic est parasite, mais n'est pas stable, on va calculer LD et LQ par son amplitude maximum

Si le pic n'est pas parasite, on va calculer LD et LQ par son amplitude moyenne ou maximum.

## 3.2. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES RELATIVES AU DOSAGE DES DIOXINES ET DES PCBS DANS LE LAIT

D'après Liem A. K. D. et al. (2000), afin d'obtenir une expression globale de la teneur en dioxine dans les aliments, les teneurs de 17 congénères ayant chacune leur propre toxicité sont comparées et converties à l'aide d'un facteur d'équivalence toxique (TEF) en une quantité de dioxine qui produirait toujours le même effet toxique. Cette conversion permet d'obtenir une concentration unique de toxicité équivalente (TEQ) exprimée en 2,3,7,8-polychlorodibenzoparadioxine (2,3,7,8-TCDD). En 1997, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a même préconisé pour le calcul de la TEQ de tenir également compte de la teneur en 12 isomères de polychlorobiphényles (PCBs) possédant leurs propres facteurs d'équivalence de toxicité (dioxin-like).

**Tableau 26 : Exemples de facteurs d'équivalence toxique pour les dioxines**

Congénères	TEF		PCB n°IUPAC	Congénères	TEF	
	Ancien	Nouveau			Ancien	Nouveau
2,3,7,8-TCDD	1	1	<b>Non-ortho PCBs</b>			
1,2,3,7,8-PeCDD	0,5	1	PCB 77	3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle	0,0005	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1	PCB 81	3,4,4',5-tétrachlorobiphényle	0,0001	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1	PCB 126	3,3',4,4',5-pentachlorobiphényle	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1	PCB 169	3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle	0,01	0,01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,01	<b>Mono-ortho PCBs</b>			
			<b>PCB 28</b>	2,4,4'-trichlorobiphényle		
OCDD	0,001	0,0001	PCB 105	2,3,3',4,4'-pentachlorobiphényle	0,0001	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,1	PCB 114	2,3,4,4',5-pentachlorobiphényle	0,0005	0,0005
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,05	<b>PCB 118</b>	2,3',4,4',5-pentachlorobiphényle	0,0001	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	0,5	PCB 123	2',3,4,4',5-pentachlorobiphényle	0,0001	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1	PCB 156	2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphényle	0,0005	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	PCB 157	2,3,3',4,4',5'-hexachlorobiphényle	0,0005	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1	PCB 167	2,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle	0,00001	0,00001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	PCB 189	2,3,3',4,4',5,5'-heptachlorobiphényle	0,0001	0,0001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01	<b>Di-ortho PCBs</b>			
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01	<b>PCB 52</b>	2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle		
OCDF	0,001	0,0001	<b>PCB 101</b>	2,2',4,5,5'-pentachlorobiphényle		
			<b>PCB 138</b>	2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphényle		
			<b>PCB 153</b>	2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle		
			PCB 170	2,2',3,3',4,4',5-heptachlorobiphényle	0,0001	0
			<b>PCB 180</b>	2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphényle	0,00001	0

$$TEQ = \sum_{n1}(PCDD_i \times TEF_i) + \sum_{n2}(PCDF_i \times TEF_i) + \sum_{n3}(PCB_i \times TEF_i) \text{ (Berg M. V. D., 2000)}$$

(On utilise comme indicateurs les PCBs ayant les numéros IUPAC : 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180)

L'OMS a dernièrement recommandé une dose journalière tolérable (DJT) comprise entre 1 et 4 picogrammes TEQ/kg/jour. En France, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) propose pour le lait et les produits laitiers les valeurs guides suivantes:

- 5pg TEQ/g de matière grasse laitière comme limite maximale autorisée dans le lait et les produits laitiers ;
- 3 pg TEQ/g de matière grasse laitière comme valeur d'intervention entraînant une recherche des sources de contamination de l'environnement par les dioxines et la réduction rapide de ces sources ;
- <1 pg TEQ/g de matière grasse laitière comme objectif à atteindre pour l'ensemble du lait et des produits laitiers.

### **3.2.1. Références bibliographiques sur le dosage des dioxines et PCBs**

*En Espagne*, Abad E. et al. (2002) ont procédé à une extraction liquide-liquide pour extraire les PCBs d'échantillons de lait liquide et utilisé le Soxhlet pour extraire les PCBs des échantillons de lait en poudre. La détermination des dioxines et PCBs a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRGC-HRMS) avec une colonne capillaire DB-5 de 60m. La concentration des molécules organiques dans 19 échantillons de lait de Catalogne se trouve comprise entre 0,040 et 0,150 pg.g<sup>-1</sup> pour le 2,3,7,8-TCDF; entre 0,070 et 0,480 pg.g<sup>-1</sup> pour OCDF ; entre 0,010 et 0,210 pg.g<sup>-1</sup> pour le 2,3,7,8-TCDD ; entre 0,190 et 3,270 pg.g<sup>-1</sup> pour OCDD ; entre 0,059 et 2,930 pg.g<sup>-1</sup> pour PCB-77 ; entre 2,130 et 13,790 pg.g<sup>-1</sup> pour PCB-126, etc. La teneur totale obtenue va de 0,09 à 0,9 pg I-TEQ.g<sup>-1</sup> gras pour les dioxines et de 0,37 à 2,22 pg I-TEQ.g<sup>-1</sup> gras pour les PCBs.

Pitarch E. et al. (2003) conseillent le Soxhlet pour une extraction liquide-solide, une cartouche C18 pour des échantillons de sérum humain, le dosage des PCBs étant ensuite réalisé par GC-MS/MS et GC-ECD. La limite de détection de la méthode est alors comprise entre 0,05 et 0,5 ng.mL<sup>-1</sup>. Par ailleurs, Llompart M. et al. (2001) ont extrait les PCBs d'échantillons de lait liquide par une technique de micro-extraction en phase solide, puis déterminé les PCBs par GC-MS/MS-SIM avec une colonne capillaire CPSil-18 ou par

GC-ECD avec une colonne capillaire HP-1. La limite de détection de la méthode est ainsi d'environ  $1 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

Diverses méthodes d'extraction ont été utilisées par Ramos L. et al. (2000) pour traiter des échantillons de lait entier (une extraction liquide supercritique, une extraction liquide-liquide avec éthanol et éther de pétrole, etc.). Les dosages de PCBs ont été ensuite effectués par GC-ECD et GC-MS-SIM. La teneur obtenue pour les PCBs va de  $0,01$  à  $2,21 \text{ ng.g}^{-1}$ . Par ailleurs, des dioxines et PCBs ont été déterminés par Ramos L. et al. (1999) dans un échantillon de yaourt espagnol. Ils ont choisi la GC-MS-SIM et la GC-ECD pour doser des dioxines et PCBs et obtenu une teneur maximale d'environ  $77,9 \text{ ng.g}^{-1}$  pour le PCB-101; la teneur totale maximale obtenue est d'environ  $340 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les HxCDF.

Dans une autre étude sur les polychlorobiphényles dans le lait de soja, Ramos L et al. (1998) ont aussi utilisé la GC-ECD et la GC-MS pour doser des PCBs, avec une limite de détection d'environ  $0,01 \text{ ng.g}^{-1}$ . La teneur obtenue va de  $0,01$  à  $1,46 \text{ ng.g}^{-1}$  pour l'échantillon liquide et de  $0,01$  à  $3,19 \text{ ng.g}^{-1}$  pour l'échantillon en poudre. Par ailleurs, Ramos L et al. (1998) ont également dosé des PCBs dans le lait de soja infantile. La teneur obtenue dans les lipides va de  $0,19$  à  $5,09 \text{ ng.g}^{-1}$  pour le PCB-28, de  $0,83$  à  $7,15 \text{ ng.g}^{-1}$  pour le PCB-101, de  $0,03$  à  $0,82 \text{ ng.g}^{-1}$  pour le PCB-170, etc.

Ramos L et al. (1998) ont enfin déterminé des dioxines et PCBs dans du lait en poudre commercial en provenance d'Espagne. Ils ont appliqué la méthode d'extraction en phase solide (SPE) et d'extraction au moyen d'un Soxhlet pour traiter leurs échantillons, les GC-ECD et HRGC-HRMS pour le dosage des dioxines et PCBs. Les teneurs obtenues dans les lipides vont de  $0,15$  à  $1,82 \text{ ng.g}^{-1}$  pour le PCB-77, de  $0,46$  à  $4,67 \text{ ng.g}^{-1}$  pour le PCB-101, etc. La teneur totale maximale obtenue dans les lipides est d'environ  $32,6 \text{ pg.g}^{-1}$  pour le TCDF,  $19,9 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les HxCDF,  $78,8 \text{ pg.g}^{-1}$  pour l'OCDF,  $34,0 \text{ pg.g}^{-1}$  pour le TCDD,  $14,5 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les HxCDD,  $594 \text{ pg.g}^{-1}$  pour l'OCDD, etc.

Des polychlorobiphényles ont été déterminés dans le lait humain par Angulo R. et al. (1999). Dans cette étude, 100 échantillons de lait humain espagnol ont été collectés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Après une extraction liquide-liquide, le dosage des PCBs a été effectué par GC-ECD. La limite de détection va de  $0,9$  à  $4,0 \text{ ng.mL}^{-1}$  et la limite de quantification de  $2,0$  à  $7,0 \text{ ng.mL}^{-1}$ . Les teneurs mesurées vont de  $0,105$  à  $8,869 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le PCB-28, de  $0,043$  à  $2,733 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le PCB-52 etc. Par ailleurs, Picó Y. et al. (1995) ont utilisé une méthode d'extraction en phase solide sur  $\text{C}_{18}$  pour traiter des échantillons de lait en vue d'y doser les PCBs par GC-ECD. La limite de détection est comprise entre  $0,1$  et  $12,4 \text{ ng.mL}^{-1}$ , avec un taux de récupération d'environ 80%.

Pour une autre étude, González M.J. et al. (1996) ont prélevé, en 1990, 15 échantillons de lait de femme à Paris et 13 échantillons du même type à Madrid. Ils ont été conservés à  $-18^{\circ}\text{C}$ , puis soumis à une extraction liquide-liquide par un mélange de méthanol, chloroforme et hexane. Les dioxines ont été ensuite déterminées par HRGC-HRMS, en utilisant une colonne capillaire DB-5 ( $60\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 0,25\mu\text{m}$ ). La limite de détection va de  $0,4$  à  $1,0 \text{ pg.g}^{-1}$ . La teneur totale obtenue pour les laits de femme en provenance de Paris est d'environ  $380,9 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCDDs et  $103,2 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCDFs ; elle est d'environ  $341,5 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCDDs et  $57,9 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCDFs, s'il s'agit du lait de femmes madrilènes.

*Au Royaume Uni*, les travaux de Santillo D. et al. (2003) ont porté sur la détermination par GC-MS des dioxines et PCBs dans 138 échantillons de beurre provenant de 24 pays. Ils ont appliqué la HRGC-HRMS pour doser les dioxines et les non-ortho PCBs et la HRGC-MS pour le dosage des ortho PCBs. La concentration moyenne des éléments toxiques dans les lipides est au total d'environ  $0,69 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCDD/Fs ; de  $0,64 \text{ ng.g}^{-1}$  pour les non-ortho PCBs ; de  $0,15 \text{ ng.g}^{-1}$  pour les mono-ortho PCBs ; de  $0,60 \text{ pg I-TEQ.g}^{-1}$  pour les PCDD/Fs.

Les concentrations de PCBs dans des matrices biologiques ont été déterminées par Thomas G.O. et al. (1997) qui ont fait appel à une extraction liquide-liquide par l'hexane et à une extraction au Soxhlet avec un mélange d'hexane, acétone et  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pour le traitement des échantillons. Le dosage des PCBs a été ensuite effectué par GC-MS, la limite de quantification se situant alors à peu près entre  $0,1$  et  $2,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ . La teneur totale de 53 congénères de PCBs dans la matière grasse du lait est d'environ  $3,90 \pm 0,79 \text{ ng.g}^{-1}$ , ce que nous noterons pour la suite :  $3,90 \pm 0,79 \text{ ng.g}^{-1}$  (MG).

*En Angleterre*, Krokos et al. (1996) ont déterminé des ortho et non-ortho PCBs dans du lait de détail. Les échantillons de lait de vache ont été collectés au cours de l'hiver et de l'été 1990. Différents mélanges ont été utilisés pour séparer des ortho PCBs, non-ortho PCBs et dioxines : dichlorométhane/cyclohexane (1:4) pour des ortho PCBs ; toluène/dichlorométhane (1:4) pour des non-ortho PCBs et du toluène pour les dioxines. La chromatographie en phase gazeuse à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRGC-HRMS) est retenue pour doser les PCBs. La limite de détection de cette méthode va de  $1,0$  à  $3,0 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les ortho PCBs et de  $0,02$  à  $0,07 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les non-ortho PCBs. Les teneurs sont comprises entre  $2$  et  $95 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les ortho PCBs ; entre  $0,05$  et  $0,6 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les non-ortho PCBs.



Des enquêtes sur les congénères de PCBs dans le lait de vache ont été effectuées par Sewart A. et Jones K. C. (1996). Ils ont effectué leurs prélèvements sur 10 troupeaux de 45 à 190 vaches, en 1993 et 1994. Les échantillons préalablement mélangés à du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> subissent ensuite une extraction au Soxhlet par un mélange hexane/acétone (2 :3) durant 8 heures. Ils ont purifié et déshydraté des échantillons et appliqué les GC-MS et GC-ECD pour doser des congénères de PCBs. La teneur totale en PCBs va de 3,4 à 16,4 ng.g<sup>-1</sup> (MG).

*En France*, Costera A et al. (2006) ont dosé des dioxines et PCBs dans le lait de chèvre : après une extraction par un solvant sous pression à chaud (PSE), ils ont utilisé la chromatographie en phase gazeuse à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution avec une colonne capillaire DB5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm). La limite de détection de cette méthode peut aller jusqu'à 30 fg.g<sup>-1</sup> et les teneurs observées se situent entre 2,22 et 3524,07 ng.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs ; entre 0,08 et 3,83 ng.g<sup>-1</sup> (MG) pour les dioxines.

*En Allemagne*, Walkowiak J et al. (2001) ont réalisé une étude des PCBs sur 171 échantillons de lait humain prélevés au cours de la période 1993-1995. La limite de détection des PCBs par GC-ECD est d'environ 5,0 ng.g<sup>-1</sup> (MG). Les teneurs observées sont comprises entre 173 et 679 ng.g<sup>-1</sup> (MG). Par ailleurs, Schade G. et Heinzow B. (1998) ont appliqué la GC-ECD au dosage des pesticides organochlorés et des PCBs dans du lait de femmes habitant l'Allemagne du Nord. Les échantillons, conservés à - 18 °C, sont ensuite soumis à une extraction en phase solide (SPE) sur florisil avec de l'iso-hexane, puis l'élution est réalisée au moyen d'un mélange iso-hexane/dichlorométhane (80 :20). La limite de détection est d'environ 5,0 ng.g<sup>-1</sup> et la teneur obtenue va de 0,108 à 1,81 µg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs.

Pour étudier des échantillons de lait et de produits laitiers, Malisch R. et al. (2000) ont préalablement traité ces échantillons (lait liquide, beurre et crème) avec Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou NaHSO<sub>4</sub>, puis utilisé un mélange de n-hexane et d'acétone (2:1) ou un mélange d'éthanol, diéthyléther et pentane (40:20:30) pour l'extraction des dioxines à partir des échantillons liquides. Ils ont ajouté, comme standard, un mélange PCDD/PCDF marqué au <sup>13</sup>C, pour étudier le taux de récupération des dioxines à partir d'échantillons solides, après une extraction au Soxhlet de 8 heures, l'hexane étant choisi comme solvant. Les dioxines ont été ensuite déterminées par GC-MS avec une colonne capillaire DB-5. La limite de quantification va de 0,0125 à 0,5 ng.mL<sup>-1</sup>. La concentration des PCDD/Fs est d'environ 4,16 pg (I-TEQ).g<sup>-1</sup> dans le lait, et d'environ 1,41pg (I-TEQ).g<sup>-1</sup> dans le beurre. R. Malisch

(2000) a également déterminé des dioxines dans des échantillons de lait, de beurre et de viande prélevés *en Allemagne et en Hollande*. Il a utilisé la GC-HRMS avec une colonne capillaire de 60 m (DB-5MS ou DB-Dioxin ou SP2331) pour le dosage : la limite de détection semble légèrement inférieure à 0,07 pg.g<sup>-1</sup> (MG). La teneur en dioxines est d'environ 1,96 pg I-TEQ.g<sup>-1</sup> pour le beurre hollandais ; de 4,16 pg I-TEQ.g<sup>-1</sup> pour le lait allemand.

Des pesticides chlorés et PCBs ont été déterminés dans le lait humain par Ott M. et al. (1998). Ils ont effectué l'extraction au moyen d'un Soxhlet ; Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, et un gel de silice ont été utilisés pour le traitement des échantillons, la GC-MS et la GC-ECD pour les dosages. La limite de détection est d'environ 1,0 ng.g<sup>-1</sup> (MG) et la teneur obtenue va de 21 à 2056 ng.g<sup>-1</sup> (MG). Dans une autre étude portant sur le lait de femme, Abraham K. et al. (1998) ont obtenu des teneurs qui vont de 1,0 à 162,4 pg.g<sup>-1</sup> pour les dioxines et de 2,8 à 272 ng.g<sup>-1</sup> pour les PCBs.

Pour le dosage des dioxines et des PCBs etc. dans le lait de vache Hippelein M. et al. (1996) ont effectué des extractions préalables par passage sur des colonnes contenant 400 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et des gels de silice, puis une chromatographie en phase gazeuse à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution avec une colonne capillaire HP Ultra 2 (25m x 0,2mm x 0,33 µm). Les teneurs sont de 0,1 à 4,4 ng.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs et de 0,05 à 2,8 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les dioxines.

*Au Pays-Bas*, Soechitram S. D. et al. (2003) ont dosé les PCBs dans du lait humain en provenance de Hollande et de Hong-Kong : l'extraction a été réalisée au moyen de n-hexane, le dosage par GC-HRMS. La teneur des PCBs dans le lait est comprise entre 3,1 et 27,9pg TEQ/g pour le lait de Hong-Kong ; entre 8,9 et 89,5pg TEQ/g pour le lait hollandais.

Les congénères spécifiques de dioxines et de PCBs coplanaires ont été déterminés par Slob W. et al. (1995) dans du lait de vache. Pour traiter les échantillons, ils ont fait appel à une méthode d'extraction en phase solide (SPE) avec les cendres volantes et à une extraction au toluène au moyen d'un Soxhlet. Les dosages sont ensuite réalisés par GC-HRMS et les teneurs obtenues dans la matière grasse du lait de vache vont de 1,24 à 1,78 pg.g<sup>-1</sup> pour la 2,3,7,8-TCDD, de 3,82 à 4,91 pg.g<sup>-1</sup> pour la 1,2,3,7,8-PCDD, de 0,26 à 0,37 pg.g<sup>-1</sup> de pour la 2,3,7,8-TCDF, de 5,06 à 7,77 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB-77, de 41,5 à 57,54 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB-126, de 13,80 à 17,82 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB-169 etc. Les teneurs mesurées sur les herbes vont de 0,5 à 0,7 pg.g<sup>-1</sup> pour la 2,3,7,8-TCDD, de 2,22 à 2,80 pg.g<sup>-1</sup> pour la 1,2,3,7,8-PCDD, de 1,90 à 3,0 pg.g<sup>-1</sup> pour la 2,3,7,8-TCDF, de 27,10 à 37,30 pg.g<sup>-1</sup> pour le

PCB-77, de 7,20 à 10,40 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB-126, de 2,60 à 3,70 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB-169, etc.

Norén K. et Meironyté D. (2000) ont évalué les contaminations du lait de femme *en Suède* par des organochlorés et organobromés. Les échantillons ont été collectés sur une période comprise entre 1967 et 1997. Ils ont fait appel à la GC-ECD et à la GC-MS-SIM pour les dosages. Les teneurs totales obtenues dans les lipides vont de 324 à 1090 ng.g<sup>-1</sup> pour les PCBs, de 286 à 429 pg.g<sup>-1</sup> de lipides pour les PCDDs et de 28 à 37 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDFs.

Par ailleurs, Glynn A.W. et al. (2001) ont conduit une étude sur les dioxines et PCBs dans 408 échantillons de lait humain suédois, prélevés sur des femmes âgées de 22 à 35 ans. Un mélange acétone/hexane a été utilisé pour extraire la phase lipidique et la GC-MS pour les dosages : la limite de détection dans les lipides est alors d'environ 0,1 pg.g<sup>-1</sup> pour les dioxines et comprise entre 0,015 et 0,06 ng.g<sup>-1</sup> pour les PCBs. Les teneurs obtenues dans les lipides vont de 0,016 à 0,107 ng.g<sup>-1</sup> pour le PCB-77, de 4,6 à 64,1 ng.g<sup>-1</sup> pour le PCB-118, de 33,0 à 186,0 ng.g<sup>-1</sup> pour le PCB-153, de 0,28 à 1,81 pg.g<sup>-1</sup> pour la 2,3,7,8-TCDD, de 33,97 à 316,52 pg.g<sup>-1</sup> pour l'OCDD, de 0,15 à 1,12 pg.g<sup>-1</sup> pour la 2,3,7,8-TCDF, de 0,13 à 0,97 pg.g<sup>-1</sup> pour l'OCDF, etc.

Une autre étude, menée par Grandjean P. et al. (1995), présente les résultats d'une recherche sur les concentrations en organochlorés et métaux toxiques dans 88 échantillons de lait humain. Après une extraction liquide-liquide, les composés organochlorés sont dosés par GC-ECD. Les teneurs obtenues dans les lipides sont comprises entre 234 et 1380 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB-77, entre 19 et 85 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB-81, entre 86 et 219 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB-126, entre 251 et 520 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB-169. La teneur totale dans les lipides va de 382,9 à 799,4 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCDDs et de 46,6 à 63,9 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDFs.

Vaz R. et al. (1993) ont également déterminé la contamination par des organochlorés de laits humains suédois. Pour cette étude, réalisée pour la National Food Administration (NFA) dans la période 1981-1990, les échantillons ont été traités par un mélange de hexane/acétone (1:1) et dosés par GC-ECD. La teneur obtenue pour les PCBs est d'environ entre 0,4 et 2,4 µg.g<sup>-1</sup> (MG).

*En Belgique*, Focant J.-F. et al. (2002, 2002, 2005) ont effectué des études sur les dioxines et les PCBs dans le lait humain. Pour traiter les échantillons, différentes méthodes d'extraction ont été appliquées : une méthode d'extraction liquide-liquide avec un mélange éthanol, ammoniac, diéthyl éther et hexane (Focant 2005) ; une méthode d'extraction en phase solide (SPE) avec C<sub>18</sub> (Focant 2002) ; une méthode d'extraction au Soxhlet avec un

mélange de pentane-dichlorométhane (1 :1) (Focant 2002) ; une méthode d'extraction liquide sous pression (Focant 2002). Les dioxines et PCBs sont déterminés par HRGC-HRMS-SIM avec des colonnes capillaires 5SIL-MS (30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), VF-5MS (50m x 0,20 mm x 0,33  $\mu\text{m}$ ) et HT-8 (25m x 0,22 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ). La limite de détection va de 0,1 à 2,0  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) pour les dioxines et de 3,9 à 48,9  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) pour les PCBs. La teneur des dioxines dans les échantillons est inférieure à 634,4  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) (Focant 2002), de 6,1 à 108,5  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) (Focant 2005). La teneur des PCBs dans les échantillons est inférieure à 240,9  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) (Focant 2002), de 29,2 à 392,7  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) (Focant 2005). Par ailleurs, Covaci A. et al.(2001) ont utilisé différentes colonnes capillaires et la GC-MS pour doser des PCBs congénères. La limite de détection est d'environ 0,4  $\text{pg.}\mu\text{L}^{-1}$  pour les solutions standards de PCBs et 0,2  $\text{ng.g}^{-1}$  pour les PCBs dans les lipides du lait.

Dans une autre étude, Focant J.-F. et al. (2003), ont déterminé les concentrations de dioxines et PCBs dans 35 échantillons de lait de vache pasteurisé. Ils ont appliqué une méthode d'extraction et de purification automatique pour traiter les échantillons et la GC-HRMS avec une colonne capillaire RTX-5 (40m x 0,18mm x 0,2 $\mu\text{m}$ ) pour doser les dioxines et PCBs. La limite de détection va de 0,02 à 0,11  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) pour les dioxines et de 0,08 à 3,36  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) pour les PCBs. La teneur totale obtenue va de 1,26 à 7,22  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) pour les PCDDs, de 0,35 à 2,84  $\text{pg.g}^{-1}$  (MG) pour les PCDFs et de 12,78 à 38,19  $\text{pg.g}^{-1}$  de matière grasse pour les PCBs.

*En Pologne*, à Wielkopolska, Jaraczewska K. et al. (2006) ont prélevé 21 échantillons de sang et 22 échantillons de lait pour doser des PCBs. Ces échantillons ont été conservés dans un congélateur à -20°C. Après une extraction liquide-liquide par un mélange 2x5 mL de n-hexane et d'éthanol (1 :1) pratiquée sur 1,5 mL de lait, les PCBs ont été déterminés par GC-MS-SIM avec une colonne capillaire HT-8 (25m x 0,22 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). Les limites de quantification de la méthode vont de 0,5 à 4  $\text{ng.g}^{-1}$  et la teneur en PCBs est d'environ 133  $\text{ng.g}^{-1}$  (MG).

Pour la détermination de PCBs dans le lait humain, Szyrwińska K. et Lulek J. (2007) ont également utilisé une méthode d'extraction liquide-liquide, après avoir conservé les échantillons à -20°C, puis la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (ECD) pour le dosage des PCBs. La limite de détection va de 0,002 à 0,06  $\text{ng.mL}^{-1}$  ou de 0,05 à 1,7  $\text{ng.g}^{-1}$  (MG). Pour ce travail, ils ont employé des colonnes capillaires DB5 (60m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) et HP1701 (60m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ) pour la séparation des PCBs.

Czaja K. et al. (2001) ont aussi déterminé des organochlorines persistants dans 87 échantillons de lait humain. Après avoir traité des échantillons, ils ont utilisé la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (ECD) pour doser des organochlorines persistants. La limite de détection de cette méthode va de 0,2 à 1,0 ng.mL<sup>-1</sup> et la teneur totale en PCBs va de 4,0 à 18,0 ng.mL<sup>-1</sup> pour des échantillons prélevés 8 mois après l'accouchement ; de 6,0 à 11,0 ng.mL<sup>-1</sup> pour des échantillons prélevés 2 mois après l'accouchement.

*En Grèce*, des échantillons de lait et sérum humain ont été prélevés puis conservés à -40°C par Costopoulou D. et al. (2006). Les lipides du sérum et du lait ont été extraits par un mélange d'oxalate de sodium, méthanol, diéthyl-éther et pétrole puis on a utilisé des colonnes chromatographiques d'alumine et de charbon actif pour purifier les échantillons. Les lipides passent ensuite sur une colonne contenant 10 g 44% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-silica gel et 2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, à la colonne chromatographique d'alumine. Les échantillons sont évaporés à sec puis une reprise est effectuée au moyen de n-nonane pour le dosage de 18 PCBs par GC-HRMS. La limite de détection va alors de 0,1 à 0,15 pg.g<sup>-1</sup> (MG) ; la limite de quantification de 3,62 à 5,00 pg.g<sup>-1</sup> (MG). Les taux de récupération de cette méthode sont compris entre 70 % et 120 %. Pour les dioxines, la limite de quantification va de 2,74 à 3,78 pg.g<sup>-1</sup> de matière grasse. La teneur totale en TEQ est d'environ entre 1,86 et 6,82 pg.g<sup>-1</sup> de matière grasse pour les dioxines.

Papadopoulos A. et al. (2004) ont quant à eux analysé 77 échantillons alimentaires pour y déterminer les dioxines et PCBs. Les échantillons de lait sont traités par la méthode d'extraction liquide-liquide que décrit la procédure de l'AOAC (1990). Les dioxines et PCBs sont dosés par HRGC-HRMS avec une limite de détection qui va de 2,85 à 3,15 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les dioxines et de 2,23 à 2,33 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs. La teneur totale des dioxines va de 3,08 à 3,72 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour le lait de vache ; elle va de 10,39 à 43,50 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour le lait en poudre. La teneur totale des PCBs va de 1,64 à 5,30 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour le lait de vache ; elle va de 2,95 à 6,20 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour le lait en poudre.

*En Slovaquie*, Yu Z. et al. (2007) ont étudié les PCBs contenus dans du lait humain. Les échantillons sont prélevés 4 ou 5 jours après l'accouchement et conservés à -20°C. Pour extraire les lipides dans 60 mL de lait, ils utilisent un mélange de 10 mL d'oxalate de sodium à 5%, 50 mL d'éthanol et 20 mL de diéthyl-éther dans une ampoule à décanter qui est agitée pendant 1 minute. Puis 30 mL d'hexane sont ajoutés et ce mélange est agité pendant 5 minutes. Après évaporation à sec de la phase lipidique, la reprise est effectuée par 1 mL d'hexane puis on fait passer l'échantillon sur une colonne qui contient 0,5 g de

florisil, 1 g de silice gel-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 44%-, 0,5 g de florisil et 1 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les PCBs sont dosés par GC/ECD et par HRGC/LRMS-SIM avec une colonne capillaire DB-5 (60m x 0,25 mm x 0,25 µm). La limite de détection de cette méthode va de 0,062 à 0,597 ng.g<sup>-1</sup> (MG)

Chovancová J. et al. (2005) ont dosé 17 dioxines et 12 (non-ortho et mono-ortho) PCBs dans 87 échantillons de produits alimentaires. Après une extraction liquide-liquide, la GC/HRMS est appliquée pour doser les dioxines et PCBs, avec une colonne capillaire DB5-MS (60m x 0,25mm x 0,25 µm). La limite de détection pour les échantillons de lait va de 0,04 à 0,43 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les dioxines et de 0,03 à 0,42 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs. La teneur totale TEQ dans le lait est d'environ entre 1,57 et 1,91 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les non-ortho PCBs, entre 0,17 et 0,24 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les mono-ortho PCBs et entre 1,31 et 1,56 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les dioxines.

*En Croatie*, des pesticides organochlorés et PCBs ont été déterminés dans le lait humain par Krauthacker B. et al. (1998) : 139 échantillons, prélevés de 1987 à 1995 et conservés à -20°C, ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse. La limite de détection de la méthode serait comprise entre 0,2 et 2,0 ng.g<sup>-1</sup> et les teneurs iraient de 20 à 1575 ng.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs.

*En Slovénie*, Cerkvenik V. et al. (2000) ont déterminé des éléments traces, des pesticides organochlorés et PCBs dans le lait de vache : sur 108 échantillons provenant de 19 laiteries slovènes, un dosage par GC-ECD a été effectué, après extraction par un mélange d'éther de pétrole et Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La limite de détection de cette méthode va de 0,2 à 2,0 ng.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs. La teneur des PCBs va de 2,0 à 80,0 ng.g<sup>-1</sup> (MG) et la teneur totale est d'environ 1000,0 ng.g<sup>-1</sup> (MG).

*En Turquie*, Erdoğan Ö. Et al. (2004) ont déterminé des organo-halogénés persistants sur 37 échantillons de lait humain prélevés à Kahramanmaraş. Après une extraction liquide-liquide par un mélange d'acide formique et de n-hexane : dichlorométhane (5 :1), les échantillons sont purifiés, déshydratés et dosés par GC-ECD et GC-MS avec des colonnes capillaires HT-8 (50m x 0,22mm x 0,25µm) et HT-8 (25m x 0,22 mm x 0,25µm). La limite de détection de cette méthode est d'environ 0,02 ng.g<sup>-1</sup> pour les PCBs avec un taux de récupération qui va de 75 à 85 %. La teneur totale est d'environ entre 0,21 et 1,92 ng.g<sup>-1</sup>.

*En Norvège*, Polder A. et al. (1998) ont réalisé une étude des pesticides chlorés dans du lait humain provenant de la péninsule de Kola (en Russie) : 30 échantillons de lait de femmes ayant 25,1 ± 5,2 ans (hôpital de Murmansk) et 23,5 ± 5,3 ans (hôpital de

Monchegorsk) ont été collectés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Après une extraction liquide-liquide, PCBs et pesticides ont été déterminés par GC-ECD ; les dioxines et non-ortho PCBs par GC-HRMS. La limite de détection qui est d'environ  $0,01 \text{ ng.g}^{-1}$  pour les PCBs, se situe entre  $3$  et  $15 \text{ fg.g}^{-1}$  pour les dioxines et entre  $1$  et  $7 \text{ fg.g}^{-1}$  pour les non-ortho PCBs. La teneur totale va de  $250,5$  à  $1270 \text{ ng.g}^{-1}$  pour les PCBs, de  $105,99$  à  $274,16 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les dioxines et de  $266,1$  à  $563,2 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les non-ortho PCBs. Par ailleurs, Polder A. et al (2003) ont poursuivi leur étude des pesticides chlorés sur 140 échantillons de lait humain en provenance de *Russie* : par GC-ECD et GC-HRMS, la limite de détection est d'environ  $0,004$  à  $0,051 \text{ ng.g}^{-1}$  pour les PCBs ; leur teneur totale est d'environ  $458 \text{ ng.g}^{-1}$  (MG).

*En Finlande*, Kiviranta H. et al. (1999) ont étudié les niveaux de concentration des PCDD/Fs et des PCBs dans 84 échantillons de lait humain, venant de Helsinki (20) et de Kuopio (64). Après extraction par un mélange de diéthyl-éther / hexane, les dosages ont été effectués par HRGC-HRMS avec une colonne capillaire DB-DIOXIN ( $60 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,15 \text{ }\mu\text{m}$ ). La limite de détection de la méthode est de  $0,1$  à  $1,0 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les dioxines et de  $1$  à  $10 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCBs. La teneur totale est comprise entre  $296$  et  $381 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les dioxines; entre  $198$  et  $217 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCBs.

Vartiainen T. et al. (1997) ont déterminé les dioxines et PCBs dans 167 échantillons de lait humain prélevés au hasard (77 échantillons en provenance du Sud et 90 échantillons de l'Est) par GC-HRMS avec une colonne capillaire DB-DIOXIN. La limite de détection est d'environ  $10 \text{ pg.g}^{-1}$  (MG) pour les PCBs et entre  $0,3$  et  $1,0 \text{ pg.g}^{-1}$  (MG) pour les dioxines. La teneur totale TEQ va de  $60,6$  à  $1620 \text{ ng.g}^{-1}$  (MG) pour les PCBs et de  $3,86$  à  $96,3 \text{ pg.g}^{-1}$  (MG) pour les dioxines.

*En République Tchèque*, Bencko V. et al. (1998) ont déterminé des hydrocarbures polyhalogénés dans le lait humain par GC-ECD et GC-MS avec une limite de détection d'environ  $1,0 \text{ ng.g}^{-1}$  pour les PCBs et de  $0,1 \text{ ng.g}^{-1}$  pour les dioxines. La teneur va de  $12,1$  à  $18,4 \text{ pg TEQ.g}^{-1}$  (MG) pour les dioxines ; de  $532$  à  $1069 \text{ ng TEQ.g}^{-1}$  pour les PCBs. Par la suite, au cours des deux années 1999 et 2000, Bencko V. et al. (2004) ont déterminé les teneurs en dioxines et PCBs de 81 nouveaux échantillons de lait humain. Ils sont traités par un mélange hexane/acétone (1:1) et la mesure est effectuée par GC-MS avec une colonne capillaire DB-5. La limite de quantification obtenue est d'environ  $0,2 \text{ pg.g}^{-1}$  (MG) pour les dioxines ; comprise entre  $0,001$  et  $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$  (MG) pour les PCBs. Les teneurs observées dans la matière grasse (MG) vont de  $2,46$  à  $16,4 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCDDs, de  $3,6$  à  $72,3 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCDFs, de  $2,89$  à  $115 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les PCBs non-ortho et de  $5,26$  à  $127 \text{ pg.g}^{-1}$  pour les mono-ortho PCBs.

Schoula R. et al. (1996) ont évalué les contaminations par des organo-chlorés persistants sur des échantillons de lait de femmes, âgées de 18 à 30 ans, collectés en 3 régions de la *République Tchèque*. Après extraction par un mélange de n-hexane et Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis passage sur une colonne Bio-Beads SX-3, le dosage par GC-ECD des PCBs donne une limite de quantification légèrement inférieure à 5 ng.g<sup>-1</sup> (MG). La teneur obtenue est d'environ 936,7 ng.g<sup>-1</sup> (MG).

Des polychlorobiphényles (PCBs) dans le lait de vache ont également été déterminés, en *République Tchèque*, par Šišák M. et al. (1995) : 723 échantillons de lait ont été prélevés et, après une extraction liquide-liquide, les dosages par GC-ECD avec une colonne de verre donnent une teneur totale en PCBs d'environ 300 ng.g<sup>-1</sup> (MG)

*Au Japon*, une étude menée par Sasamoto T. (2006) fait apparaître un changement de concentration des PCDDs, PCDFs et PCBs dans le lait humain. Après une extraction liquide-liquide et passage sur des colonnes de gel de silice et de charbon actif, puis une purification par de l'acide sulfurique, les PCDDs et PCDFs sont séparés sur des colonnes capillaires BPX-DXN (60m x 0,25mm x 0,25µm) et SP-2331 (60m x 0,25 mm x 0,25µm). Les PCBs sont séparés sur des colonnes capillaires SGE HT-8 (50m x 0,22 mm x 0,25 µm). Les dosages effectués par HRGC/HRMS-SIM donnent une limite de détection d'environ 0,03 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCBs et qui va de 0,01 à 0,1 pg.g<sup>-1</sup> pour les dioxines. La teneur totale en TEQ va de 5,4 à 8,5 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDDs ; de 4,0 à 5,5 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDFs et de 6,6 à 11 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs (dioxins like)

Sudaryanto A. et al. (2006) ont déterminé des organochlorines dans du lait de femmes indonésiennes. Après une extraction en phase solide avec des diatomites et élution par un mélange hexane/dichlorométhane, le taux de récupération des PCBs est d'environ 101 ± 4,3 %. Les teneurs en PCBs mesurées dans les lipides par GC-MS et GC-ECD avec une colonne capillaire DB-1 (30m x 0,25mm x 0,25µm) vont de 21 à 33 ng.g<sup>-1</sup>.

Les congénères de dioxines et PCBs dans le lait humain à Tokyo ont été déterminés par Guan P. et al. (2006). Dans le courant des années 1999-2000, ils ont prélevé 240 échantillons de lait de femmes, ayant de 25 à 34 ans, pour doser 14 congénères de PCDDs, 15 congénères de PCDFs et 12 congénères de PCBs par HRGC-HRMS. Les échantillons sont mélangés avec de l'oxalate de sodium, du diéthyl-éther et de l'éthanol, avant une extraction à l'hexane. La limite de détection est d'environ 0,03 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs et comprise entre 0,01 et 0,1 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les dioxines. Pour les femmes ayant de 25 à 29 ans, la teneur totale trouvée dans les lipides du lait est d'environ 8,11 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDDs ; 5,68 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDFs et 9,24 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCBs. Pour les femmes âgées



de 30 à 34 ans, elle est d'environ 9,63 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDDs ; 6,30 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDFs et 12,02 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs.

Par ailleurs, Uehara R. et al. (2006) ont effectué une étude des dioxines dans 839 échantillons de lait de femmes japonaises durant la période qui va de 1997 à 2002. Ils ont dosé par GC-MS 7 isomères de PCDDs, 10 isomères de PCDFs, 4 Co-PCBs et 8 mono-ortho PCBs, après une extraction liquide-liquide avec un mélange d'oxalate de sodium, de diéthyl-éther, éthanol et hexane. La teneur totale obtenue va de 3,7 à 56,0 pg TEQ.g<sup>-1</sup> (MG) pour PCDDs/PCDFs, de 1,2 à 29,5 pg TEQ.g<sup>-1</sup> (MG) pour Co-PCBs et de 0,9 à 16,1 pg TEQ.g<sup>-1</sup> (MG) pour mono-ortho PCBs.

Takekuma M. et al. (2004) ont déterminé des dioxines et PCBs dans 299 échantillons de lait humain à Saitama, au cours de la période 1998-2000, par HRGC-HRMS. La limite de détection est d'environ 0,1 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCBs ; comprise entre 0,02 et 0,05 pg.g<sup>-1</sup> pour les dioxines. La teneur totale va de 36,10 à 469,77 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDDs, de 8,88 à 84,98 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDFs et de 35,8 à 274,12 pg.g<sup>-1</sup> pour les Co-PCBs.

Dans une autre étude, menée par Saito K et al. (2005), sont donnés les résultats obtenus pour des dioxines et l'hexachlorobenzène dans du lait humain japonais. Après avoir traité les échantillons par extraction liquide-liquide, ces chercheurs ont appliqué la GC-MS et la GC-ECD avec des colonnes capillaires DB-17HT (30m x 0,25 mm x 0,15µm) et DB-5(30m x 0,25mm x 0,25µm) pour doser les dioxines et PCBs. La limite de détection est d'environ 0,6 pg.g<sup>-1</sup> pour les 4-5CDD/Fs ; 1,5 pg.g<sup>-1</sup> pour les 6-7 CDD/Fs et 3,0 pg.g<sup>-1</sup> pour les OCDD/F et non-ortho PCBs. La teneur va de 0,0 à 25,5 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB (77) ; de 20,4 à 196,2 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB (126) ; de 0,0 à 93,9 pg.g<sup>-1</sup> pour le PCB (169) ; de 0,0 à 3,8 pg.g<sup>-1</sup> pour la 2,3,7,8-TCDD ; de 27,1 à 266,1 pg.g<sup>-1</sup> pour l'OCDD etc.

Par ailleurs, Tajimi M. et al. (2005) ont dosé des dioxines et des PCBs dans 240 échantillons de lait de Japonaises. Ils ont effectué une extraction liquide-liquide par l'hexane et un mélange oxalate de sodium/diéthyl-éther/éthanol. La GC-HRMS a été choisie pour doser les dioxines et les PCBs. La limite de détection est d'environ entre 0,01 et 0,1 pg.g<sup>-1</sup> pour les dioxines et 0,03 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCBs. La teneur totale en TEQ va de 6,0 à 13,8 pg.g<sup>-1</sup> pour les dioxines et de 5,1 à 9,9 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCBs.

Hashimoto S. et al. (1995) ont également déterminé des dioxines et des PCBs dans du lait humain japonais. Après une extraction liquide-liquide au moyen d'un mélange de KOH, méthanol et hexane, puis un dosage par GC-MS SIM, ils ont obtenu des teneurs totales qui vont de 3,5 à 20 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDDs, de 0,84 à 6,0 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDFs, de 2,8 à 38 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCBs. Sur 415 d'échantillons de lait humain japonais, Matsuura N.

et al. (2001) ont mesuré quant à eux des teneurs totales en dioxines et PCBs qui vont de 13,1 à 29,5 pg TEQ.g<sup>-1</sup> (MG).

Pour une autre étude, Iida T. et al. (1999) ont dosé les dioxines dans le lait de 51 femmes japonaises primipares et sur 44 échantillons de multipares entre 1994 et 1996. Les mamans primipares ont de 21 à 34 ans et les multipares de 25 à 40 ans. Les échantillons sont extraits par un mélange de diéthyl-éther/éther de pétrole (1:1) et les dosages réalisés par GC-MS avec une colonne capillaire SP 2331 (60m x 0,32mm x 0,25 µm). La teneur moyenne totale obtenue pour les échantillons de primipares va de 6,7 à 190 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDDs, de 1,2 à 32 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDFs et de 5,9 à 160 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour PCBs. La teneur moyenne totale obtenue pour les échantillons de multipares va de 7,7 à 190 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDDs, de 1,0 à 26 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDFs et de 4,9 à 120 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs.

Dans une autre étude encore, portant sur les organo-chlorés persistants sur du *lait humain chinois*, Kunisue T. et al. (2004) ont prélevé 40 échantillons qui ont été conservés à -20 °C. Après une extraction des lipides en phase solide (SPE) au moyen d'une colonne Bio-Bead S-X 3, ils les ont fait passer sur une colonne contenant du Florisil activé puis l'élution a été réalisée par l'hexane et un mélange dichlorométhane : hexane (1 :4), avec un taux de récupération d'environ 97,0 ± 4,2 % pour les PCBs et 105,0 ± 5,7 % pour les DDTs etc. Les organochlorés persistants sont ensuite dosés par GC-ECD et HRGC-MSHR. La limite de détection de cette méthode va de 0,3 à 0,5 pg.g<sup>-1</sup> (MG). La teneur totale trouvée dans les lipides est approximativement comprise entre 21 et 51 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDDs, entre 9,4 et 22 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDFs, entre 31 et 47 pg.g<sup>-1</sup> pour les non-ortho PCBs et entre 3700 et 5200 pg.g<sup>-1</sup> pour les mono-ortho PCBs.

Dwernychuk L.W. et al. (2002) ont mesuré la teneur en dioxines dans des échantillons de lait et de sang humain, de poisson, de terre, etc. à Aluoi, province se trouvant au sud du *Vietnam* dans laquelle l'agent orange avait été utilisé durant la guerre. Ils ont employé, d'une part, un mélange d'acétone et de toluène (20:80 v/v) pour extraire les dioxines des échantillons solides au moyen d'un Soxhlet, d'autre part, un mélange d'hexane et de dichlorométhane (1:1 v/v) pour une extraction liquide-liquide des dioxines à partir des échantillons liquides. Le dosage a été ensuite réalisé par HRGC-HRMS-SIM. La limite de détection dans les lipides va de 0,2 à 1,3 pg.g<sup>-1</sup>. La teneur totale en dioxines dans le lait humain est comprise entre 14,7 et 107,3 pg I-TEQ/g. (I-TEQ = unité internationale de toxicité équivalente).

Minh N.H. et al. (2004) ont déterminé des organochlorés persistants dans le lait humain vietnamien (42 échantillons dans le Nord et 44 échantillons dans le Sud du Vietnam). Les échantillons ont subi une extraction en phase solide (SPE) avec une colonne de diatomite de 2 cm de diamètre (10 g de diatomite pour 10 g de lait) puis l'élution est réalisée par 200 mL de diéthyl-éther. Après purification et déshydration, les dosages sont réalisés par GC-ECD avec une colonne capillaire DB-1 (30m) : la limite de détection va de 0,1 à 1,0 ng.g<sup>-1</sup> (MG) avec un taux de récupération d'environ 101 ± 4,9 % pour les PCBs ; 99,5 ± 3,4 % pour les DDTs etc. Les teneurs totales en PCBs restent comprises entre environ 26 et 210 ng.g<sup>-1</sup> (MG).

*En Corée du Sud*, sur 24 échantillons de lait humain prélevés en 1998 sur des non-fumeuses ayant de 24 à 48 ans et conservés à -20°C, Yang Y.-H. et al (2002) ont étudié les concentrations en dioxines et PCBs. La phase organique a été extraite par un mélange acétone/hexane (2 :1) et les dioxines et PCBs dosés par HRGC-HRMS. Leurs teneurs totales vont de 94,73 à 648,16 pg.g<sup>-1</sup> pour les dioxines, de 38 à 248 pg.g<sup>-1</sup> pour les non-ortho PCBs, avec une teneur maximum d'environ 8848 pg.g<sup>-1</sup> pour les mono-ortho PCBs. Yang J. et al. (2002) ont aussi déterminé des dioxines et PCBs dans le lait humain de Coréennes. Les échantillons sont traités par une méthode d'extraction liquide-liquide et les dosages effectués par HRGC-HRMS. La teneur totale TEQ va de 2,01 à 10,51 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDDs, de 1,47 à 48,30 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDFs et de 2,39 à 10,86 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCBs.

*A Taiwan*, dans 36 échantillons prélevés sur des femmes ayant de 20 à 35 ans, Chao H.-R. et al. (2004) ont déterminé les congénères de dioxines et de PCBs par HRGC-HRMS, après une extraction par du n-pentane et une purification sur colonne ; le taux de récupération va de 70 à 130 %. La limite de détection de cette méthode va 0,01 à 10,0 pg.g<sup>-1</sup> (MG) et la limite de quantification est deux fois supérieure. La teneur totale des PCBs dans le lait est comprise entre environ 1,73 et 8,80 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les femmes de moins de 29 ans et entre 3,26 et 9,40 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les femmes de plus de 29 ans. La teneur totale des dioxines dans le lait est comprise entre 50,4 et 361 pg.g<sup>-1</sup> (MG) environ pour les femmes de moins de 29 ans ; entre 76,1 et 439 pg.g<sup>-1</sup> pour les femmes de plus de 29 ans.

Enfin, sur un total de 430 échantillons de lait humain collectés à Taiwan, Wang S.-L. et al. (2004) en ont utilisé 20 sur lesquels ils ont dosé, par GC-HRMS, les dioxines et PCBs avec des quantités détectées qui vont de 0,1 à 20 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les dioxines et de 0,2 à 150 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs. Les teneurs obtenues sont d'environ 140,22 pg.g<sup>-1</sup> de lipides pour les PCDDs ; 17,87 pg.g<sup>-1</sup> de lipides pour les PCDFs ; 54,69 pg.g<sup>-1</sup> de lipides

pour les non-ortho PCBs ; 10115 pg.g<sup>-1</sup> de lipides pour les mono-ortho PCBs et 10170 pg.g<sup>-1</sup> de lipides pour les PCBs (dioxin-like).

*Au Brésil*, Heck M.C. et al. (2007) ont déterminé des PCBs et pesticides organochlorés dans du lait cru, du lait UHT et du lait pasteurisé de vache en provenance de Rio Grande, les échantillons étant conservés à -20°C. Après une extraction liquide-liquide les dosages sont réalisés par GC-ECD avec une colonne capillaire HP-5 (30m x 0,25 mm x 0,25 µm). La limite de détection de cette méthode va de 0,20 à 0,50 ng.g<sup>-1</sup> et la limite de quantification de 0,30 à 0,60 ng.g<sup>-1</sup>. La teneur totale en PCBs parfois inférieures à LQ peut aller jusqu'à 50,6 ng.g<sup>-1</sup> (MG).

Les concentrations en dioxines, PCBs et composés organochlorés ont été déterminées par Paumgarten F.J.R. et al. (2000) dans 40 échantillons de lait humain à Rio de Janeiro. Ils ont utilisé la HRGC-HRMS pour le dosage des dioxines et la HRGC-ECD pour les composés organochlorés et PCBs. La limite de détection est inférieure à 0,1 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les dioxines, comprise entre 1,0 et 10,0 ng.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs. Le taux de récupération de cette méthode va de 65 à 120 % pour les dioxines; de 75 à 110 % pour les composés organochlorés et PCBs. Les teneurs obtenues vont de 0,3 à 3,9 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDFs, de 0,6 à 21 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCDDs et de 3 à 37 ng.g<sup>-1</sup> pour les PCBs.

Par ailleurs, Braga A.M.C.B. et al. (2002) ont déterminé par GC-MS, avec une colonne capillaire DB-5MS, des concentrations en dioxines dans le sol, l'eau, et le lait de vache à Rio de Janeiro. La limite de quantification obtenue est d'environ 0,31 pg.g<sup>-1</sup> (MG) et les teneurs obtenues vont de 4,07 à 6,54 pg. I-TEQ.g<sup>-1</sup> (MG) pour le lait de vache.

*Au Canada*, Newsome W.H. et al. ont étudié PCBs et pesticides organochlorés dans le lait humain. Par GC-MS, avec une colonne DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm), ils ont dosé des PCBs dans 50 échantillons, avec une teneur totale d'environ 10,8 ng.g<sup>-1</sup> (Newsome, 1996). Par GC-ECD, ils ont déterminé des pesticides organochlorés et PCBs dans 497 échantillons avec les limites de détection qui vont de 0,04 à 5,12 ng.g<sup>-1</sup> et des teneurs totales comprises entre 4,19 à 6,78 ng.g<sup>-1</sup> pour les PCBs (Newsome, 1995).

Par ailleurs, Newsome W.H. et Ryan J.J. (1998) ont déterminé des toxaphènes et des composés chlorés dans 100 échantillons de lait humain canadien. Les composés chlorés sont dosés par GC-MS et GC-ECD. Les teneurs totales moyennes obtenues vont de 238 à 247 ng.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs ; de 16,1 à 44,2 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les HxCDDs et de 2,7 à 10,4 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les HxCDFs, etc.

Des concentrations de polychlorobiphényles dans l'alimentation canadienne ont été déterminées par Newsome W.H. et al. (1998). Les PCBs ont été dosés par GC-MS avec

une colonne capillaire DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm). La limite de quantification va de 1 à 63 pg.g<sup>-1</sup>. La teneur totale moyenne obtenue est d'environ 231 pg.g<sup>-1</sup> pour le lait en boîte, 112 pg.g<sup>-1</sup> pour le lait entier, 61 pg.g<sup>-1</sup> pour le lait écrémé etc.

Vingt-cinq congénères de PCBs ont été dosés par Dmitrovic J. et Chan S.C. (2002) dans du lait humain. Ils ont utilisé une méthode d'extraction en phase solide puis la GC-MS avec une colonne DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm). La limite de quantification va de 0,01 à 0,1 ng.mL<sup>-1</sup> et le domaine de linéarité de 0,005 à 0,01 ng.mL<sup>-1</sup>.

Ryan J. J. et al. (1993) ont déterminé, en 1986 et 1987, des PCDDs et des PCDFs dans 412 échantillons de lait humain venant de six provinces au Canada. L'extraction a été réalisée par un mélange d'acétone et d'hexane (2 :1 v/v) et le dosage par GC-MS-SIM, en utilisant une colonne capillaire DB-5 (30m). La limite de détection obtenue est d'environ 1 pg.g<sup>-1</sup>. La concentration des dioxines dans le lait humain est d'environ 23,3 pg TEQ.g<sup>-1</sup> comme indiqué dans le **tableau 27**.

**Tableau 27 : PCDDs et PCDFs dans le lait humain**

(d'après Ryan J.J. et al., 1993)

PCDDs/PCDFs	Concentration (pg.g <sup>-1</sup> MG)	PCDDs/PCDFs	Concentration (pg.g <sup>-1</sup> MG)
2,3,7,8-TCDF	2,9	1,2,3,4,7,8/1,2,3,6,7,8-HxCDD	58
2,3,7,8-TCDD	4,0	1,2,3,7,8,9-HxCDD	14
2,3,4,7,8-PnCDF	8,6	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	14
1,2,3,7,8-PnCDD	9,4	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	106
1,2,3,4,7,8/1,2,3,6,7,8-HxCDF	10,6	OCDD	311
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1,2	<b>TEQ</b>	<b>23,3</b>

*Aux Etats-Unis*, Schechter A. et al. (1998) ont effectué des études sur des dioxines et des PCBs du lait et de sang de femmes américaines. Après traitement des échantillons, ils ont déterminé les dioxines et les PCBs par HRGC-HRMS. La limite de détection de cette méthode est comprise entre environ 0,1 et 0,59 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les dioxines, et entre environ 6,1 et 15,8 pg.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs. Pour le lait de femmes américaines, la teneur totale dans les lipides va de 63 à 285 ng.g<sup>-1</sup> pour les PCBs, de 21 à 309 pg.g<sup>-1</sup> de lipides pour les PCDDs et de 9 à 173 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDFs.

Des études ont été aussi réalisées aux Etats-Unis, en Allemagne, en Finlande, au Canada et en Russie sur des échantillons de lait humain en provenance de *Russie* pour déterminer par GC-MS les PCDDs, PCDFs et PCBs : leurs teneurs exprimées en TEQ sont

comprises entre 6,1 et 7 pg TEQ.g<sup>-1</sup> pour les échantillons de lait venant de Sibérie ; de 26,9 à 28,5 pg TEQ.g<sup>-1</sup> pour les échantillons de lait prélevés à Angarsk et Usolye-Sibirskoye. La limite de détection de cette méthode va de 0,2 à 0,5 pg.g<sup>-1</sup> (Schechter A. et al. 2002).

De leur côté, Schechter A. et al (1998), ont déterminé les dioxines et PCBs dans divers échantillons biologiques américains (lait, sang, placenta, etc.). Ceux-ci ont été prélevés sur 5 de femmes de New-York ayant entre 19 et 34 ans. Le dosage est effectué par HRGC-HRMS et les teneurs obtenues vont de 145-197 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDDs, de 14 à 24 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCDFs et de 18 à 42 pg.g<sup>-1</sup> pour les PCBs.

Greizerstein H.B. et al. (1999) ont aussi déterminé des pesticides et PCBs dans le lait humain par GC-ECD. Les limites de détection vont de 3,5 à 14,1 ng.g<sup>-1</sup> et la teneur totale va de 239 à 428 ng.g<sup>-1</sup> pour les PCBs. Kostyniak P.J. et al. (1999) ont réalisé un travail analytique. Les limites de détection sont d'environ entre 0,001 et 0,193 ng.g<sup>-1</sup> (MG) et la teneur totale va de 46 à 622 ng.g<sup>-1</sup> (MG) pour les PCBs.

La concentration des PCBs dans 95 échantillons de lait humain du *Kazakhstan* sont donnés par She J et al. (1998). La phase lipidique, après extraction à l'hexane, est passée sur une colonne de charbon (AX-21). L'élution se fait ensuite par un mélange hexane/dichlorométhane (1 :1) et les PCBs sont déterminés par HRGC-HRMS avec une colonne capillaire DB-5 (60m x 0,25mm x 0,25µm). La teneur totale des PCBs va de 149 à 1330 ng.g<sup>-1</sup> (MG). Par ailleurs, Lutter C. et al. (1998) ont déterminé des dioxines et PCBs dans 92 d'échantillons de lait de femmes du Kazakhstan par HRGC-HRMS. La teneur en dioxines est comprise entre environ 1,2 et 118,2 pg.g<sup>-1</sup> (MG) et la teneur totale de PCBs est d'environ 410 ng.g<sup>-1</sup> (MG).

Beckmen K.B. et al. (1999) ont appliqué la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à un détecteur UV à barrette de diodes pour doser des PCBs dans le lait et le sang de phoques du nord, venant de l'île St George (*Alaska*). Les échantillons de lait sont soumis à une extraction liquide-liquide par un mélange hexane/ pentane (1:1). La limite de détection de la méthode est d'environ 0,04 ng.g<sup>-1</sup>.

*En Australie*, Quinsey P. M. (1995) ont dosé par GC-MS des résidus organochlorés dans le lait humain à Victoria avec une limite de détection qui va de 0,004 à 0,1 µg.mL : 60 échantillons de lait de femmes ayant de 22 à 36 ans ont été prélevés et conservés à -20 °C. La teneur maximale en PCBs est d'environ 1,0µg.g<sup>-1</sup> (MG).

*Au Zimbabwe*, Chikuni O. et al. (1997) ont déterminé des PCBs, du DDT et ses métabolites dans le lait humain. Des femmes de 18 à 30 ans et vivant depuis environ 5 ans dans la zone de recherche ont été sélectionnées. 175 échantillons ont été prélevés et

conservés à -20°C. Les dosages de PCBs et DDT ont été réalisés par GC avec une colonne capillaire SPB-5 (60m x 0,25 mm x 0,25 µm). La limite de détection de cette méthode est d'environ 2,5 ng.g<sup>-1</sup> pour le PCB-101 et de 8,0 ng.g<sup>-1</sup> pour le DDT. La teneur totale maximale est d'environ 60 ng.g<sup>-1</sup> de lait entier.

**Tableau 28 : Travaux réalisés sur les PCBs**

Auteur (année)	Pays	Méthode de traitement de l'échantillon	Méthode de dosage	Colonne	Teneur dans le lait	Limite de détection	Limite de quantification
Abad E. et al. (2002)	Espagne	ELL ELS (Soxhlet)	HRGC- HRMS-SIM	DB-5 60m	0,059-2,93 (77) 2,13-13,79 (126) (pg .g <sup>-1</sup> )	-	-
Pitarch E. et al. (2003)	Espagne	ELS (Soxhlet) EPS	GC-MS/MS GC-ECD	-	-	0,05-0,5 (ng.mL <sup>-1</sup> )	-
Llompart M et al. (2001)	Espagne	M-EPS	GC-MS/MS- SIM GC-ECD	CPSil-18 HP-1	-	1 (ng.mL <sup>-1</sup> )	-
Ramos L. et al. (2000)	Espagne	ELL (éther de pétrole, éthanol)	GC-MS/MS GC-ECD	-	0,01-2,21 (ng.g <sup>-1</sup> )	-	-
Ramos L. et al. (1999)	Espagne	-	GC-MS/MS GC-ECD	-	77,9 (101) (ng.g <sup>-1</sup> )	-	-
Ramos L. et al. (1998)	Espagne	-	GC-MS/MS GC-ECD	-	0,01-1,46 (ng.g <sup>-1</sup> )	0,01 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Ramos L. et al. (1998)	Espagne	-	GC-MS/MS GC-ECD	-	0,19-5,09 (28) 0,83-7,15 (101) 0,03-0,82 (170) (ng.g <sup>-1</sup> )	-	-
Ramos L. et al. (1998)	Espagne	ELS (Soxhlet) EPS	HRGC-HRMS	-	0,15-1,82 (77) 0,46-4,67 (101) (ng.g <sup>-1</sup> )	-	-



			GC-ECD				
Angulo R. et al. (1999)	Espagne	ELL	GC-ECD	-	0,105-8,869 (28) 0,043-2,733 (52) (ng.mL <sup>-1</sup> )	0,9-4,0 (ng.mL <sup>-1</sup> )	2,0-7,0 (ng.mL <sup>-1</sup> )
Picó Y. et al. (1995)	Espagne	EPS – C <sub>18</sub>	GC-ECD	-		0,1-12,4 (ng.mL <sup>-1</sup> )	-
Santillo D. et al. (2003)	Royaume Uni	EPS	GC-MS	-	0,15 (non-ortho) 0,64 (mono-ortho) (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Thomas G.O. et al. (1997)	Royaume Uni	ELS (Soxhlet) ELL (hexane)	GC-MS	-	3,90± 0,79 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,1-2,1 (ng.mL <sup>-1</sup> )
Krokos et al. (1996)	Royaume Uni	ELL (DCM/cyclohexane, toluène/DCM et toluène)	HRGC-HRMS	-	2-95 (ortho) 0,05-0,6 (non-ortho) (pg.g <sup>-1</sup> )	1-3 (ortho) 0,02-0,07 (non-ortho) (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Sewart A. et al. (1996)	Royaume Uni	ELS (Soxhlet) (hexane/acétone)	GC-MS GC-ECD	-	3,4-16,4 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Costera A. et al. (2006)	France	PSE ou ACE	HRGC-HRMS	DB5-MS 30m	2,22-3524,07 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	30 fg.g <sup>-1</sup>	-
Walkowiak J. et al. (2001)	Allemagne	ELL	GC-ECD	-	173-679 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	5,0 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Schade G. et al. (1998)	Allemagne	ELL	GC-ECD	-	108-1810 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	5 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Ott M. Et al. (1999)	Allemagne	ELS (Soxhlet)	GC-ECD GC-MS	-	21-2056 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	1,0 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-
Abraham K. Et al. (1998)	Allemagne	-	-		2,8-272 (ng.g <sup>-1</sup> )	-	-
Hippelein M. et al. (1996)	Allemagne	EPS	GC-HRMS	HP Ultra 2	0,1-4,4 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Soechitram S. D. et al. (2003)	Pays-Bas	ELL	GC-HRMS	-	3,1-27,9 (Hongkong) 8,9-89,5 (hollandais) (pg TEQ/g)	-	-

Slob W. et al. (1995)	Pays Bas	EPS	GC-HRMS	-	5,06-7,77 (77) 41,5-57,54 (126) 13,8-17,83 (169) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Norén K. et al. (2000)	Suède	EPS	GC-MS GC-ECD		324-1090 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Glynn A.W. et al. (2001)	Suède	ELL (acétone/hexane)	GC-MS	-	0,016-0,107 (77) 4,6-64,1 (118) 33,à-186,0 (153) (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,015-0,06 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	
Grandjean P. et al. (1995)	Suède	ELL	GC-ECD	-	234-1380 (77) 19-85 (81) 86-219 (126) 251-520 (169) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Vaz R. et al. (1993)	Suède	ELL (hexane/acétone)	GC-ECD		400-2400 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Focant J.-F et al. (2005)	Belgique	ELL (éthanol, hexane etc.) EPS (C <sub>18</sub> )	HRGC-HRMS	5Sil-MS F-5MS HT-8	29,2-392,7 (pg.g <sup>-1</sup> )	3,9-48,9 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Focant J.-F. et al. (2002)	Belgique	EPS , ELS (Soxhlet)	HRGC-HRMS		< 240,9 (pg.g <sup>-1</sup> )	-	-
Covaci A. et al. (2001)	Belgique		GC-MS-SIM		19,9 (Max.) (ng.g <sup>-1</sup> )	0,4 (pg.mL <sup>-1</sup> )	0,2 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Focant J.-F. et al. (2003)	Belgique	Extraction automatique	GC-HRMS	RTX-5 40m	12,78-38,19 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,08-3,36 (pg.g <sup>-1</sup> mat.gras)
Jaraczewska K. et al. (2006)	Pologne	ELL (n-hexane/éthanol)	GC-MS-SIM	HT-8 25m	133 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,5-4,0 (ng.g <sup>-1</sup> )
Szyrwinska K et al. (2007)	Pologne	ELL	GC-ECD	DB-5 HP1701	35,0-485,9 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,002-0,06 (ng.mL <sup>-1</sup> )	0,05-1,7 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Czaja K. et al. (2001)	Pologne	-	GC-ECD	-	4,0-18,0 (ng.mL <sup>-1</sup> )	0,2-1,0 (ng.mL <sup>-1</sup> )	
Costopoulou D. et al (2006)	Grèce	ELL (oxalate, méthanol, pétrole, etc.)	GC-HRMS	-	1,29-231,42 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,1-0,15 (pg.g <sup>-1</sup> )	3,62-5,0 (pg.g <sup>-1</sup> )

Papadopoulos A. et al (2004)	Grèce	ELL ELS (Soxhlet)	GC-MS	-	1,64-6,20 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	2,23-2,33 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Yu Zhiwei et al. (2006)	Slovaquie	ELL (oxalate, méthanol, diéthyl-éther, etc.)	GC-ECD GC-MS-SIM	DB-5 60m	310-1304 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,062-0,597 (ng.g <sup>-1</sup> )	
Chovancova J. (2005)	Slovaquie	ELL	GC-MS	-	0,17-1,57 (pg.g <sup>-1</sup> )	0,03-0,42 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Krauthacker B. et al. (1998)	Croatie	ELL	GC	-	20-1575 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,2-2 (ng.mL <sup>-1</sup> )	-
Cerkvenik V. et al. (2000)	Slovénie	ELL	GC-ECD	-	2,0-80 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)		0,02-2,0 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Erdogrul Ö. et al. (2004)	Turquie	ELL (ac.formique, n- hexane, DCM)	GC-MS GC-ECD	HT-8	0,21-1,92 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,02 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Polder A. et al. (1998)	Norvège (Russie)	ELL	GC-HRMS GC-ECD	-	250,5-1270 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,01 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Polder A. et al. (2003)	Norvège	ELL	GC-HRMS GC-ECD	-	458 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,004-0,051 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Kiviranta H. et al. (1999)	Finlande	ELL (diéthyl-éther/hexane)	HRGC-HRMS	DB- DIOXIN	198-217 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	1-10 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Vartiainen T et al. (1997)	Finlande	ELL	GC-HRMS	DB- DIOXIN	60,6-1620,0 (ngTEQ.g <sup>-1</sup> ) (MG)	10 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Bencko V. et al. (1998)	République Tchèque	-	GC-MS GC-ECD		532-1069 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	1,0 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Bencko V. et al. (2004)	République Tchèque	ELL (hexane/acétone)	GC-HRMS	DB-5	2,89-115 (non-o.) 5,26-127 (mono-o.) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,01-0,5 (ng.g <sup>-1</sup> )
Schoula R. et al. (1996)	République Tchèque	EPS (Bio-Beads SX-3)	GC-ECD	-	936,7 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	5,0 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Šišák M. et al. (1995)	République Tchèque	ELL	GC-ECD	-	300 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Sasamoto T. et al. (2006)	Japon	ELL	HRGC-HRMS	HT-8 50m	6,6-11 (pg I-TEQ.g <sup>-1</sup> )	0,03 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Sudaryanto et al. (2006)	Japon	EPS (diatomites)	GC-MS GC-ECD	DB-1 30	21-33 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-

Guan P. et al. (2006)	Japon	ELL (éther éthylique, éthanol, hexane etc.)	HRGC-HRMS	-	9,24-12,02 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,03 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Uehara R. et al. (2006)	Japon	ELL (éther éthylique, éthanol, hexane etc.)	GC-MS	-	1,2-29,5 (Co) 0,9-16,1 (mono-o.) (pg I-TEQ.g <sup>-1</sup> )	-	-
Takekuma M. et al. (2004)	Japon	-	HRGC-HRMS	-	35,8-274,12 (Co) (pg.g <sup>-1</sup> )	0,1 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Saito K. et al. (2005)	Japon	ELL	GC-MS GC-ECD	DB-17HT DB-5	0-25,5 (77) 20,4-169,2 (126) 0-93,9 (169) (pg.g <sup>-1</sup> )	1-3 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Tajimi M et al. (2005)	Japon	ELL	GC-HRMS	-	5,1-9,9 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,03 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Kunisue T. et al. (2004)	Japon	EPS (Bio-Beads SX-3)	GC-HRMS GC-ECD	-	3,7-5,2 (mono-o.) 0,031-0,047 (non-o.) (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,3-0,5 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Minh N.H. et al. (2004)	Japon (Vietnam)	EPS (diatomites)	GC-ECD	DB-1 30m	26-210 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,1-1 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Hashimoto S. et al. (1995)	Japon	ELL	GC-MS-SIM	-	2,8-38 (ng.kg <sup>-1</sup> )	-	-
Matsuura N. et al. (2001)	Japon	ELL	GC-MS	-	13,1-29,5 (TEQ pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Iida T. et al. (1999)	Japon	ELL (diéthyl-éther/éther de pétrole)	GC-MS	SP 2331	5,9-160 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Yang Y.-H. et al. (2002)	Corée du Sud	ELL	HRGC-HRMS	-	8,848 (mono-o.) (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Yang J. et al. (2002)	Corée du Sud	ELL	HRGC-HRMS	-	2,39-10,86 (TEQ pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Chao H.-R. et al. (2004)	Taiwan	ELL	HRGC-HRMS		1,73-8,80 (<29 ans) 3,26-9,40 (>29 ans) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,1-10 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Wang S.-L. et al. (2004)	Taiwan	-	GC-HRMS		54,96 (non-o.) 10115 (mono-o.) 10170 (dioxin like)	0,2-150 (pg.g <sup>-1</sup> )	-

					(pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)		
Heck M.C. et al. (2007)	Brésil	ELL	GC-ECD	HP-5 30m	<LQ -50,6 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,2-0,5 (ng.g <sup>-1</sup> )	0,3-0,6 (ng.g <sup>-1</sup> )
Paumrartten F.J.R. et al. (2000)	Brésil	-	GC-ECD	-	3-37 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	1,0-10,0 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Braga A.M.C.B. et al. (2002)	Brésil	ELS (Soxhlet), ELL (Malisch R. 2000)	GC-MS	DB-5MS	4,07-6,54 (TEQ pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,31 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Newsome W. H. et al. (1996)	Canada	ELL	GC-MS	DB-5 30m	10,8 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Newsome W.H. et al. (1995)	Canada	EPS ELL	GC-ECD		4,19-6,78 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,04-5,12 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Newsome W. H. et al. (1998)	Canada	EPS ELL	GC-MS GC-ECD	-	238-247 (ng.g <sup>-1</sup> lipides)	-	-
Newsome W.H. et al. (1998)	Canada	EPS	GC-MS	DB-5 30m	231 (lait en boîte) 112 (lait entier) 61 (lait écrémé) (pg.g <sup>-1</sup> )	1-63 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Dmitrovic J. et al.	Canada	ESP	GC-MS	DB-5 30m	-	-	0,1-10 (ng.mL <sup>-1</sup> )
Schecter A. et al. (1998)	Etats-Unis	ELL	HRGC-HRMS	-	63-258 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)		6,1-15,8 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Schecter A. et al. (2002)	Etats-Unis (Russie-Sibérie)	ELL	HRGC-HRMS	-	26,9-28,5 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,2-0,5 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Schecter A. Et al. (1998)	Etats-Unis	-	HRGC-HRMS		18-42 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Greizerstein H. B. et al. (1999)	Etats-Unis	ELL (hexane)	GC-ECD		239-428 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	3,5-14,1 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Kostyniak P. J. Et al. (1997)	Etats-Unis	EPS	GC-ECD		46-622 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,001-0,193 (ng.g <sup>-1</sup> lait)	-
She J. et al. (1998)	Etats-Unis (Kazakhstan)	ELL (hexane)	HRGC-HRMS	DB-5 60m	149-1330 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Lutter C. Et al. (1998)	Etats-Unis (Kazakhstan)	ELL	HRGC-HRMS	-	4,1-44,4 410 (total)	-	-

					(ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)		
Beckmen K.B. et al. (1999)	Etats-Unis	ELL	HPLC	-	433,4±197,8 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,04 (ng.g <sup>-1</sup> )	-
Quinsey P.M. et al. (1995)	Australie	EPS	GC-MS		1,0 (Max.) (µg.g <sup>-1</sup> )	0,004-0,1 (µg.g <sup>-1</sup> )	-
Chikuni O. et al. (1997)	Zimbabwe	ELL	GC-ECD		60 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-

**Tableau 29 : Travaux réalisés sur les dioxines**

Auteur (année)	Pays	Méthode de traitement de l'échantillon	Méthode de dosage	Colonne	Teneur dans le lait	Limite de détection	Limite de quantification
Abad E. et al. (2002)	Espagne	ELL ELS (Soxhlet)	HRGC- HRMS-SIM	DB-5 60m	0,09-0,9 (pg .g <sup>-1</sup> )	-	-
Ramos L. et al. (1999)	Espagne	ELL (éther de pétrole, éthanol)	GC-MS/MS GC-ECD	-	340 (HxCDF) (pg .g <sup>-1</sup> )	-	-
Ramos L. et al. (1998)	Espagne	ELS (Soxhlet) EPS	HRGC-HRMS GC-ECD	-	32,6 (TCDF) 19,9 (HxCDF) 34,0 (TCDD) 14,5 (HxCDD) 594 (OCDD) (pg .g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
González et al. (1996)	Espagne (Paris, Madrid)	ELL (méthanol, chloroforme, hexane)	HRGC-HRMS	DB-5 60m	380,9 (PCCDs)-P 103,2 (PCDFs)-P 341,5 (PCDDs)-M 57,9 (PCDFs)-M pg.g <sup>-1</sup>	0,4-1,0 pg.g <sup>-1</sup>	-
Santillo D. et al. (2003)	Royaume Uni	EPS	GC-MS	-	0,69 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Malisch R. et al. (2000)	Allemagne	ELL	GC-HRMS	DB-5	4,16 (pgTEQ.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,1-0,2 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Malisch R. (2000)	Allemagne	-	GC-HRMS	DB-5 DB-Dioxin SP2331	1,96 (hollandais) 4,16 (allemand) (pgTEQ.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,07 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Abraham K. Et al. (1998)	Allemagne	-	-		1,0-162,4 (pg.g <sup>-1</sup> )	-	-
Hippelein M. et al. (1996)	Allemagne	EPS	GC-HRMS	HP Ultra 2	0,05-2,8 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-

Slob W. et al. (1995)	Pays Bas	EPS	GC-HRMS	-	1,24-1,78 (2,3,7,8-D) 0,26-0,37 (2,3,7,8-F) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Norén K. et al. (2000)	Suède	EPS	GC-MS GC-ECD		286-429 (PCDDs) 28-37 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Glynn A.W. et al. (2001)	Suède	ELL (acétone/hexane)	GC-MS	-	0,28-1,81 (2,3,7,8-D) 33,9-316,5 (OCDD) 0,15-1,12 (2,3,7,8-F) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,1 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	
Grandjean P. et al. (1995)	Suède	ELL	GC-ECD	-	282,9-799,4 (PCDDs) 46,6-63,9 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Focant J.-F et al. (2005)	Belgique	ELL (éthanol, hexane etc.) EPS (C <sub>18</sub> )	HRGC-HRMS	5Sil-MS F-5MS HT-8	6,1-108,5 (pg.g <sup>-1</sup> )	0,1-2,0 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Focant J.-F. et al. (2002)	Belgique	EPS , ELS (Soxhlet)	HRGC-HRMS		< 634,4 (pg.g <sup>-1</sup> )	-	-
Focant J.-F. et al. (2003)	Belgique	Extraction automatique	GC-HRMS	RTX-5 40m	1,26-7,22 (PCDDs) 0,35-2,84 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,02-0,11 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Costopoulou D. et al (2006)	Grèce	ELL (oxalate, méthanol, pétrole, etc.	GC-HRMS	-	1,86-6,82 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	2,74-3,78 (pg.g <sup>-1</sup> )
Papadopoulos A. et al (2004)	Grèce	ELL ELS (Soxhlet)	GC-MS	-	3,08-3,72 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	2,85-3,15 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Chovancova J. (2005)	Slovaquie	ELL	GC-MS	-	1,31-1,56 (pg.g <sup>-1</sup> )	0,04-0,43 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Polder A. et al. (1998)	Norvège (Russie)	ELL	GC-HRMS GC-ECD	-	105,99-274,16 (ng.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,003-0,015 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Kiviranta H. et al. (1999)	Finlande	ELL (diéthyl-éther/hexane)	HRGC-HRMS	DB- DIOXIN	296-381 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,1-1,0 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Vartiainen T et al. (1997)	Finlande	ELL	GC-HRMS	DB- DIOXIN	3,86-96,3 (pgTEQ.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,3-1,0 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Bencko V. et al. (1998)	République Tchèque	-	GC-MS		12,1-18,4	100,0	-



			GC-ECD		(pgTEQ.g <sup>-1</sup> ) (MG)	(pg.g <sup>-1</sup> )	
Bencko V. et al. (2004)	République Tchèque	ELL (hexane/acétone)	GC-HRMS	DB-5	2,46-16,4 (PCDDs) 3,6-72,3 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,2 (pg.g <sup>-1</sup> )
Sasamoto T. et al. (2006)	Japon	ELL	HRGC-HRMS	BPX-DXN SP-2331	5,4-8,5 (PCDDs) 4,0-5,5 (PCDFs) (pg I-TEQ.g <sup>-1</sup> )	0,01-0,1 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Guan P. et al. (2006)	Japon	ELL (diéthyl-éther, éthanol, hexane etc.)	HRGC-HRMS	-	8,1-9,63 (PCDDs) 5,68-6,3 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,01-0,1 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Uehara R. et al. (2006)	Japon	ELL (diéthyl-éther, éthanol, hexane etc.)	GC-MS	-	3,7-56,0 (pg I-TEQ.g <sup>-1</sup> )	-	-
Takekuma M. et al. (2004)	Japon	-	HRGC-HRMS	-	36,1-469,8 (PCDDs) 8,88-84,98 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> )	0,02-0,05 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Saito K. et al. (2005)	Japon	ELL	GC-MS GC-ECD	DB-17HT DB-5	<3,8 (2,3,7,8-Ds) 27,1-266,1 (OCDD) (pg.g <sup>-1</sup> )	0,6-3,0 (pg.g <sup>-1</sup> )	-
Kunisue T. et al. (2004)	Japon	EPS (Bio-Beads SX-3)	GC-HRMS GC-ECD	-	3,5-20 (PCDDs) 0,84-6,0 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,3-0,5 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Hashimoto S. et al. (1995)	Japon	ELL	GC-MS-SIM	-	21-51 (PCDDs) 9,4-22 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Iida T. et al. (1999)	Japon	ELL (diéthyl-éther/éther de pétrole)	GC-MS	SP 2331	7,7-190 (PCDDs) 1,0-26,0 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Yang Y.-H. et al. (2002)	Corée du Sud	ELL	HRGC-HRMS	-	94,73-648,16 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Yang J. et al. (2002)	Corée du Sud	ELL	HRGC-HRMS	-	2,01-10,51 (PCDDs) 1,74-48,3 (PCDFs) (TEQ pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Chao H.-R. et al. (2004)	Taiwan	ELL	HRGC-HRMS		50,4-361 (<29 ans) 76,1-439 (>29 ans)	0,1-10 (pg.g <sup>-1</sup> )	-

					(pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)		
Wang S.-L. et al. (2004)	Taiwan	-	GC-HRMS		140,22 (PCDDs) 17,87 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,1-20 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-
Newsome W. H. et al. (1998)	Canada	EPS ELL	GC-MS GC-ECD	-	16,1-44,2 (HxCDDs) 2,7-10,4 (HxCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Ryan J.J. et al. (1993)	Canada	ELL (acétone/ hexane)			4,0-311 (PCDDs) 2,9-14,0 (HxCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,1 (pg.g <sup>-1</sup> )	
Dwernychuk L.W. et al. (2002)	Canada (Vietnam)	ELL (Hexane/DCM) ELS (Soxhlet)	HRGC-HRMS	-	14,7-107,3 (TEQ pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	0,2-1,3 (pg.g <sup>-1</sup> )	
Schechter A. et al. (1998)	Etats-Unis	ELL	HRGC-HRMS	-	104-330 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)		0,1-0,59 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Schechter A. et al. (2002)	Etats-Unis (Russie-Sibérie)	ELL	HRGC-HRMS	-	26,9-28,5 (pgTEQ.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	0,2-0,5 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)
Schechter A. Et al. (1998)	Etats-Unis	-	HRGC-HRMS		145-197 (PCDDs) 14-24 (PCDFs) (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-
Lutter C. Et al. (1998)	Etats-Unis (Kazakhstan)	ELL	HRGC-HRMS	-	1,2-118,2 (pg.g <sup>-1</sup> ) (MG)	-	-

### 3.2.2. Discussion et conclusions

Dioxines et PCBs sont des composés qui s'accumulent dans la matière grasse du lait et des produits laitiers à des concentrations qui vont de l'ordre du nanogramme au picogramme ; il convient donc de porter une attention toute particulière à l'extraction et à la purification. Après une extraction de la matière grasse dans un solvant ou un mélange de solvants – on peut utiliser dans ce but une extraction liquide-liquide, une extraction en phase solide, une extraction au moyen d'un système à micro-ondes, une extraction au moyen d'un Soxhlet, une extraction par un solvant sous pression à chaud – on procède à une purification des extraits par chromatographie d'absorption sur une colonne de charbon actif, de gel de silice actif ou de florisil actif, puis la fraction PCDD/PCDF et PCBs est purifiée sur une colonne d'alumine et déshydratée par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les dosages sont ensuite effectués par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRGC-HRMS) ou par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD), avec une colonne capillaire. La quantification des dioxines s'effectue au moyen d'ajouts dosés. La méthode est validée en utilisant deux étalons internes marqués au <sup>13</sup>C.

Pour faire une synthèse des résultats publiés sur les dioxines et PCBs, on considèrera plus particulièrement les teneurs trouvées, les limites de détection et quantification :

- Les teneurs en dioxines et PCBs sont données dans les **tableaux 28 et 29**
- Les limites de détection et de quantification des dioxines et PCBs sont données dans le tableau suivant :

**Tableau 30 : Meilleures limites de détection et quantification obtenues pour les dioxines et PCBs**

	Par GC-MS (GC-LRMS) (ng.g <sup>-1</sup> )	Par GC-ECD (pg.g <sup>-1</sup> )	Par GC-HRMS (HRGC-HRMS) (pg.g <sup>-1</sup> )
Dioxines	0,001 <i>(Grynn A.W.2001)</i>	0,6-3,0 <i>(Saito K. 2005)</i>	0,01-1,0 <i>(Sasamoto T. 2006, Guan P. 2006)</i>
PCBs	0,015-0,06 <i>(Grynn A.W.2001)</i>	1-3 <i>(Saito K. 2005)</i>	0,01-1,0 <i>(Sasamoto T. 2006, Guan P. 2006)</i>

### 3.3. DETERMINATION DES DIOXINES ET PCBs PAR GC- MS

Nous présenterons dans cette partie les choix que nous avons faits pour réaliser cette étude : les produits et réactifs utilisés, les méthodes utilisées pour le traitement des échantillons de lait et les méthodes mises en œuvre pour l'analyse proprement dit.

#### 3.3.1. Produits et réactifs

##### 3.3.1.1. Solvants

Les solvants utilisés pour la préparation des différentes solutions sont donnés dans le **Tableau 31**.

**Tableau 31 : Liste des solvants utilisés avec leur degré de pureté.**

Solvants	Qualité	Pureté (%)	Fournisseurs
Méthanol	Pour HPLC	$\geq 99,90$	Carlo Erba
Ethanol	Pour HPLC	$\geq 99,90$	Merck
Cyclohexane	Pour GC	99,99	Merck
n-Hexane	Pour GC	99,99	Merck
Isooctane	Pour anal. pesticides	99,5	SDS
Toluène	Pour GC	99,97	Merck
Dichlorométhane	Pour GC	99,99	Merck

##### 3.3.1.2. Standards et réactifs

En ce qui concerne les réactifs utilisés, nous disposons d'un mélange standard de 6 PCBs à  $10\mu\text{g.mL}^{-1}$  dans l'isooctane (PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-138, PCB-153, PCB-180) et de solutions standards individuelles des mêmes PCBs, également dans l'isooctane à  $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Pour les dioxines, nous avons utilisé un mélange BCR614S5, préparé par Fluka. Nous avons également utilisé du chlorure de sodium (NaCl), de l'hydroxyde de potassium (KOH), de l'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), du sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhydre, de l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) et de la pierre ponce. Les caractéristiques de tous ces produits et réactifs sont consignées dans le **Tableau 32**.

A partir des solutions standards à  $10\mu\text{g.mL}^{-1}$  en PCBs, nous avons préparé des solutions mères à  $1\mu\text{g.mL}^{-1}$  en diluant 2 mL de la solution standard dans 20mL d'un solvant approprié (iso-octane, n-hexane, toluène). A partir de ces solutions mères, des solutions étalons de chaque PCB, d'une part, et des 6 PCBs, d'autre part, ont été ensuite

préparées avec des concentrations allant de 0,01 à 100 ng.mL<sup>-1</sup>. Toutes ces solutions sont préparées et stockées dans des flacons ambrés afin de préserver les PCBs de la lumière, puis conservées à l'abri de la lumière à une température de 4°C (réfrigérateur) pendant six semaines environ.

**Tableau 32 : Caractéristiques des produits et réactifs utilisés.**

Produits et réactifs	Conditionnement	Concentration	Pureté (%)	Fournisseur
PCB-28 (2,4,4'-TCB)	Isooctane	10 µg.mL <sup>-1</sup>	-	Reedel-de-Haën
PCB-52 (2,2',5,5'-TeCB)	Isooctane	10 µg.mL <sup>-1</sup>	-	Reedel-de-Haën
PCB-101 (2,2',4,5,5'-PCB)	Isooctane	10 µg.mL <sup>-1</sup>	-	Reedel-de-Haën
PCB-138 (2,2',3,4,4',5'-HeCB)	Isooctane	10 µg.mL <sup>-1</sup>	-	Reedel-de-Haën
PCB-153 (2,2',4,4',5,5'-HeCB)	Isooctane	10 µg.mL <sup>-1</sup>	-	Reedel-de-Haën
PCB-180 (2,2',3,4,4',5,5'-HpCB)	Isooctane	10 µg.mL <sup>-1</sup>	-	Reedel-de-Haën
PCBs (28,52,101,138,153,180)	Isooctane	10 µg.mL <sup>-1</sup>	-	Reedel-de-Haën
Dioxines (BCR 614S5)	-	78,5-802 µg.L <sup>-1</sup>	94,6-99,8	Fluka
Chlorure de sodium (NaCl)	Solide	-	99,99	Merck
Alumine (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Solide	-	-	Merck
Sulfate de sodium anhydre (après déshydratation à 400°C pendant 4 heures, le produit est conservé dans son flacon d'origine)	Solide	-	99,0	Merck
Acide sulfurique	Liquide	-	96,0	Prolabo
Pierre ponce	Solide	-	-	Merck
KOH	Solide	-	-	Prolabo
Silice greffée C18 (ENVI-18, 2,0 g, 12 mL)	Cartouche	-	-	Supelco
Silice (LC-Si, 1 g, 6 mL)	Cartouche	-	-	Supelco
Alumine (LC-Alumina-N SPE Tube, 2 g, 6 mL)	Cartouche	-	-	Supelco

Signalons enfin que l'eau déminéralisée utilisée pour cette étude est produite au moyen d'un système milli-Q de Millipore.

## 3.3.2 Traitement des échantillons

### 3.3.2.1 Extraction liquide-liquide

En général, l'extraction est précédée d'une préparation adaptée à la matrice qui constitue l'échantillon. Les solvants les plus souvent utilisés sont l'hexane ou un mélange d'hexane-dichlorométhane, d'hexane-acétone, d'hexane-méthanol, d'hexane-éthanol, etc., pour extraire quantitativement à la fois PCDD/Fs, PCBs et lipides des denrées alimentaires. Le choix du solvant utilisé pour l'extraction est important et doit être validé.

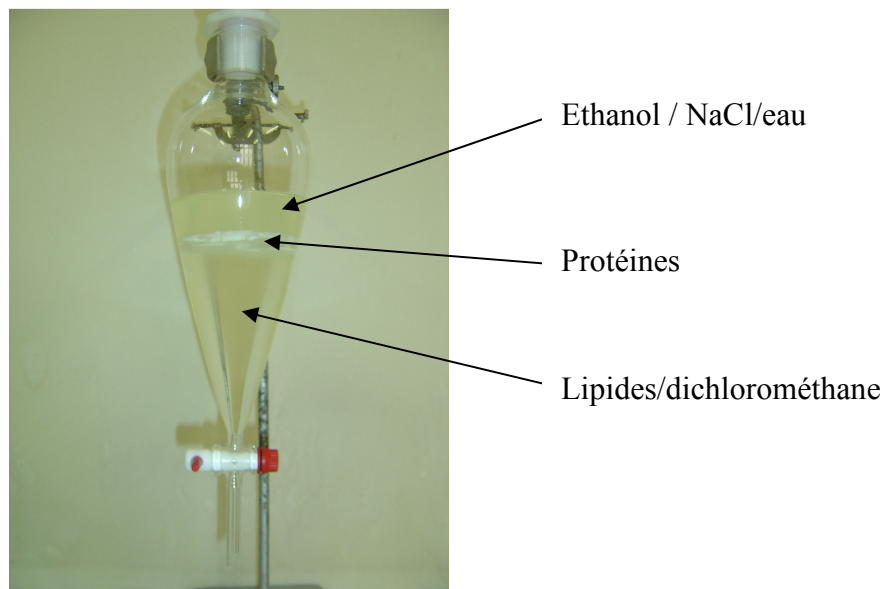
Nous avons mis en œuvre deux techniques d'extraction liquide-liquide pour séparer les différentes fractions du lait : l'une utilise un centrifugeur et l'autre un papier filtre sans cendres (ce papier est lavé 5 fois par une solution d'acide nitrique à 1%, de façon à éliminer toute trace de Cd ou Pb dans la solution d'élution, puis séché et conservé dans un sac en polyéthylène sans contamination). Avant d'effectuer l'extraction, on prépare une solution de NaCl à 0,9% dans de l'eau milli-Q, de l'éthanol, du dichlorométhane et l'on doit veiller à ce que les ampoules à décanter ou les tubes en polypropylène de 250 mL qui vont être utilisés soient extrêmement propres.

Ces deux techniques sont décrites dans le **tableau 33**.

**Tableau 33 : Techniques d'extraction liquide-liquide**

<b>Technique avec centrifugeur</b>	<b>Technique avec papier filtre sans cendres</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Verser 25 mL de lait, 25 mL de NaCl 0,9%, 50 mL d'éthanol, 100 mL de dichlorométhane dans un tube PP 250 mL.</li><li>- Agiter vigoureusement en effectuant un mouvement ascendant/descendant pendant quelques minutes (5 min)</li><li>- Centrifuger 4 tubes ainsi préparés à 25°C et à 3500 tours par minute pendant 15 minutes.</li><li>- Transvaser les phases liquides dans une ampoule à décanter de 1000 mL pour séparer en 2 phases liquides, d'une part, une phase lipides/dichlorométhane, d'autre part, une phase sérum/eau/NaCl. (<b>figure 10</b>)</li><li>- Conserver la phase solide pour doser les métaux (Pb et Cd) et la phase lipidique</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Verser 25 mL de lait, 25 mL de NaCl 0,9%, 50 mL d'éthanol, 100 mL de dichlorométhane dans un tube PP 250 mL.</li><li>- Agiter vigoureusement en effectuant un mouvement ascendant/descendant pendant quelques minutes (5 min)</li><li>- Verser 4 tubes ainsi préparés dans une ampoule à décanter de 1000 mL pour séparer en 3 phases (<b>figure 10</b>) : la phase protéique solide et les 2 phases liquides, d'une part, lipides/dichlorométhane, d'autre part, une phase sérum/eau/NaCl.. On laisse décanter toute une nuit, si besoin.</li><li>- Filtrer sur du papier filtre sans cendres pour séparer la phase protéique. Les 2 phases liquides sont placées de nouveau dans l'ampoule à décanter pour être</li></ul>

pour doser les dioxines et PCBs.	séparées à leur tour. - Conserver la phase solide pour doser les métaux (Pb et Cd) et la phase lipidique pour doser les dioxines et PCBs.
----------------------------------	--



**Figure 10 : Séparation des différentes phases du lait**

Après avoir été séparée, la phase lipidique est purifiée et déshydratée en vue d'une détermination des molécules organiques (BUI X.T. et al. 2007)

### 3.3.2.2 Séparation, déshydratation et purification de l'échantillon

A ce stade de l'analyse, les PCDD/Fs et PCBs sont en solution dans le solvant organique en même temps que la matière grasse. La purification doit permettre de l'éliminer ainsi que d'autres contaminants susceptibles d'interférer avec la mesure des PCDD/Fs et PCBs. Dans ce but, la chromatographie d'adsorption solide-liquide basée sur l'utilisation de réactifs comme la silice (acide, basique, neutre), l'alumine, le florisil ou le charbon actif est largement utilisée et largement décrite dans la littérature. Puis les extraits sont déshydratés par  $H_2SO_4$  ou  $Na_2SO_4$  et purifiés. Cette méthode de purification sélective permet de collecter des fractions contenant les PCDD/Fs et PCBs, en les séparant des autres fractions. En faisant la synthèse de différentes méthodes de séparation, purification et déshydratation de l'échantillon établies par Ryan J.J et al. (1993), Picó Y. et al. (1995), Thomas G.O. et al. (1997), Newsome W. H. et al. (1998), She J. et al. (1998), Pirard C. et al. (2002), Saito K. et al. (2005), Sasamoto T. et al. (2006), etc., on a abouti à la méthode que nous allons exposer et qui se décompose comme suit :

- séparer les molécules organiques par une extraction en phase solide ;
- purifier et déshydrater la phase organique par  $H_2SO_4$  et  $Na_2SO_4$  ;
- passer l'échantillon sur une colonne de gel de silice actif, d'alumine et florisil.

### **3.3.2.2.1 Extraction ou purification sur une phase solide**

Le système utilisé pour l'extraction en phase solide (SPE) est un système manuel VisiPrep (Supelco). Plusieurs types de cartouches ont été essayés selon les besoins. Lorsque la SPE est mise en oeuvre comme technique d'extraction, on choisit des supports hydrophobes, par exemple des supports de silice greffée C18 (ENVI-18, 2,0 g, 12 mL). Lorsque la SPE est utilisée comme technique de purification d'extraits, on essaie un support polaire de silice vierge (LC-Si, 1 g, 6 mL).

La cartouche, quelle que soit sa nature, doit être préalablement conditionnée afin d'activer le support. Ceci est réalisé par percolation d'un ou de plusieurs solvants. Toutefois, les solvants utilisés pour le conditionnement de la cartouche puis pour l'élution des solutés dépendent de la nature de la phase solide. Avant cette percolation, on laisse la phase solide s'imprégner pendant 5 minutes environ du ou des solvants choisis. Après percolation, on laisse une couche de solvant ayant 1 mm d'épaisseur au-dessus de la phase solide afin d'éviter son séchage. Ayant réalisé cette étape de conditionnement, on introduit goutte à goutte (débit  $\sim 1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) la totalité de l'échantillon dans la cartouche. On verse ensuite un solvant d'élution adéquat, de façon à ce qu'il reste en contact avec la phase solide pendant 5 minutes. On élue les solutés retenus sur la phase solide avec un débit de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à la dernière goutte. On reprend éventuellement cette étape d'élution plusieurs fois pour obtenir un meilleur taux de recouvrement.

### **3.3.2.2.2 Etude de l'extraction en phase solide sur un support de silice greffée C18**

Pour activer la silice, les cartouches ont été conditionnées avec du méthanol (5 mL). Nous avons préparé par ailleurs des solutions à des concentrations comprises entre 5,0 et 50,0  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  pour les PCBs ; allant de 0,78 à 8,02 et de 7,85 à 80,2  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  pour les dioxines. On opère comme suit :

- Dans chaque ampoule à décanter de 1000 mL, on introduit 100 mL de NaCl 0,9%, 200 mL d'éthanol et 400 mL dichlorométhane, puis on ajoute 1 mL de solution des PCBs à 5,0 ou 50,0  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  des PCBs; et des dioxines de 0,78 à 8,02 ou de 7,85 à 80,2  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
- On agite vigoureusement pendant 4 à 5 minutes, puis on laisse décanter, au besoin 2 heures, pour séparer les deux phases liquides.



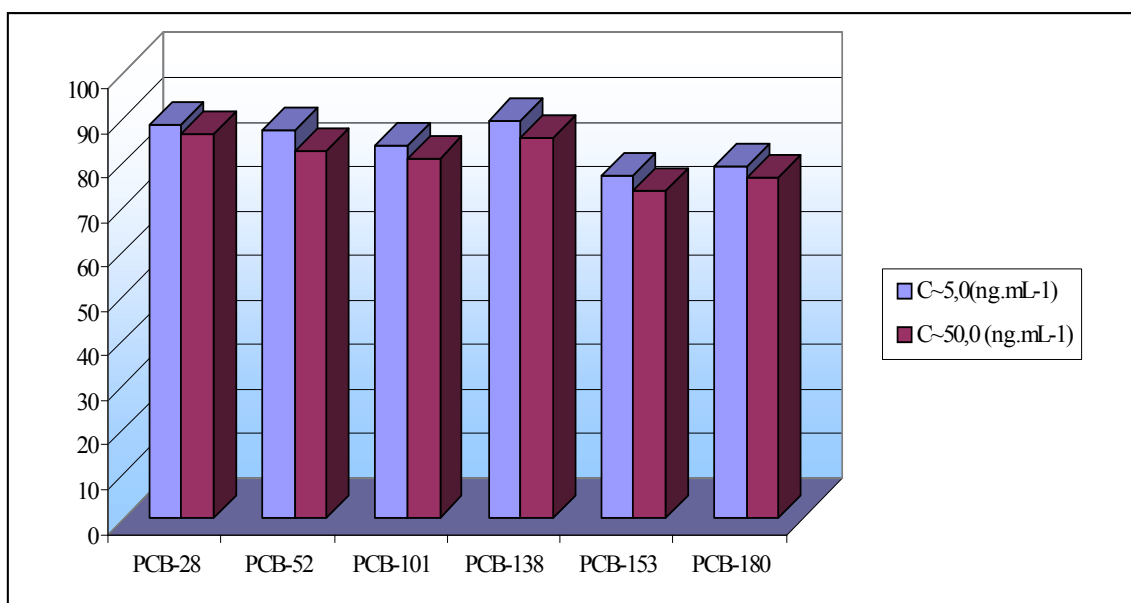
- On récupère la phase dichlorométhane, qui se trouve au bas de l'ampoule et contient les dioxines et les PCBs ; on la lave par de l'eau milli-Q (3 x 50 mL).
- Puis on évapore le dichlorométhane au moyen d'un évaporateur rotatif jusqu'à environ 50 mL ; on ajoute alors 10,0 mL d'acide sulfurique pour éliminer de cette phase les composés saponifiables et 5,0 g de sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pour la déshydrater.
- On évapore de nouveau l'extrait à l'évaporateur rotatif jusqu'à obtenir environ 5 mL.
- L'extrait ainsi concentré est ensuite soumis à une séparation sur des cartouches de silice greffée C18 (ENVI-18, 2,0 g, 12 mL). On rince le ballon qui a contenu l'échantillon par 2 x 2 mL de dichlorométhane et l'on passe cette solution sur la cartouche.

Nous avons choisi ensuite un mélange de dichlorométhane/hexane (1:1) et du toluène pour l'élution des PCBs, dioxines et co-PCBs (dioxin-like). On opère comme suit: la 1<sup>ère</sup> fraction d'élution correspond à 2 x 10 mL d'un mélange dichlorométhane /hexane (1:1), ainsi que les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> fractions ; les 4<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> fractions d'élution correspondent toutes les trois à 2 x 10 mL de toluène. Les extraits ainsi obtenus sont évaporés jusqu'à 2 mL, puis rassemblés dans un même flacon avant d'être évaporés à sec. On reprend le résidu avec 2 mL d'isooctane, puis on évapore sous azote jusqu'à 500µL avant l'analyse.

Les taux de récupération obtenus sont donnés dans les **tableaux 34 et 35** et sur les **figures 11 et 12**.

**Tableau 34 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE pour les PCBs**

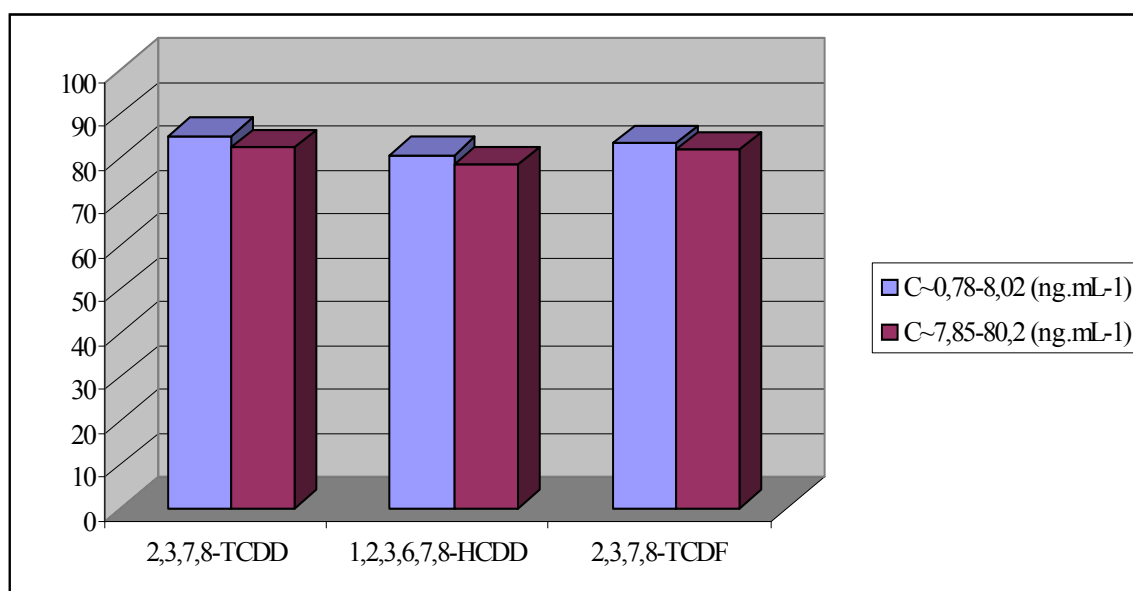
Concentr. (ng.mL <sup>-1</sup> )	PCB-28		PCB-52		PCB-101		PCB-138		PCB-153		PCB-180	
	M %	RSD %	M %	RSD %	M %	RSD %	M %	RSD %	M %	RSD %	M %	RSD %
<b>Fraction 1</b>												
5,0	<b>68,3</b>	5,2	<b>67,8</b>	5,6	<b>64,7</b>	4,3	<b>68,1</b>	4,6	<b>58,4</b>	4,2	<b>61,3</b>	3,9
50,0	<b>66,2</b>	5,7	<b>65,1</b>	3,7	<b>63,2</b>	3,9	<b>66,3</b>	5,2	<b>56,8</b>	2,8	<b>59,9</b>	4,3
<b>Fraction 2</b>												
5,0	<b>17,9</b>	11,6	<b>16,6</b>	13,8	<b>16,1</b>	10,2	<b>17,4</b>	8,6	<b>14,2</b>	8,7	<b>13,9</b>	7,8
50,0	<b>15,6</b>	12,8	<b>15,4</b>	12,3	<b>15,3</b>	9,6	<b>16,1</b>	10,8	<b>12,6</b>	14,3	<b>13,5</b>	9,2
<b>Fraction 3</b>												
5,0	<b>2,7</b>	20,3	<b>2,6</b>	10,1	<b>2,8</b>	15,6	<b>3,6</b>	7,2	<b>4,1</b>	15,2	<b>3,8</b>	3,8
50,0	<b>2,3</b>	22,6	<b>1,9</b>	8,6	<b>2,1</b>	8,7	<b>2,8</b>	10,6	<b>3,9</b>	11,7	<b>2,9</b>	10,2
<b>Fraction 4</b>												
5,0	Nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
50,0	Nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
<b>Fraction 5</b>												
5,0	Nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
50,0	Nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
<b>Fraction 6</b>												
5,0	Nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
50,0	Nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
<b>Total (Fractions 1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6)</b>												
5,0	<b>86,2</b>	3,2	<b>87,0</b>	4,6	<b>83,6</b>	7,2	<b>89,1</b>	3,6	<b>76,7</b>	6,6	<b>79,0</b>	4,8
50,0	<b>84,1</b>	4,3	<b>82,4</b>	5,2	<b>80,6</b>	6,8	<b>85,2</b>	3,2	<b>73,3</b>	5,7	<b>76,3</b>	4,2



**Figure 11 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE pour les PCBs**

**Tableau 35 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE pour les dioxines**

Concentration (ng.mL <sup>-1</sup> )	2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD		1,2,3,6,7,8-HCDD		2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDF	
	M %	RSD %	M %	RSD %	M %	RSD %
<b>Fraction 1</b>						
0,78 – 8,02	nd	-	nd	-	nd	nd
7,85 – 80,2	nd	-	nd	-	nd	nd
<b>Fraction 2</b>						
0,78 – 8,02	nd	-	nd	-	nd	nd
7,85 – 80,2	nd	-	nd	-	nd	nd
<b>Fraction 3</b>						
0,78 – 8,02	nd	-	nd	-	nd	nd
7,85 – 80,2	nd	-	nd	-	nd	nd
<b>Fraction 4</b>						
0,78 – 8,02	<b>65,6</b>	4,8	<b>62,3</b>	5,1	<b>65,3</b>	3,9
7,85 – 80,2	<b>63,3</b>	5,3	<b>59,1</b>	6,7	<b>62,1</b>	6,3
<b>Fraction 5</b>						
0,78 – 8,02	<b>19,2</b>	10,2	<b>18,2</b>	9,3	<b>18,9</b>	9,2
7,85 – 80,2	<b>16,8</b>	8,6	<b>17,1</b>	11,7	<b>16,3</b>	7,8
<b>Fraction 6</b>						
0,78 – 8,02	nd	-	nd	-	nd	-
7,85 – 80,2	<b>2,1</b>	12,7	<b>1,9</b>	10,8	<b>2,4</b>	13,6
<b>Total (Fractions 1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6)</b>						
0,78 – 8,02	<b>84,8</b>	3,6	<b>80,5</b>	2,9	<b>83,2</b>	4,3
7,85 – 80,2	<b>82,2</b>	4,2	<b>78,1</b>	4,8	<b>81,8</b>	2,7



**Figure 12 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE pour les dioxines**

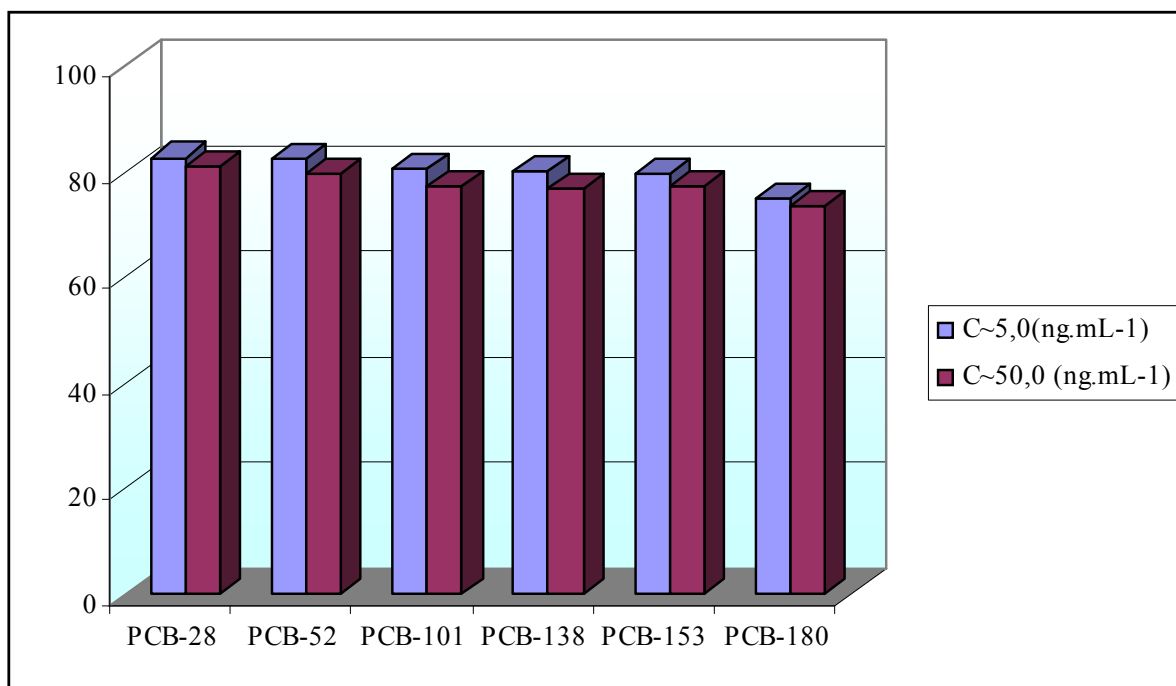
### 3.3.2.2.3. Purification par SPE sur silice (LC-Si, 1 g, 6 mL).

Les cartouches de silice sont conditionnées avec 5 mL de méthanol puis 5 mL d'un mélange dichlorométhane/hexane (1:1). Après extraction liquide-liquide, purification par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, déshydratation par Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, évaporation et concentration à 5 mL, on effectue une purification de l'extrait ainsi concentré sur cartouche de silice. On fait l'élution des PCBs par 2 x 10 mL de dichlorométhane/hexane (1:1) (fraction 1), puis 2 x 10 mL de dichlorométhane/hexane (1 :1) (fraction 2), et enfin 2 x 10 mL de dichlorométhane/hexane (1:1) (fraction 3). On évapore à sec les fractions recueillies sous azote. On reprend le résidu par 2 mL d'iso-octane, puis on évapore sous azote jusqu'à 500µL avant l'analyse. Les taux de récupération obtenus sont donnés dans le **tableau 36** et la **figure 13**.

Pour les dioxines, les cartouches de silice sont conditionnées avec 5 mL de méthanol puis 5 mL de toluène. L'extrait concentré est ensuite soumis à une purification sur la cartouche de silice. On fait l'élution des dioxines en 3 fractions successives de 2 x 10 mL de toluène. On évapore à sec sous azote les fractions recueillies. On reprend le résidu avec 2 mL d'iso-octane, puis on évapore jusqu'à 500 µL en vue de l'analyse. Les taux de récupération obtenus sont donnés dans le **tableau 37** et sur la **figure 14**.

**Tableau 36 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Si) pour les PCBs**

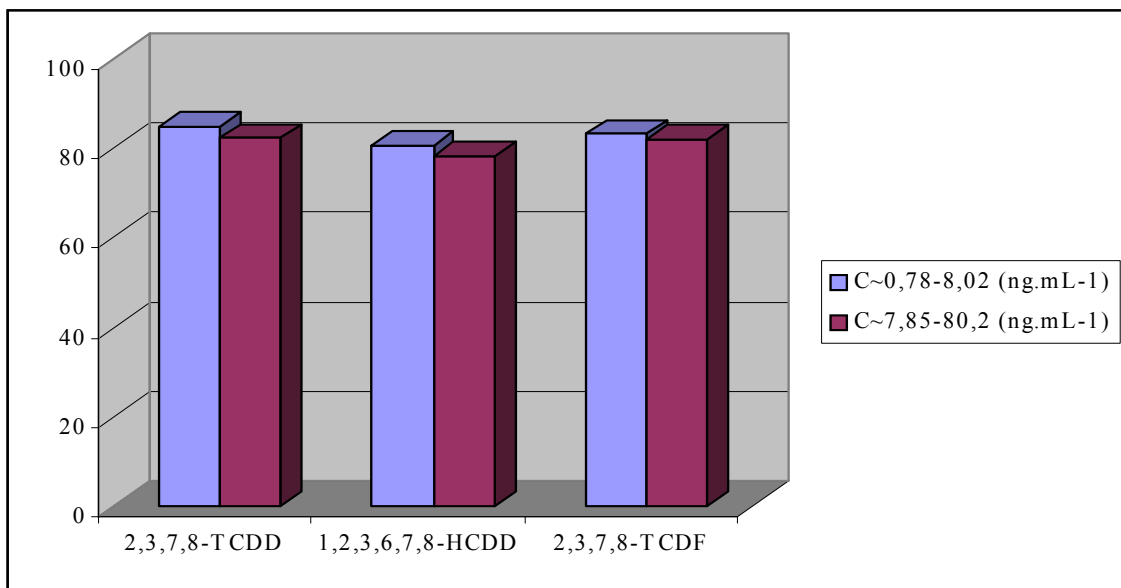
Concentration (ng.mL <sup>-1</sup> )	PCB-28		PCB-52		PCB-101		PCB-138		PCB-153		PCB-180	
	M %	RSD %	M %	RSD %	M %	RSD %	M %	RSD %	M %	RSD %	M %	RSD %
<b>Fraction 1</b>												
5,0	<b>68,1</b>	5,3	<b>67,3</b>	4,8	<b>65,8</b>	5,7	<b>66,3</b>	4,2	<b>64,8</b>	4,9	<b>62,7</b>	5,9
50,0	<b>66,3</b>	4,9	<b>63,9</b>	6,1	<b>63,1</b>	3,9	<b>63,9</b>	5,1	<b>62,1</b>	3,6	<b>60,2</b>	6,3
<b>Fraction 2</b>												
5,0	<b>14,6</b>	10,2	<b>15,1</b>	11,6	<b>14,9</b>	16,0	<b>13,9</b>	10,6	<b>14,9</b>	15,2	<b>12,4</b>	12,7
50,0	<b>13,1</b>	13,0	<b>13,8</b>	10,9	<b>11,7</b>	13,2	<b>11,2</b>	9,3	<b>12,8</b>	11,6	<b>10,6</b>	13,2
<b>Fraction 3</b>												
5,0	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
50,0	<b>1,7</b>	20,6	<b>2,1</b>	18,9	<b>2,4</b>	12,8	<b>1,8</b>	9,8	<b>2,3</b>	19,1	<b>2,6</b>	21,6
<b>Total (Fractions 1 + 2 + 3)</b>												
5,0	<b>82,7</b>	5,6	<b>82,4</b>	4,2	<b>80,7</b>	6,3	<b>80,2</b>	5,3	<b>79,7</b>	6,8	<b>75,1</b>	5,9
50,0	<b>81,1</b>	4,3	<b>79,8</b>	5,9	<b>77,2</b>	5,6	<b>76,9</b>	3,9	<b>77,2</b>	5,1	<b>73,4</b>	6,3



**Figure 13 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Si) pour les PCBs**

**Tableau 37 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Si) pour les dioxines**

Concentration (ng.mL <sup>-1</sup> )	2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD		1,2,3,6,7,8-HCDD		2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDF	
	M	RSD	M	RSD	M	RSD
	%	%	%	%	%	%
<b>Fraction 1</b>						
0,78 – 8,02	<b>64,2</b>	5,6	<b>62,2</b>	4,9	<b>65,2</b>	3,9
7,85 – 80,2	<b>61,0</b>	6,3	<b>60,1</b>	3,6	<b>61,9</b>	4,3
<b>Fraction 2</b>						
0,78 – 8,02	<b>14,9</b>	8,9	<b>15,3</b>	7,2	<b>15,3</b>	9,7
7,85 – 80,2	<b>11,2</b>	10,2	<b>12,4</b>	9,8	<b>13,1</b>	11,2
<b>Fraction 3</b>						
0,78 – 8,02	nd	-	nd	-	nd	-
7,85 – 80,2	<b>2,3</b>	19,8	<b>1,9</b>	20,6	<b>2,1</b>	16,3
<b>Total (Fractions 1 + 2 + 3)</b>						
0,78 – 8,02	<b>79,1</b>	5,1	<b>77,5</b>	6,3	<b>80,5</b>	4,9
7,85 – 80,2	<b>74,5</b>	4,6	<b>74,4</b>	4,8	<b>77,1</b>	6,2



**Figure 14 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Si) pour les dioxines**

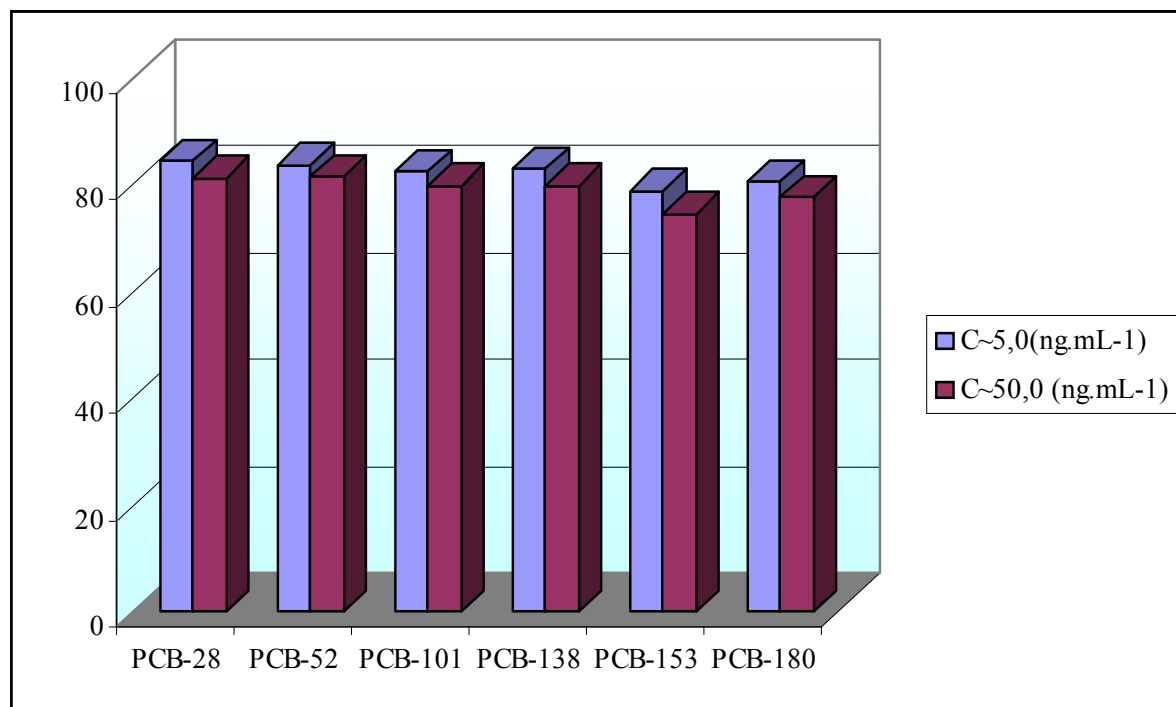
#### 3.3.2.2.4. Purification sur cartouches d'alumine (LC-Alumina-N SPE Tube, 2 g, 6 mL)

L'alumine neutre reste très efficace pour purifier des composés à fonctions polaires non ionisables. Les cartouches d'alumine sont lavées avec 5 mL d'un mélange dichlorométhane/hexane (1:1). L'extrait concentré à 5 mL est purifié sur une cartouche d'alumine. On fait l'élution des PCBs avec 2 x 10 mL de dichlorométhane/hexane (1:1) (fraction 1), les fractions 2 et 3 étant ensuite successivement obtenues de façon identique à la première. On évapore à sec sous azote les fractions recueillies. On reprend le résidu avec 2 mL iso-octane, puis on évapore sous azote jusqu'à 500 µL avant l'analyse. Les taux de récupération obtenus sont donnés dans le **tableau 38** et la **figure 15**.

Par ailleurs, on a utilisé le toluène pour laver les cartouches d'alumine et éluer ensuite les dioxines. L'extrait concentré est alors soumis à une purification sur la cartouche d'alumine. On réalise l'élution des dioxines en 3 fractions successives (fractions 1,2 et 3) de 2 x 10 mL de toluène. On évapore à sec les fractions recueillies sous azote. On reprend le résidu par 2 mL d'isooctane, puis on évapore jusqu'à 500 µL en vue de réaliser l'analyse. Les taux de récupération obtenus sont donnés dans le **tableau 39** et sur la **figure 16**

**Tableau 38 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Alumina) pour les PCBs**

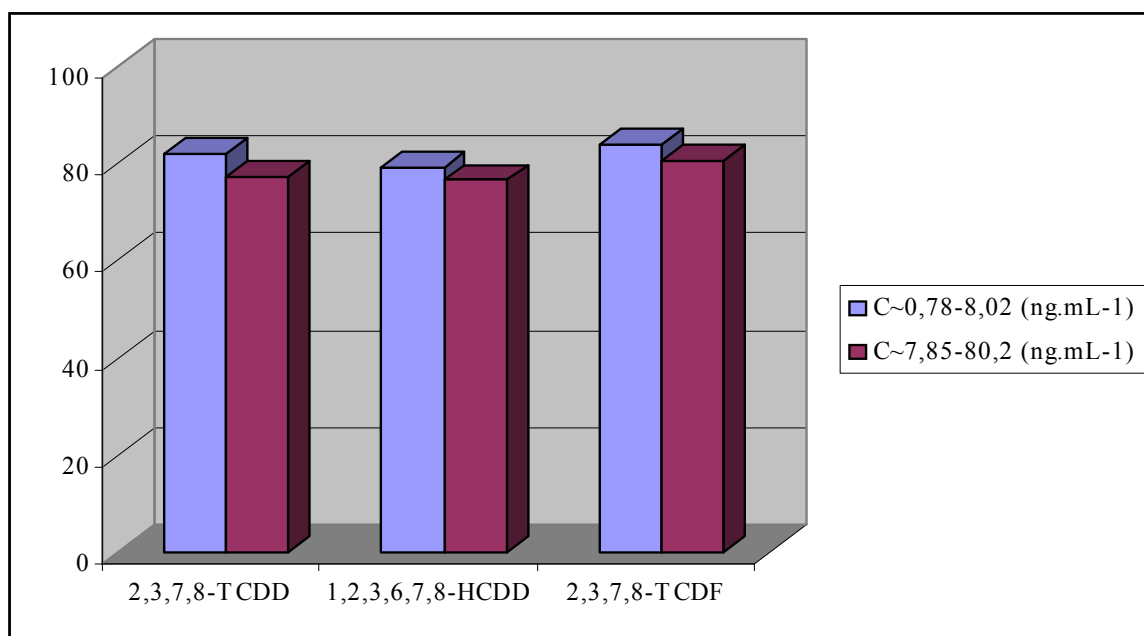
Concentration (ng.mL <sup>-1</sup> )	PCB-28		PCB-52		PCB-101		PCB-138		PCB-153		PCB-180	
	M	RSD	M	RSD	M	RSD	M	RSD	M	RSD	M	RSD
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
<b>Fraction 1</b>												
5,0	<b>68,9</b>	5,8	<b>69,3</b>	6,3	<b>66,2</b>	5,3	<b>67,6</b>	6,1	<b>61,1</b>	5,1	<b>62,3</b>	5,4
50,0	<b>65,7</b>	4,6	<b>67,1</b>	5,2	<b>63,7</b>	4,8	<b>63,9</b>	3,9	<b>57,8</b>	3,6	<b>59,8</b>	6,3
<b>Fraction 2</b>												
5,0	<b>15,2</b>	12,3	<b>14,2</b>	11,4	<b>16,1</b>	9,8	<b>15,3</b>	6,7	<b>17,6</b>	8,4	<b>18,1</b>	13,7
50,0	<b>13,8</b>	9,7	<b>12,2</b>	13,6	<b>13,4</b>	11,7	<b>13,9</b>	10,3	<b>14,3</b>	9,6	<b>15,9</b>	10,2
<b>Fraction 3</b>												
5,0	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
50,0	<b>2,4</b>	19,8	<b>2,1</b>	20,3	<b>2,6</b>	13,6	<b>1,8</b>	15,6	<b>2,3</b>	23,6	<b>1,7</b>	21,3
<b>Total (Fractions 1 + 2 + 3)</b>												
5,0	<b>84,1</b>	4,6	<b>83,5</b>	5,3	<b>82,3</b>	4,6	<b>82,9</b>	5,1	<b>78,7</b>	4,1	<b>80,4</b>	4,8
50,0	<b>81,1</b>	3,9	<b>81,4</b>	4,8	<b>79,7</b>	3,8	<b>79,6</b>	3,6	<b>74,4</b>	5,3	<b>77,4</b>	5,9



**Figure 15 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Alumina) pour les PCBs**

**Tableau 39 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Alumina-N) pour les dioxines**

Concentration (ng.mL <sup>-1</sup> )	2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD		1,2,3,6,7,8-HCDD		2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDF	
	M	RSD	M	RSD	M	RSD
	%	%	%	%	%	%
<b>Fraction 1</b>						
0,78 – 8,02	<b>66,2</b>	5,1	<b>61,8</b>	6,3	<b>69,7</b>	3,9
7,85 – 80,2	<b>62,9</b>	4,8	<b>59,6</b>	4,7	<b>65,4</b>	5,6
<b>Fraction 2</b>						
0,78 – 8,02	<b>15,6</b>	10,9	<b>17,2</b>	11,6	<b>14,1</b>	8,7
7,85 – 80,2	<b>12,1</b>	9,8	<b>14,3</b>	7,9	<b>12,9</b>	10,2
<b>Fraction 3</b>						
0,78 – 8,02	nd	-	nd	-	nd	-
7,85 – 80,2	<b>2,3</b>	18,7	<b>2,6</b>	20,3	<b>2,1</b>	16,3
<b>Total (Fractions 1 + 2 + 3)</b>						
0,78 – 8,02	<b>81,8</b>	4,8	<b>79,0</b>	5,7	<b>83,8</b>	3,6
7,85 – 80,2	<b>77,3</b>	4,2	<b>76,5</b>	3,9	<b>80,4</b>	4,9



**Figure 16 : Taux de récupération moyens obtenus par SPE (LC-Alumina-N) pour les dioxines**



### 3.3.2.3. Taux de récupération des PCBs et dioxines après traitement des échantillons

Après avoir déterminé, comme vu précédemment, les taux de récupération correspondant à chacune des étapes du traitement, on a voulu déterminer globalement les taux de récupération qui résultent du processus complet de traitement des échantillons avant le dosage par GC-MS. A cette fin, nous avons préparé des solutions à 5,0 et 50 ng.mL<sup>-1</sup> pour les PCBs ; de 0,78 à 8,02 et de 7,85 80,2 ng.mL<sup>-1</sup> pour les dioxines, qu'on a introduit dans 500mL de l'échantillon de départ pour mesurer les différents taux de recouvrement.

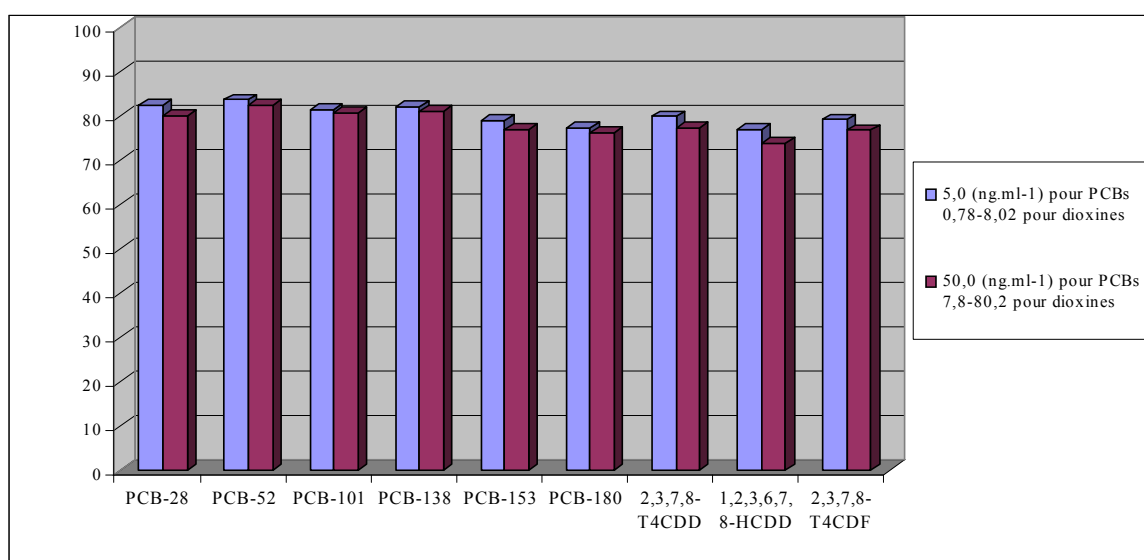
On opère ensuite de façon identique à ce qui a été décrit au § 3.3.2.2.2 et ce jusqu'au passage de l'extrait concentré sur les cartouches de silice greffée C18 (ENVI-18, 2,0 g, 12 mL). Puis, comme précédemment, on rince le ballon qui a contenu l'échantillon par 2 x 2 mL de dichlorométhane et l'on passe cette solution sur la cartouche.

- On utilise alors un mélange de dichlorométhane/hexane (1:1) (5 x 10 mL) pour l'élution des PCBs (fraction 1), puis du toluène (5 x 10 mL) pour l'élution des dioxines (fraction 2). Les extraits ainsi obtenus sont évaporés jusqu'à 5 mL
- On fait passer ensuite, d'une part, la fraction 1, d'autre part, la fraction 2 sur la cartouche de silice ; on rince le ballon de la fraction 1 par 2 x 2 mL dichlorométhane/hexane (1:1), le ballon de la fraction 2 par 2 x 5 mL toluène. On utilise un mélange de dichlorométhane/hexane (1:1) (5 x 10 mL) pour l'élution des PCBs (fraction 11) ; on utilise 5 x 10 mL de toluène pour l'élution des dioxines. Les extraits obtenus sont évaporés jusqu'à 5 mL
- On fait passer la fraction 11 dans le dichlorométhane/hexane (1:1) et la fraction 22 dans le toluène sur la cartouche d'alumine ; on rince le ballon de la fraction 11 par 2 x 2 mL de dichlorométhane/hexane (1:1), le béccher de la fraction 22 par 2 x 2 mL de toluène. On utilise le mélange dichlorométhane/hexane (1:1) (5 x 10 mL) pour l'élution des PCBs ; du toluène (5 x 10 mL) pour l'élution des dioxines.
- On évapore les extraits recueillis (solution de passage et d'élution) au moyen d'un évaporateur rotatif jusqu'à environ 5 mL, puis sous azote jusqu'à sec. On reprend le résidu par 2 mL d'isooctane et on évapore sous azote jusqu'à 500 µL en vue de son analyse.

Les taux de récupération ainsi obtenus sont donnés dans le **tableau 40** et sur la **figure 17**

**Tableau 40 : Taux de récupération après traitement des échantillons**

Congénères	5,0 (ng.mL <sup>-1</sup> ) pour les PCBs 0,78-8,02 pour les dioxines		50,0 (ng.mL <sup>-1</sup> ) pour les PCBs 7,8-80,2 pour les dioxines	
	M (%)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)
PCB-28	82,3	6,2	80,1	5,7
PCB-52	83,6	5,8	82,3	6,1
PCB-101	81,2	4,7	80,6	4,9
PCB-138	82,1	6,3	80,9	5,8
PCB-153	78,9	4,9	76,8	6,3
PCB-180	77,3	5,2	76,1	3,7
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD	79,8	5,4	77,2	4,8
1,2,3,6,7,8-HCDD	76,9	3,9	73,8	5,1
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDF	79,1	4,6	76,7	4,3



**Figure 17 : Taux de récupération après traitement des échantillons**

Nos résultats sont en accord complet avec ceux que l'on peut trouver dans la littérature. En pratique, c'est au niveau de l'extraction liquide-liquide que le rendement est le moins bon. Pour l'étape d'extraction en phase solide, le taux de récupération est par contre généralement élevé [de 85 % à 115 % par SPE sur C<sub>18</sub> (Picó Y. et al. 1995) ; environ 101% ± 4,9% par SPE de diatomite (Minh N.H. et al. 2004) ; de 97 % à 129% par SPE sur C<sub>18</sub> (Dmitrovic J et al. 2002)]. Par ailleurs, on peut constater une nette diminution du taux de récupération quand on augmente la concentration des dioxines et PCBs.

Au regard des résultats ainsi obtenus, c'est donc la procédure qu'on vient de décrire et de valider qui sera choisie pour traiter les échantillons de lait.

### 3.3.3. Choix des conditions d'analyse pour le dosage des dioxines et des PCBs par GC-MS/MS

#### 3.3.3.1. Présentation de notre système GC-MS/MS

Le système de chromatographie en phase gazeuse utilisé est un Trace GC 2000 équipé d'un injecteur vaporisateur à température programmable (PTV), couplé à un spectromètre de masse Polaris-Q à trappe d'ions (Thermo Finnigan Corp., Austin, USA), le tout étant piloté par le logiciel XCalibur (Version 1.2). Le système GC-MS/MS est présenté sur la **figure 18**



**Figure 18 : Système Trace GC 2000 - Polaris-Q**

Cette technique est de loin la plus utilisée dans les laboratoires d'analyse du fait de sa résolution, de sa fiabilité, de sa robustesse et de sa rapidité; elle permet de séparer des composés moléculaires organiques thermostables (non thermolabiles) et naturellement volatils – ou vaporisés à des températures ne provoquant pas leur décomposition – en jouant sur l'équilibre entre la phase gazeuse mobile et la phase stationnaire de la colonne, fonction des différentes températures d'ébullition et de la polarité de chaque composé. Pour notre étude, nous avons utilisé ce couplage GC-MS/MS, ce qui permet de réduire le bruit chimique de la matrice et d'augmenter ainsi le degré de confiance du résultat. De plus la sélectivité du couplage GC-MS/MS est meilleure pour la détection que les techniques GC-MS à basse et à haute résolution.

### **3.3.3.1.1. Système d'injection**

Cette étape est déterminante pour la qualité des résultats obtenus lors de l'analyse chromatographique. Le mode d'injection utilisé est le PTV (*Programmed Temperature Vaporizer*) qui est un injecteur à température programmable. C'est une technique analogue à celle de l'injecteur split/splitless. Il conjugue les avantages de l'injection en mode split, ou splitless, à ceux de l'injection à froid dans la colonne. Dans notre cas, nous avons utilisé le mode PTV splitless (utilisé pour l'analyse de traces). Pendant l'injection sans division, à froid, la vanne de fuite est fermée. La chambre d'injection est ensuite chauffée afin de transférer l'échantillon dans la colonne maintenue froide.

### **3.3.3.1.2 Détection par spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS)**

Ce couplage est un outil d'identification très efficace car il allie sélectivité et sensibilité. Le MS/MS, est constitué d'une source d'ionisation, de deux analyseurs de masse, séparés par une cellule de fragmentation ou cellule de collision et d'un détecteur d'ions. On utilise le mode MS/MS pour analyser les ions fils. La molécule analysée est donc ionisée et l'ion parent formé est sélectionné par le premier analyseur de masse. Ensuite, cet ion sélectionné - ion parent - est fragmenté par collision avec les molécules du gaz, ou dissociation induite par collision, pour donner des ions fils qui sont à leur tour séparés dans le second analyseur de masse. Le spectre ainsi obtenu correspond au spectre de l'ion parent. On a deux types de configurations des spectromètres MS/MS : celle pour laquelle les analyseurs sont couplés dans l'espace (cas des analyseurs quadripolaires, magnétiques ou hybrides) et celle pour laquelle les analyseurs sont couplés dans le temps (cas des trappes d'ions ou spectromètres de masse à résonance cyclotronique). Nous nous bornerons à décrire le fonctionnement des trappes à ions puisque l'appareil que nous avons utilisé est doté de cette technique.

### **3.3.3.1.3 Description des trappes ioniques**

C'est une technique qui permet de produire des ions dans la trappe par impact électronique (IE). La trappe est constituée de trois électrodes dont une annulaire encadrée par deux autres de forme hyperbolique, percées en leur milieu pour permettre le passage des ions ou électrons. Un flux d'électrons, provenant d'un filament chauffé, va produire des ions par ionisation des molécules qui sortent de la colonne d'analyse et qui se retrouvent entre les deux électrodes.

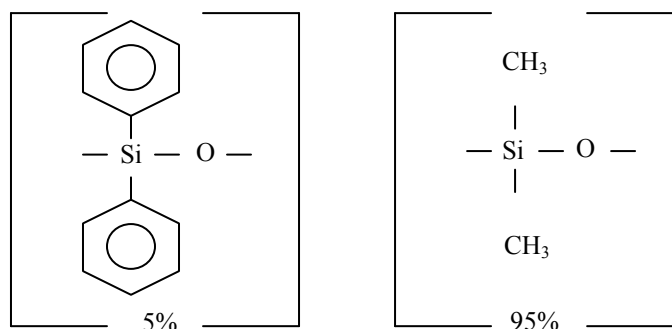
Ces ions produits sont piégés dans la trappe grâce une onde de radiofréquence. Ils sont ensuite expulsés de la trappe en fonction de leur rapport  $m/z$  (masse/charge).

### 3.3.3.2 Conditions expérimentales choisies pour le système GC-MS/MS

#### 3.3.3.2.1. Choix de la colonne chromatographique

Les colonnes généralement utilisées pour la séparation des composés par GC-MS sont des colonnes capillaires en silice fondue avec, comme phase stationnaire, du 5% phényle, 95% diméthylpolysiloxane (colonnes de type DB-5, HP-5, CP-SIL-8 CB, HT-5 etc.) [Abad E. et al. (2002), Goltzález M.J. et al. (1996), Forcant J.-F. et al. (2005), Costera A. et al. (2006), Sasamoto T. Et al. (2006), etc.]. Il est donc nécessaire que la colonne utilisée puisse permettre une bonne séparation des isomères des dioxines et PCBs, et que ses signaux ne se perde pas dans le bruit de fond susceptible d'être généré par le saignement (« *bleeding* ») de la colonne aux hautes températures.

La colonne de séparation que nous avons utilisée est une colonne Rtx-5MS-silice fondue (Restek) ayant une phase stationnaire contenant 5% de diphényle et 95% diméthylpolysiloxane. Ses caractéristiques sont les suivantes : une longueur de 30m, un diamètre interne de 0.25mm et une épaisseur de phase stationnaire de 0.25 $\mu$ m. Ce type de colonne est généralement utilisé pour des études sur : les stupéfiants, les impuretés dans les solvants, les pesticides, les hydrocarbures, les congénères de PCBs ou mélanges Aroclor, les huiles essentielles et les composés semi-volatils. Ses températures limites d'utilisation vont de -60°C à 350°C. La phase stationnaire que nous avons choisie qui est d'ailleurs la plus courante, pour des applications les plus variées est représentée sur la **figure 19**



**Figure 19 : Structure de la phase des colonnes Rtx-5MS, Rtx-5, MXT-5 et XTI-5**

#### 3.3.3.2.2. Choix du programme de température du four

Dans le but d'optimiser la séparation des PCBs, différentes programmations de température ont été essayées, en se basant sur les résultats de la littérature. Certaines modifications ont été apportées pour tenir compte du type d'appareil utilisé. Nous avons donc fait une synthèse des différents programmes établis par Heck M.C. et al. (2007),

Szyrwińska K. et al. (2007), Focant J.-F. (2005), Erdoğan Ö. et al. (2004), Yu Z. et al. (2007), Ramos L. et al. (2000), Chikuni O. et al. (1997), etc. Le programme de température retenu en définitive est le suivant : une température initiale de 70°C est maintenue pendant 2 min ; on passe ensuite à 150°C à 25°C.min<sup>-1</sup>, puis on monte à 220°C à 10°C.min<sup>-1</sup> ; la température de 220°C est maintenue pendant 2 min, avant de passer à 280°C avec une rampe de montée en température de 3°C.min<sup>-1</sup> ; après un palier de 3 min à 280°C, on passe à 300°C avec une rampe de montée de 10°C.min<sup>-1</sup> ; la température finale de 300°C est maintenue pendant 5 min.

Pour les dioxines, nous sommes partis des différents programmes conseillés par Sasamoto T. et al.(2006), Focant J.-F. et al.(2005), Hashimoto S. et al.(1995), Covaci A. et al. (2001), Pirard C. et al. (2002), etc. Le programme de température choisi est en définitive le suivant : une température initiale de 100°C est maintenue pendant 2 min ; on passe ensuite à 180°C à 25°C.min<sup>-1</sup>, puis on monte à 250°C à 10°C.min<sup>-1</sup> ; la température de 250°C est maintenue pendant 2 min, avant de passer à 310°C avec une rampe de montée en température de 3°C.min<sup>-1</sup> ; après un palier de 3 min à 310°C, on passe à 320°C avec une rampe de montée de 10°C.min<sup>-1</sup> ; la température finale de 320°C est maintenue pendant 5 min.

Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium scientifique 6.0, avec un débit constant de 1 mL.min<sup>-1</sup> et une pression en tête de colonne de 120 kPa.

#### **3.3.3.2.3. Conditions d'injection**

On injecte un volume de solution de 1 µL, soit manuellement soit avec un passeur automatique. Les échantillons et les standards sont injectés dans les conditions suivantes : injection en mode PTV *Splitless* (sans diviseur) avec une température d'entrée de 60°C (durée d'injection 0.2 min), puis on passe à 300°C avec une rampe de montée en température de 10°C.sec<sup>-1</sup> ; cette température de 300°C est maintenue pendant 1 min, avant l'ouverture de la vanne de *Split* (le débit du *Split* est de 10mL.min<sup>-1</sup>). Le diamètre interne du *Focusliner* (Restek) utilisé comme chambre d'injection en mode PTV est de 5 mm. Après chaque injection, on a une phase de balayage (nettoyage) programmée comme suit : passage de la température à 320°C avec une rampe de montée de 10°C.sec<sup>-1</sup>, cette température de 320°C étant ensuite maintenue pendant 3 min avec un débit de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Le débit de purge au niveau du septum est constant.

#### **3.3.3.2.4. Conditions de détection par spectrométrie de masse**

La température de la ligne de transfert entre GC et MS a été fixée à 300°C et la température de la source d'ionisation à 250°C. Les conditions choisies pour la calibration

de l'appareil sont les suivantes : 250 mA pour le filament d'émission à 70eV, avec un contrôle de gain automatique de 50 (unité arbitraire, gamme 1-500). Pour la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS ou MS2), l'ion parent est sélectionné à  $m/z \pm 0.5$ , la tension de collision (dissociation induite par collision ou CID) va de 1.5 et 2.0 V, et l'énergie d'excitation maximale (q) se situe entre 0.30 et 0.45. Les ions parents sélectionnés sont indiqués dans le **Tableau 41**, selon le temps de rétention. Parmi les conditions citées, la valeur de q et la tension de collision sont les paramètres critiques de l'opération MS/MS en trappe d'ions. En effet, la tension de collision agit sur l'intensité des pics, tandis que l'énergie d'excitation maximale influe sur la fragmentation des ions.

**Tableau 41 : Choix des conditions de mise en oeuvre de la GC-MS/MS.**

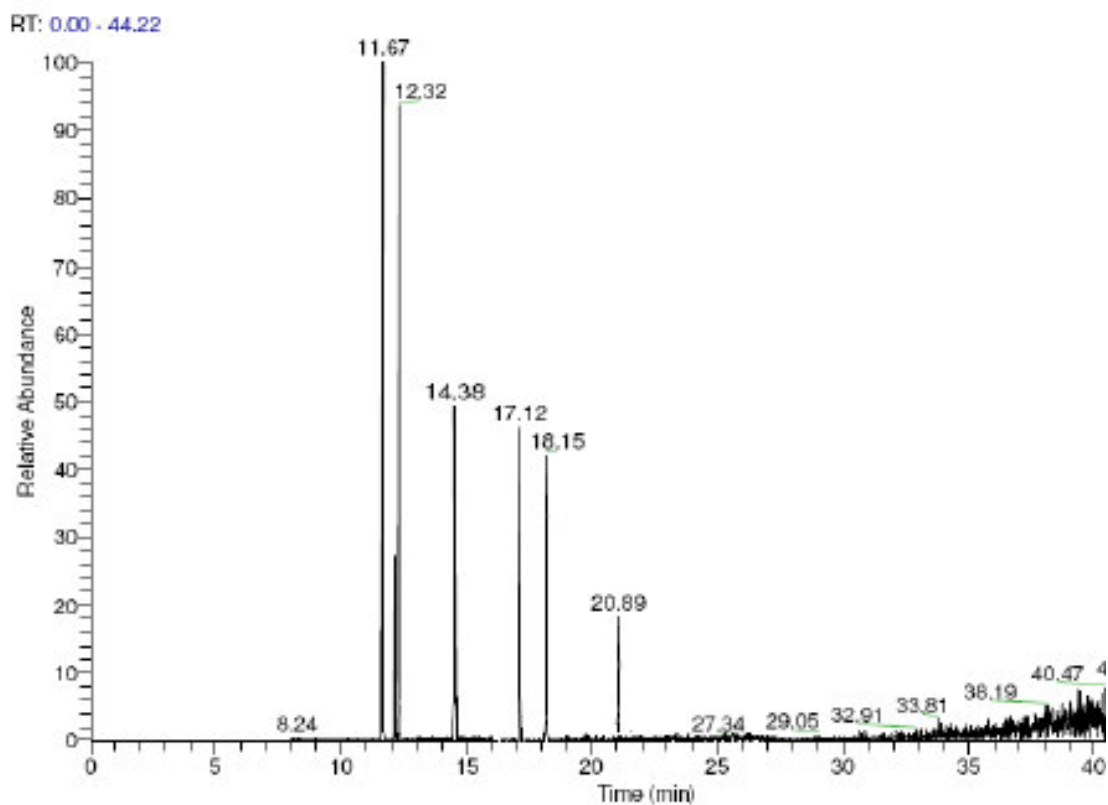
Fenêtre de temps (min)	Ion parent sélectionné ( $m/z$ ) (ion de quantification)	Congénères	Tension de collision (V)	q	Temps d'isolement (ms)	Temps d'excitation (ms)
0,0-6,0	-	-	-	-	-	-
11,0-12,0	256 + 258	PCB-28	1,5	0,45	8	15
12,0-13,0	292	PCB52	1,5	0,45	8	15
14,0-15,0	326	PCB-101	1,5	0,45	8	15
16,5-18,0	360 + 362	PCB-153	1,5	0,45	8	15
17,5-19,0	360 + 362	PCB-138	1,5	0,45	8	15
20,0-21,5	394 + 396	PCB-180	2,0	0,30	8	15
17,5-18,5	304 + 306	2,3,7,8-TCDF	1,5	0,45	8	15
18,0-19,0	320 + 322	2,3,7,8-TCDD	1,5	0,45	8	15
25,5-27,0	390 + 392	1,2,3,6,7,8-TCDD	2,0	0,30	8	15

### 3.3.3.2.5. Séparation des dioxines et PCBs

Les temps de rétention des 6 PCBs et dioxines dépendent de la colonne choisie, de la vitesse de la phase mobile et du programme de température du four. Dans le cas de la colonne utilisée pour notre analyse (la colonne Rtx-5MS), la durée totale de l'analyse des dioxines est de 43,2 min ; elle est de 44,2 min pour les PCBs. Les différents temps de rétention des dioxines et PCBs sont consignés dans le **Tableau 42**

**Tableau 42 : Temps de rétention des dioxines et PCBs en GC-MS/MS**

Congénères	Temps de rétention (min)	Intervalle de confiance (min)
PCB-28	11,67	±0,05
PCB-52	12,32	±0,05
PCB-101	14,38	±0,10
PCB-153	17,12	±0,10
PCB-138	18,15	±0,15
PCB-180	20,89	±0,15
2,3,7,8-TCDF	18,05	±0,10
2,3,7,8-TCDD	18,56	±0,10
1,2,3,6,7,8-TCDD	26,15	±0,15



**Figure 20 : Chromatogramme obtenu par GC-MS/MS  
à partir d'un étalon ( $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ )**



### **3.3.3.2.6. Identification des dioxines et PCBs par GC-MS/MS**

Pour réaliser l'identification par GC-MS/MS, nous avons comparé, en un premier temps, les valeurs des temps de rétention des pics supposés de dioxines et PCBs aux temps de rétention des composés de référence disponibles (solutions étalons utilisées pour la gamme d'étalonnage). Dans un second temps, les spectres de masse obtenus par MS/MS ont également été comparés à ceux des dioxines et PCBs enregistrés sur le chromatogramme de la solution étalon contenant les dioxines et PCBs. Cette comparaison de spectres est basée sur deux paramètres importants, à savoir le SI et le RSI. D'après le manuel d'utilisation du logiciel XCalibur, les spectres ne peuvent être identiques que lorsque les valeurs de SI et RSI sont comprises entre 700 et 1000.

L'identification des dioxines et PCBs est validée si les résultats de la GC-MS satisfont aux critères suivants :

- Le signal obtenu pour chacun des deux ions choisis, ou la somme des deux ions de chacun des composés, doit être au moins trois fois plus élevé que le bruit de fond (rapport signal/bruit > 3) ;
- Le rapport isotopique des ions choisis ne doit pas s'écarter de plus de 15 % du rapport obtenu pour le composé correspondant dans la solution étalon ou du rapport isotopique calculé théoriquement.
- Les temps de rétention des deux ions de quantification coïncident à 3 secondes près.
- Les temps de rétention des dioxines et PCBs naturels coïncident à 2 secondes près avec le temps de rétention du même isomère marqué (normalement, le temps de rétention de l'isomère marqué est inférieur de 1 à 2 secondes à celui de la molécule non marquée).

Un exemple d'identification est présenté sur la figure 21.

### **3.3.3.2.7. Détermination des limites de détection et de quantification**

Pour déterminer les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) nous avons préparé des blancs d'analyse, en appliquant la procédure complète d'analyse à un échantillon contenant l'ensemble des constituants, à l'exception de la substance recherchée, à la suite de quoi on détermine l'amplitude maximale du signal sur une distance égale à dix fois la largeur à mi-hauteur du pic correspondant à la substance recherchée. On détermine le bruit en multipliant cette hauteur par trois et on calcule la concentration théorique correspondant au composé recherché dans le blanc en utilisant les courbes d'étalonnage externe tracées à partir de solutions étalons à différentes concentrations; on peut en déduire la masse du composé correspondant dans le blanc en

multipliant la concentration calculée précédemment par le volume de l'extrait analysé. La masse ainsi obtenue divisée par la masse de l'échantillon de départ correspond à la limite de détection du composé recherché. Le seuil de détection de la méthode dépend directement en pratique de toutes les variables suivantes : nature et composition de la matrice analysée, quantité d'échantillon utilisée, volume de l'extrait final, volume d'injection, taux de recouvrement des étalons marqués, performance de la colonne de chromatographie, paramètres choisis pour le réglage du système GC-MS, bruit électronique et sensibilité de l'appareil.

Nous disposons d'une solution de chaque dioxine et de chaque PCB à 100 ng.mL<sup>-1</sup> pour déterminer la limite de détection qui lui correspond. Nous effectuons des dilutions successives de ces solutions, chaque fois par un facteur 10, afin de déterminer la limite de détection d'un signal. Pour que le composé soit détectable il faut que le rapport signal sur bruit soit supérieur à 3. Lorsque c'est le cas, le bruit doit être déterminé pour chaque congénère à partir des chromatogrammes réels de l'échantillon. Un exemple de calcul du signal sur bruit de fond est présenté sur la figure 21 et l'on effectue les calculs comme suit :

$$LD_{mes} = 3 \times \frac{N}{S} \times C_{ajout} \quad \text{et} \quad LQ_{mes} = 10 \times \frac{N}{S} \times C_{ajout}$$

où

$LD_{mes}$  : limite de détection de la méthode de mesure

$LQ_{mes}$  : limite de quantification de la méthode de mesure

$N$  : bruit de fond exprimé en hauteur de pic

$S$  : signal mesuré pour la solution la plus diluée

$C_{ajout}$  : concentration de la solution de mesure

$$LD_{ana} = 3 \times \frac{N}{S} \times C_{ajout} \times \frac{V_{fin}}{V_{éch}} \quad \text{et} \quad LQ_{ana} = 10 \times \frac{N}{S} \times C_{ajout} \times \frac{V_{fin}}{V_{éch}}$$

où

$LD_{ana}$  : limite de détection caractéristique de la méthode analytique

$LQ_{ana}$  : limite de quantification caractéristique de la méthode analytique

$N$  : bruit de fond exprimé en hauteur de pic

$S$  : signal de mesure de la solution minimale

$C_{ajout}$  : concentration de la solution de mesure

$V_{fin}$  : volume d'extrait final (500µL)

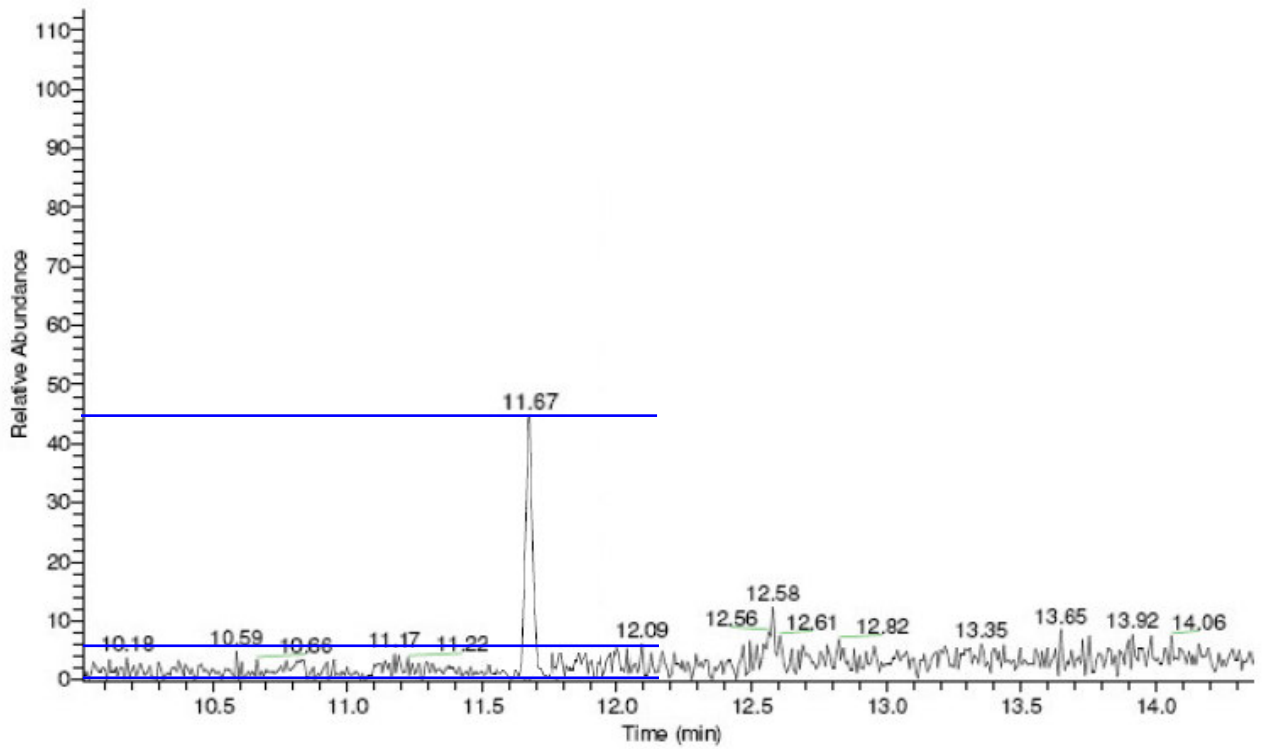
$V_{éch}$  : volume de l'échantillon analytique (prise d'essai = 100 mL)

Dans le **tableau 43**, les limites de détection et de quantification sont calculées avec les bruits de fond réels. Les bruits de fond obtenus pour les blancs analytiques (blanc de méthode) sont plus élevés que les bruits de fond obtenus pour les blancs de réactifs.

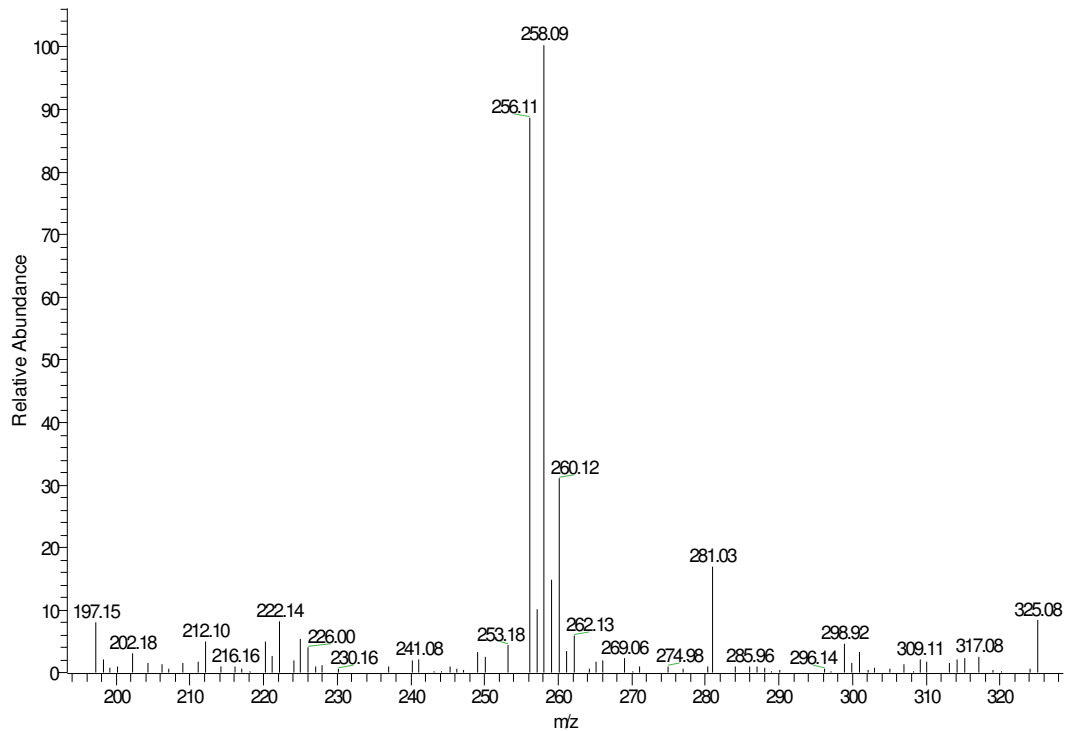
**Tableau 43 : LD<sub>mes</sub>, LD<sub>ana</sub>, LQ<sub>mes</sub> et LQ<sub>ana</sub> pour les dioxines et PCBs**

<b>Congénère</b>	<b>LD<sub>mes</sub> (ng.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQ<sub>mes</sub> (ng.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LD<sub>ana</sub> (pg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQ<sub>ana</sub> (pg.mL<sup>-1</sup>)</b>
PCB-28	0,20	0,60	1,5	4,6
PCB-52	0,25	0,80	2,7	8,2
PCB-101	0,45	1,30	3,8	10,1
PCB-153	0,50	1,55	4,7	14,5
PCB-138	0,55	1,60	5,2	15,6
PCB-180	0,80	2,35	6,9	21,3
2,3,7,8-TCDF	0,25	0,78	3,1	10,2
2,3,7,8-TCDD	0,40	1,16	3,7	10,9
1,2,3,6,7,8-TCDD	0,90	2,90	8,6	25,9

RT: 10.02 - 14.39



StarPCBs #829-832 RT: 11.98-12.00 AV: 4 SB: 11 11.91-11.93, 12.04-12.09 NL: 1.29E3  
T: +cFull.ms[27.00-500.00]



**Figure 21 : Exemple du chromatogramme et du spectre de masse obtenus pour le 2,4,4'-trichlorobiphényle (PCB-28)**

### 3.3.3.2.8. *Quantification des dioxines et PCBs par GC-MS/MS*

L'analyse quantitative des dioxines et PCBs peut être effectuée en mesurant l'aire des pics chromatographiques et en appliquant une méthode d'étalonnage externe. Une quantification par étalonnage externe consiste à prendre directement comme réponses les valeurs absolues de la surface - ou de la hauteur - des pics. Ces réponses sont utilisées pour construire la courbe d'étalonnage à partir d'échantillons étalons puis, au moyen de cette courbe d'étalonnage préalablement établie, on calcule la concentration d'échantillons inconnus en mesurant la surface ou la hauteur des pics correspondants. Cette quantification au moyen d'un étalon externe est intéressante en termes de coût et de temps, même si sa précision et son exactitude restent assez limitées. Cependant, pour une analyse semi-quantitative, un étalon externe unique suffira pour atteindre l'exactitude souhaitée.

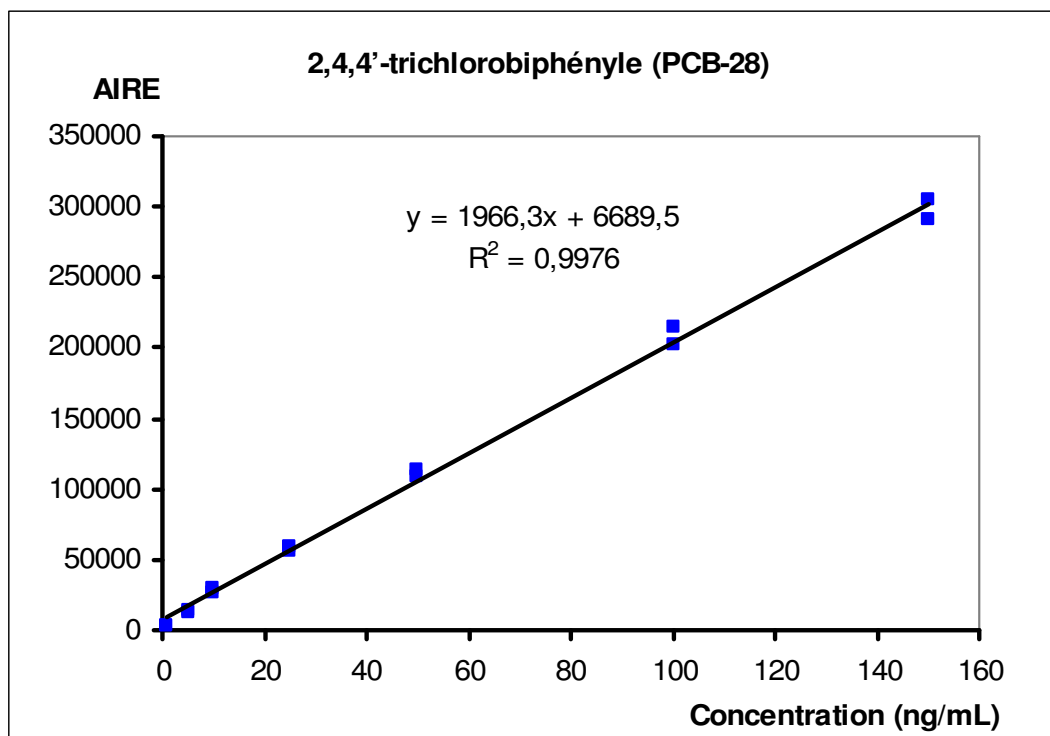
Une analyse semi-quantitative a été ainsi faite, en utilisant des solutions étalons qui contiennent des concentrations identiques des différents PCBs. Ces solutions étalons sont préparées à partir d'une solution mère contenant les 6 PCBs, chacun à une même concentration de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans l'iso-octane. La gamme de concentrations des solutions étalons s'étend de  $1,0 \text{ ng.mL}^{-1}$  à  $250 \text{ ng.mL}^{-1}$ . Dans le cas de notre étude, nous avons quantifié les différents composés à l'aide d'un étalonnage externe, c'est pourquoi nous préférons utiliser le terme d'analyse semi-quantitative, un étalonnage interne étant plus pertinent si l'objectif est de réaliser une analyse quantitative ; on s'affranchit ainsi d'éventuelles variations lors de l'injection et de la vaporisation.

Pour évaluer les performances de la méthode, plusieurs paramètres classiques ont été déterminés. Ainsi le domaine de linéarité a été estimé en analysant 9 solutions étalons pour une gamme de concentrations allant de 1 à  $250 \text{ ng.mL}^{-1}$  (1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200,  $250 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). On est alors en mesure de construire, pour chacun des PCBs, la droite de calibration qui lui correspond. Comme nous venons de l'indiquer, un simple étalonnage externe a été mis en oeuvre, car il est plus simple et moins long qu'un étalonnage interne.

Nous avons donc tracé des courbes d'étalonnage correspondant à chaque PCB en effectuant les mesures sur un blanc analytique des 9 solutions étalons. Ces courbes d'étalonnage sont définies par une équation du type  $y_i = a_i x_i + b_i$ , où  $y_i$  est l'aire du pic correspondant et  $x_i$  la concentration du composé (i).

Les courbes d'étalonnage externe des dioxines et PCBs sont effectuées grâce à l'aire des pics chromatographiques. A titre d'exemple, la courbe d'étalonnage externe obtenue

pour 2,4,4'-trichlorobiphényle (PCB-28) est présentée sur la **figure 22**. Les résultats obtenus pour l'ensemble des PCBs et dioxines sont regroupés dans le **tableau 44**.



**Figure 22 : Courbe d'étalonnage externe pour le PCB-28**

**Tableau 44 : Domaine de linéarité et droite de calibration pour les dioxines et PCBs**

Congénère	Domaine de linéarité (ng.mL <sup>-1</sup> )	Droite de calibration	r <sup>2</sup>
PCB-28	0,60 - 150	$y = 1966,3 x + 6689,5$	0,9976
PCB-52	0,80 - 200	$y = 1415,6 x + 2845,4$	0,9985
PCB-101	1,30 - 250	$y = 696,36 x + 1008,5$	0,9983
PCB-153	1,55 - 150	$y = 1113,3 x + 1874,7$	0,9888
PCB-138	1,60 - 250	$y = 644,58 x + 1078,3$	0,9989
PCB-180	2,35 - 250	$y = 1022,1 x + 5229,4$	0,9973
2,3,7,8-TCDF	0,78 - 50	$y = 1783,1 x + 663,79$	0,9991
2,3,7,8-TCDD	1,16 - 50	$y = 2188,5 x + 2738,1$	0,9983
1,2,3,6,7,8-TCDD	2,90 - 150	$y = 1088,1 x + 2255,8$	0,9987

### 3.3.4. Application à des échantillons de lait

#### 3.3.4.1. Procédure de traitement des échantillons de lait :

Partant les résultats précédents, nous avons pu élaborer la procédure décrite ci-après pour le traitement des échantillons de lait:

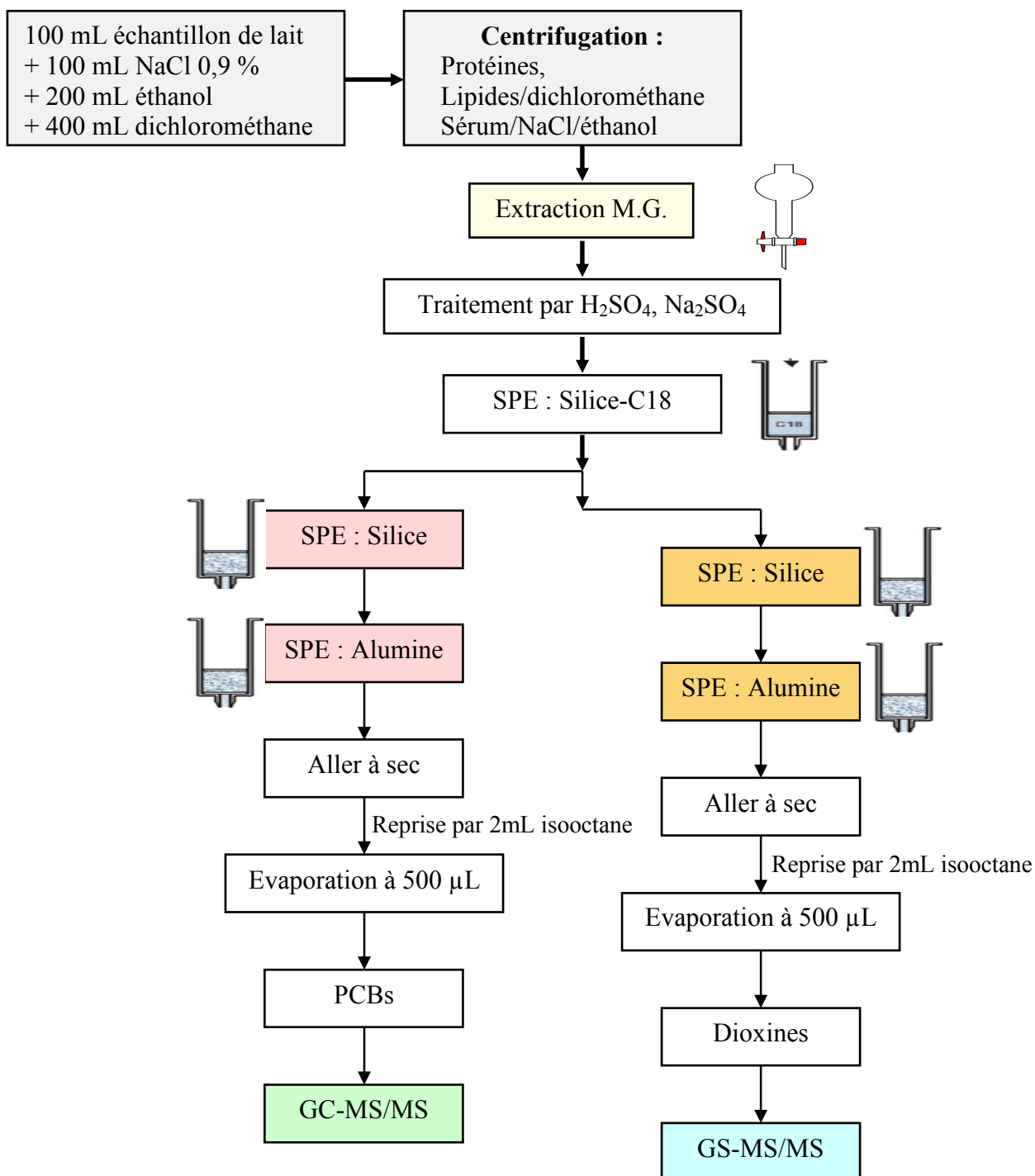


Figure 23 : Procédure de détermination des dioxines et PCBs dans le lait par GC-MS (Bui X.T. et al. 2007)

### 3.3.4.2. Récupération des PCBs après traitement des échantillons

Pour déterminer le taux de recouvrement d'ajouts lorsque notre méthode d'analyse est appliquée à un échantillon de lait, nous avons mis en œuvre la procédure présentée sur la **figure 23**. A un volume de 100 mL de lait nous avons ajouté, 48 heures avant de réaliser l'extraction liquide-liquide, 1 mL d'une solution des PCBs à une concentration de 10,0 ng.mL<sup>-1</sup> et 1 mL de la solution des dioxines dont les concentrations vont de 0,78 à 8,02 ng.mL<sup>-1</sup>. En raison de la faible teneur supposée en dioxines et PCBs du lait choisi pour cette étude, on a considéré que la teneur de l'ajout représentait la teneur totale dans le lait : autrement dit, on a considéré que notre échantillon de lait constituait un blanc de matrice. Par ailleurs, on a également opéré comme précédemment mais en effectuant l'ajout des standards juste avant le dosage par GC-MS. Les comparaisons des résultats obtenus dans les deux cas – ajout des standards avant l'extraction liquide-liquide et ajout des standards juste avant le dosage par GC-MS – on a trouvé ainsi les taux de recouvrement qui sont présentés dans le **tableau 45**. Nous n'avons déterminé ici que les taux de recouvrement des PCBs sur les deux échantillons de lait suivants :

- Lait 1 : lait cru de vache, fourni par la station INRA de MARCENAT, le 24 janvier 2007
- Lait 2 : son origine n'est pas précisée.

**Tableau 45 : Taux de recouvrement liés au traitement des échantillons de lait**

Congénères	Lait 1		Lait 2	
	Moyenne (%)	RDS (%)	Moyenne (%)	RDS (%)
PCB-28	83,9	5,2	86,1	7,2
PCB-52	81,3	7,8	84,2	6,9
PCB-101	79,3	9,6	78,6	6,1
PCB-153	82,1	6,3	80,9	5,6
PCB-138	84,9	8,6	75,6	7,9
PCB-180	71,3	9,3	74,3	8,1

### 3.3.4.3. Quantification des dioxines et des PCBs dans les échantillons de lait

Une analyse semi-quantitative des PCBs a été réalisée par étalonnage externe, en se basant sur l'aire des pics chromatographiques. L'aire obtenue, le volume d'échantillon, le volume d'extrait final, le taux de récupération des étalons pour chaque PCB peuvent tous



influencer directement la concentration trouvée pour les PCBs dans le lait. La concentration des PCBs dans le lait est calculée comme suit :

$$C_{lait} = C_{fin} \times \frac{V_{éch}}{V_{fin}} \times \frac{1}{R}$$

où

$C_{lait}$  : concentration des dioxines ou PCBs dans l'échantillon de lait

$C_{fin}$  : concentration de l'extrait final

$V_{fin}$  : volume d'extrait final (500 $\mu$ L)

$V_{éch}$  : volume d'échantillon (prise d'essai-100 mL)

$R$  : taux de récupération pour chaque dioxine ou PCB

Les concentrations de PCBs trouvées dans nos échantillons de lait sont données dans le **tableau 46**.

**Tableau 46 : Concentration des divers PCBs dans quelques échantillons de lait**

Congénères	Lait 1		Lait 2		Lait 3	
	Conc. (ng.mL <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Conc. (ng.mL <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Conc. (ng.mL <sup>-1</sup> )	RSD (%)
PCB-28	<b>0,008</b>	16,3	<b>0,015</b>	6,1	<b>Traces</b>	-
PCB-52	<b>0,012</b>	10,2	<b>traces</b>	-	<b>0,026</b>	8,2
PCB-101	<b>nd</b>	-	<b>traces</b>	-	<b>0,018</b>	16,9
PCB-153	<b>traces</b>	-	<b>nd</b>	-	<b>nd</b>	-
PCB-138	<b>0,021</b>	8,9	<b>0,067</b>	7,3	<b>0,032</b>	7,8
PCB-180	<b>nd</b>	-	<b>0,083</b>	5,6	<b>0,063</b>	6,3

En pratique, les chromatogrammes obtenus présentent encore quelques pics d'isomères de PCBs. Dans le cas où un standard n'a pas été essayé, on ne peut faire un pronostic que sur la base de la comparaison du spectre de masse obtenu avec le spectre de masse théorique.

#### 3.3.4.4. Conclusion

Notre objectif était d'abaisser la limite de détection et de quantification : dans ce but, nous avons mis au point une méthode d'analyse qui comprend successivement, pour traiter les échantillons, une séparation des composants du lait, une extraction en phase solide (séparation, purification, déshydratation et concentration). Le taux de récupération obtenu

pour cette méthode va de 70% à 86%. En appliquant cette procédure, nous avons abaissé d'environ 100 fois la limite de détection de la méthode de mesure proprement dite. Les résultats des analyses de PCBs dans divers échantillons de lait sont donnés dans le **tableau 46 et dans les annexes.**

# **Conclusions et perspectives**

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif général de ce travail était de développer des méthodes d'analyse ayant des seuils de détection aussi bas que possible puis de les valider en vue de leur application à de grandes séries d'échantillons agro-alimentaires. Ceux-ci pourraient être alors utilisés comme indicateurs de pollutions environnementales.

Le lait et les produits laitiers qui jouent un rôle important dans l'alimentation humaine, surtout lorsqu'il s'agit de pays ayant un niveau de vie assez élevé, peuvent être à la source d'intoxications. Le lait est sécrété par les glandes mammaires des mammifères femelles qui, par leur physiologie et leur anatomie, en font un exutoire naturel en cas de contamination de leur environnement, en parti au lieu de leur alimentation, par des métaux ou des molécules toxiques. C'est pourquoi nous avons choisi cette matrice comme un indicateur possible des pollutions environnementales. Un argument important de ce choix est en effet que la collecte du lait est généralement organisée avec une bonne traçabilité. Deux types de contaminations ont été prises en compte, d'une part, les métaux toxiques (le plomb et le cadmium), d'autre part, les pesticides (les PCBs et dioxines).

On peut trouver, publiées dans la littérature, de nombreux travaux consacrés à la détermination dans le lait des teneurs en plomb, cadmium, PCBs, dioxines et bien d'autres métaux ou molécules organiques.

Les appareils de mesure utiles pour la détermination de tels contaminants ont des limites de détection et de quantification qui leur sont propres et c'est donc sur l'étape de traitement des échantillons qu'il faut jouer si l'on veut pouvoir abaisser ces seuils de façon significative.

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi la spectrométrie d'absorption atomique pour doser le plomb et le cadmium ; la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour doser les dioxines et PCBs.

En ce qui concerne le traitement des échantillons de lait qui contient la clef de notre problème, la première étape consiste à séparer le lait en 3 phases (protéines, lipides, sérum). Parmi les différentes solutions proposées nous avons choisi d'opérer avec le mélange de solvants suivant :

- 1 Vol. de lait
- 1 Vol. d'une solution NaCl 0,9%
- 2 Vol. d'éthanol
- 4 Vol. de dichlorométhane

Deux modes de séparation ont été testés : une centrifugation et une décantation. Avec le centrifugeur, le temps de séparation est relativement court de 30 minutes environ, alors que le temps de séparation est beaucoup plus long (environ 24 heures), lorsqu'on utilise une simple ampoule à décanter. Après cette première séparation, les protéines se retrouvent sous forme solide entre les deux phases liquides, les lipides ayant été solubilisés par le dichlorométhane qui constitue la phase liquide inférieure.

Cette étape est fort intéressante car, outre la séparation recherchée, elle permet une conservation facile des phases qui doivent être analysées par la suite : les métaux se retrouvent dans la phase solide des protéines, alors que les lipides ont entraîné avec eux les PCBs et dioxines dans la phase organique. On peut ainsi conserver ces deux fractions, sans prendre trop de précautions, pour les envoyer ensuite à analyser dans des laboratoires spécialisés. De plus, cette séparation permet d'augmenter considérablement la taille de la prise d'essai et de ce fait d'abaisser de façon très significative les seuils de détection. C'est ce qui était souhaité.

Nos études préliminaires ont effectivement démontré qu'après séparation du lait en ses 3 principales fractions, le plomb et le cadmium se retrouvent totalement dans la phase protéique et qu'aucune trace de ces éléments n'est décelée dans les deux autres fractions : il suffira donc de déterminer Pb et Cd sur les protéines du lait, puisqu'on dispose ainsi d'un moyen simple pour effectuer une pré-concentration de ces éléments traces.

Nous avons cherché à optimiser les conditions de minéralisation, en considérant 3 facteurs : le rapport volume des réactifs de minéralisation / Prise d'essai, la taille de la prise d'essai et la température de minéralisation. De façon évidente seule la taille de la prise d'essai a un effet et le plan d'expérience qui a été essayé, conduit à choisir une prise d'essai de 2g pour un volume de réactifs de 24 mL.

Puis on a ajouté au lait différents volumes d'une solution standard pour obtenir, dans la solution de mesure finale, une gamme de concentrations allant de 0,05 à 7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium et de 0,5 à 70  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb. Les échantillons ainsi préparés ont été laissés au réfrigérateur pendant 48 heures avant d'effectuer les analyses. Les courbes d'étalonnage obtenues montrent que la limite supérieure du domaine de linéarité semble se situer à une concentration de 3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cadmium et de 35  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plomb. Il est alors possible de calculer les paramètres de la droite d'étalonnage pour en tirer les limites de détection (LD) et de quantification (LQ). A partir de 2g de protéines qui représentent environ 50 mL de lait, les limites de détection  $LD_{\text{lait}}$  et de quantification  $LQ_{\text{lait}}$  sont en fait abaissées d'un facteur 5. On a donc abouti à des limites de détection de 0,14  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour

Pb et de 0,01  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd, qui étaient respectivement au mieux jusqu'ici de 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Pb (Frkovic A et al. 1997) et de 0,2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour Cd (Milhaud G.E. et al. 2000). Il reste encore tout à fait possible d'améliorer ces seuils de détection, en améliorant la technique de séparation initiale du lait en ses phases et en augmentant la taille de la prise d'essai, en prélevant par exemple 10g de protéines au lieu de 2g.

En ce qui concerne la détermination des dioxines et des PCBs dans la phase lipidique, nous avons opté pour une méthode d'extraction en phase solide sur des cartouches de silice- $\text{C}_{18}$ , suivie d'une étape de déshydratation et d'une purification sur colonnes de silice puis d'alumine. Cette procédure de traitement des échantillons a permis d'obtenir des taux de récupération qui vont, sur des blancs analytiques, de 77 % à 83 % pour les PCBs et de 76% à 79 % pour les dioxines. Sur des échantillons de lait, les taux de récupération des PCBs vont de 71 % à 86%. De plus, grâce à cette procédure de traitement des échantillons, nous avons abaissé la limite de détection : elle va de 1,5 à 6,9  $\text{ng.L}^{-1}$  pour les PCBs et de 3,1 à 8,6  $\text{ng.L}^{-1}$  pour les dioxines ; la limite de quantification va de 4,6 à 21,3  $\text{ng.L}^{-1}$  pour les PCBs ; elle va de 10,2 à 25,9  $\text{ng.L}^{-1}$  pour les dioxines. On a atteint ainsi des niveaux de concentration qui sont 100 fois plus bas que la limite de détection et de quantification de la méthode de mesure proprement dite. Si l'on mettait en œuvre pour le couplage GC-MS un spectromètre de masse à haute résolution, on pourrait encore abaisser de façon très significative les limites de détection et de quantification. Appliquée à différents échantillons de lait, notre méthode a permis de déterminer les concentrations en PCBs qui sont données sur le **tableau 46**.

D'un point de vue pratique, les méthodes que nous proposons peuvent être aisément mises en œuvre. Le traitement préalable des échantillons de lait, tel qu'il est décrit, permet une conservation facile des phases protéiques et lipidiques qui pourront être ainsi envoyées à distance pour être analysées dans des laboratoires bien équipés. De plus, les préconcentrations qui sont ainsi effectuées permettent d'abaisser considérablement les seuils de détection et disposer ainsi d'une méthode de tri pour alerter sur des contaminations possibles, même si la méthode de dosage n'est que semi-quantitative.

Avoir abaissé les limites de détection de nos méthodes analytiques permet de rechercher des pollutions, même après qu'elles aient été diluées, par exemple dans une citerne de lait en provenance de 10 fermes d'élevage différentes. Si on ne détecte pas de traces de métaux ou de molécules organiques toxiques, on n'ira pas chercher plus loin. Si l'on se trouve par contre en présence d'un contrôle positif, il y aura lieu de rechercher la

provenance de la contamination, de retrouver la ou les fermes d'où provient le lait contaminé.

Une autre application prévisible de notre travail réside dans le traitement de l'échantillon : on pourrait en effet y faire appel pour préparer des échantillons de référence, lesquels faciliteraient sans aucun doute la fixation de normes pour les contaminations.

Dans l'avenir, il serait utile d'abaisser encore les seuils de détection de nos méthodes. Il s'agit bien des seuils de détection puis qu'on vise en fait le développement de méthodes de tri des échantillons. On pourrait par exemple utiliser différents solvants pour extraire les métaux toxiques après la minéralisation des protéines de lait.

On ce qui concerne les PCBs et les dioxines, on peut aussi penser à l'utilisation de standards pour identifier et quantifier leurs divers isomères. Mais cette voie n'est pas la plus importante car l'objectif principal est bien, dans l'immédiat, sur l'abaissement des seuils de détection pour pouvoir disposer de méthodes de tri qui soient les plus efficaces possibles.

# **Bibliographie**



## BIBLIOGRAPHIE

- ABAD E., LLERENA J. J., SAULO J., CAIXACH J., RIVERA J. Study on PCDDs/PCDFs and co-PCBs content in food samples from Catalonia (Spain). *Chemosphere* (2002), 46, 1435-1441.
- ABRAHAM K., O. PTIPKE, A. GROSS, O. KORDONOURI, S. WIEGAND, U. WAHN AND H. HELGE. TIME COURSE OF PCDD/PCDF/PCB CONCENTRATIONS IN BREAST-FEEDING MOTHERS AND THEIR INFANTS. *Chemosphere*, (1998) **37** (9-12), 1731-1741
- ALAIS C. Science du lait- Principes des techniques laitières. Editions SEP, Paris (1965).
- ANGULO R., P. MARTINEZ and M. L. JODRAL. PCB Congeners Transferred by Human Milk, with an Estimate of their Daily Intake. *Food and Chemical Toxicology* (1999) **37**, 1081-1088
- ANTUNOVIC Z., BOGUT I., SENČIĆ D., KATIĆ M., MIJIĆ P. Concentrations of selected toxic elements (cadmium, lead, mercury and arsenic) in ewe milk in dependence on lactation stage. *Czech Journal of Animal Science* (2005)**50** (8), 369-375
- ARFI C., SETA N., FRAISSE D., REVEL A., ESCANDE J.-P., MOMAS I. Dioxins in adipose tissue of non-occupationally exposed persons in France : correlation with individual food exposure. *Chemosphere* (2001) **44**, 1347-1352.
- AYYADURAI K., ESWARA M. M., JEBARATHINAM N. J., SWAMINATHAN C. S., KRISHNASAMY V. Studies on the concentration of lead and cadmium in milk of cow and buffalo. *Indian Journal of Environmental Health* (1998) **40** (4), 367-371.
- BECKMEN KIMBERLEE B., GINA M. YLITALO, RODNEY G. TOWELL, MARGARET M. KRAHN, TODD M. O'HARA, JOHN E. BLAKE. Factors affecting organochlorine contaminant concentrations in milk and blood of northern fur seal *Callorhinus ursinus*/dams and pups from St. George Island, Alaska. *The Science of the Total Environment* (1999) **231**, 183-200
- BENCKO V., Z. SKULOVA, M. KRECMEROVA, A.K. DJIEN LIEM. Selected polyhalogenated hydrocarbons in breast milk. *Toxicology Letters* 96,97(1998) 341-345
- BERG M. V. D. and al. Consultation on assessment of the health risk of dioxins; re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI) Executive Summary. *Food Additives and Contaminants* (2000) **17** (4), 223-240.
- BERG M. V. D., PETERSON R.E. and SCHRENK D. Human risk assessment and TEFs. *Food Additives and Contaminants* (2000) **17** (4), 347-358.
- BERNARD A., BROECKAERT F., DE POORTER G., DE COCK A., HERMANS C., SAEGERMAN C. and HOUINS G.W. The Belgian PCB/Dioxin Incident : Analysis of the Food Chain Contamination and Health Risk Evaluation. *Environmental Research* (2002), Section A, **88**, 1-18
- BRAGA A. M. C. B., KRAUSS T., REIS dos SANTOS C. R., MESQUITA de SOUZA P. PCDD/F-contamination in a hexachlorocyclohexane waste site in Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere* (2002) **46**, 1329-1333.

- BUI XUAN THANH, BESANÇON STÉPHANE, DUCAUZE CHRISTIAN. Lead and cadmium in cow's milk determined by Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometry after *DigiPREP* digestion, présenté au congrès de EuroFoodChem XIV à Paris, France, août 2007
- BUI XUAN THANH, RATHAHAO ESTELLE, DUCAUZE CHRISTIAN. Détermination des dioxins et des PCBs dans le lait de vache, présenté au congrès de EuroFoodChem XIV à Paris, France, août 2007.
- CAGGIANO ROSA, SERENA SABIA, MARIAGRAZIA D'EMILIO, MARIA MACCHIATO, ANIELLO ANASTASIO, MARIA RAGOSTA, SALVATORE PAINO. Metal levels in fodder, milk, dairy products, and tissues sampled in ovine farms of Southern Italy. *Environmental Research* (2005) **99**, 48–57
- CAVA-MONTESINOS P., M. LUISA CERVERA, AGUSTÍN PASTOR AND MIGUEL DE LA GUARDIA. Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk. *Analytica Chimica Acta* (2005) **531**, 111-123.
- CERKVENIK V., DOGANOC D. Z. and JAN J. Evidence of Some Trace Elements, Organochlorine Pesticides and PCBs in Slovenian Cow's Milk. *Food Technol. Biotechnol* (2000) **38** (2), 155-160.
- CHAO H.-R., S.-L. WANG, C.-C. LEE, H.-Y. YU, Y.-K. LU, O. PAPKE. Level of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls (PCDD/Fs, PCBs) in human milk and the input to infant body burden. *Food and Chemical Toxicology* (2004) **42**, 1299–1308
- CHIKUNI O., C.F.B. NHACHI, N.Z. NYAZEMA, A. POLDER, I. NAFSTAD, J.U. SKAARE. Assessment of environmental pollution by PCBs, DDT and its metabolites using human milk of mothers in Zimbabwe. *The Science of the Total Environment* (1997) **199**, 183-190
- CHOVANCOVA JANA , ANTON KOCAN, STANISLAV JURSA. PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in food of animal origin (Slovakia). *Chemosphere* (2005) **61**, 1305–1311
- CONI E., A. BOCCA, D. IANNI & S. CAROLI. Preliminary evaluation of the factors influencing the trace element content of milk and dairy products. *Food Chemistry* (1995) **52**, 123-130
- CONI E., B. BOCCA, B. GALOPPI, A. ALIMONTI AND S. CAROLI Identification of chemical species of some trace and minor elements in mature breast milk, *Microchemical Journal* (2000) **67**, 187-194.
- CONI E., BOCCA A., COPPOLELLI P., CAROLI S., CAVALLUCCI C. AND TRABALZA MARINUCCI M. Minor and trace element content in sheep and goat milk and dairy products. *Food Chemistry* (1996) **57** (2), 253-260.
- COSTERA ADRIAN , CYRIL FEIDT, PHILIPPE MARCHAND, BRUNO LE BIZEC, GUIDO RYCHEN. PCDD/F and PCB transfer to milk in goats exposed to a long-term intake of contaminated hay. *Chemosphere* (2006) **64**, 650–657
- COSTOPOULOU DANA, IRENE VASSILIADOU, ATHANASIOS PAPAPOULOS, VASSILIOS MAKROPOULOS, LEONDIOS LEONDIADIS. Levels of dioxins, furans and PCBs in human serum and milk of people living in Greece. *Chemosphere* (2006) **65**, 1462–1469

- COVACI A., P. SCHEPENS. Mass spectrometric detection in narrow-bore (0.10 mm I.D.) capillary chromatography Fast, sensitive and selective analysis of polychlorinated biphenyls. *Journal of Chromatography A* (2001) **923**, 287–293
- CSHPF (Conseil supérieur d'hygiène publique de France) Plomb, cadmium et mercure dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, Lavoisier Tech. & Doc., Paris (1996).
- DAS A. K., CHAKRABORTY R., CERVERA M. L., DE LA GUARDIA M. Metal speciation in biological fluids : a review. *Mikrochimica acta* (1996) **122** (3-4), 209-246.
- DE GRAEVE J., BERTHOU F., PROST M. Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse. MASSON, Paris (1986).
- DECLOITRE F., La part des différents aliments dans l'exposition au plomb, au cadmium et au mercure en France, *Cah. Nutr. Diet.* (1988) **33**, 167–175.
- DEMIROZU-ERDINC B., SALDAMLI I. Variation in some heavy metals during the production of white cheese. *International journal of dairy technology* (2000) **53** (3), 96-99.
- DUCAUZE C.J. Méthodes d'analyse pour la recherche des fraudes alimentaires, p. 128, in : *Fraudes alimentaires - Approche réglementaire et méthodologie analytique* - DUCAUZE C.J. Ed., LAVOISIER Tech. & Doc., Paris (2003).
- DWERNYCHUK L. W., HOANG D. C., HATFIELD C. T., BOIVIN T. G., TRAN M. H., PHUNG T.D., NGUYEN D. T. Dioxin reservoirs in southern Viet Nam-A legacy of Agent Orange. *Chemosphere* (2002) **47**, 117-137
- EKLUND G., OSKARSSON A. Exposure of cadmium from infant formulas and weaning foods. *Food additives and contaminants* (1999) **16** (12), 509-519.
- ERDOGRUL OZLEM, ADRIAN COVACI, NACIYE KURTUL, PAUL SCHEPENS. Levels of organohalogenated persistent pollutants in human milk from Kahramanmaras region, Turkey. *Environment International* (2004) **30**, 659– 666
- FAUGERE J.-G., HOCQUELLET P. Intérêt de la spéciation des éléments inorganiques dans l'analyse des traces. Premières approches dans le contrôle de l'alimentation humaine. *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique* (1995) **88** (932), 219-230.
- FEELEY M. and BROUWER A. Health risks to infants from exposure to PCBs, PCDDs and PCDFs. *Food Additives and Contaminants* (2000) **17** (4), 325-333.
- FEINBERG M. Méthodes chimiométriques pour la recherche des fraudes alimentaires, p.63, in : *Fraudes alimentaires - Approche réglementaire et méthodologie analytique* - DUCAUZE C.J. Ed., LAVOISIER Tech. & Doc., Paris (2003).
- FOCANT J.-F., C. PIRARD, A.-C. MASSART, E. DE PAUW. Survey of commercial pasteurised cows milk in Wallonia (Belgium) for the occurrence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* (2003) **52**, 725–733
- FOCANT J.-F., C. PIRARD, C. THIELEN, E. DE PAUW. Levels and profiles of PCDDs, PCDFs and cPCBs in Belgian breast milk. Estimation of infant intake. *Chemosphere* (2002) **48**, 763–770

- FOCANT J.-F., G. EPPE, C. PIRARD, A.-C. MASSART, J.-E. ANDR E, E. DE PAUW. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in Belgian foodstuffs Assessment of dietary intake. *Chemosphere* (2002) **48**, 167–179
- FOCANT J.-F., PIRARD C., MASSART A.-C., DE PAUW E. Survey of commercial pasteurized cows' milk in Wallonia (Belgium) for the occurrence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* (2003) **52**, 725-733.
- FOCANT J.-F., PIRARD C., THIELEN C., DE PAUW E. Levels and profils of PCDDs, PCDFs and PCBs in Belgian breast milk. Estimation of infant intake. *Chemosphere* (2002) **48**, 763-770.
- FOCANT JEAN-FRANÇOIS, GAUTHIER EPPEA, MARIE-LOUISE SCIPPO, ANNE-C'ECILE MASSART, CATHERINE PIRARD, GUY MAGHUIN-ROGISTER, EDWIN DE PAUWA. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with isotope dilution time-of-flight mass spectrometry for the measurement of dioxins and polychlorinated biphenyls in foodstuffs Comparison with other methods. *Journal of Chromatography A* (2005) **1086**, 45–60
- FRKOVIC A., KRAS M., ALEBIC-JURETIC A. Lead and Cadmium Content in Human Milk from the Northern Adriatic Area of Croatia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (1997) **58**, 16-21.
- GALAL-GORCHEV H. Dietary intake, levels in food and estimated intake of lead, cadmium, and mercury. *Food Additives and Contaminants* (1993) **10** (1), 115-128.
- GANDEBOEUF J. *Polarographie*, Librairie Armand Colin, Paris (1971).
- Glynn Anders W., Atuma Samuel, Aune Marie, Darnerud Per Ola and Chatteringius Sven. Polychlorinated Biphenyl Congeners as Markers of Toxic Equivalents of Polychlorinated Biphenyls, Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Breast Milk *Environmental Research*, (2001) **86** (3), 217-228
- González M.J., Jiménez B., Hernández L.M., Gonord M.F. Levels of PCDD, PCDF in human milk from populations in Madrid and Paris. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* (1996) **56**, 197-204.
- GREIZERSTEIN H. B., C. STINSON, P.MENDOLA, G. M. BUCK, P. J. KOSTYNIK, AND J. E.VENA. Comparison of PCB Congeners and Pesticide Levels between Serum and Milk from Lactating Women. *Environmental Research Section A*(1999) **80**, 280-286
- Guan Peng, Tajimi Morihito, Uehara Ritei, Watanabe Makoto, Oki Izumi, Ojima Toshiyuki and Nakamura Yosikazu. Congener profiles of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the breast milk samples in Tokyo, Japan. *Chemosphere* (2006) **62** (7), 1161-1166
- GUERAULT A. M. *Les techniques nouvelles dans l'industrie laitière, Lait- Beurre*. Editions SEP, Paris (1960).
- HALLEN I. P., JORHEM L., LAGERKVIST B. J., OSKARSSON A. Lead and cadmium levels in human milk and blood. *Science of the total environment* (1995) **166**, 149-155.
- HASHIMOTO SHUNJI, TAKASHI YAMAMOTO, AKIO YASUHARA AND MASATOSHI MORITA. PCDD, PCDF, PLANAR AND OTHER PCB LEVELS IN HUMAN MILK IN JAPAN. *Chemosphere*, (1995) **31** (9), 4067-4075

- HECK M.C., J. SIFUENTES DOS SANTOS, S. BOGUSZ JUNIOR, I. COSTABEBER, T. EMANUELLI. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Chemistry* (2007) **102**, 288–294
- HEJTMANKOVA A., KUCEROVA J., MIHOLOVA D., KOLIHVOVA D., ORSAK M. Levels of selected macro- and microelements in goat milk from farms in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.* (2002) **47** (6), 253-260
- HIPPELEIN MARTIN, HEIKE KAUPP, GISELA DORR AND OTTO HUTZINGER. BASELINE CONTAMINATION ASSESSMENT FOR A NEW RESOURCE RECOVERY FACILITY IN GERMANY PART III : PCDD/Fs, HCB, AND PCBs IN COW'S MILK. *Chemosphere*, (1996) **32** (8), 1617-1622
- HO CHIAO-YU, SHIUH-JEN JIANG. Determination of Cr, Zn, Cd and Pb in milk powder by slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (2002) **17**, 688-692
- HOENIG M, DE KERSABIEC . A-M. L'atomisation électrothermique en spectrométrie d'absorption atomique, Masson, Paris (1990).
- HOENIG M, DE KERSABIEC . A-M. Comment assurer la qualité des résultats en spectrométrie d'absorption atomique électrothermique, C-CUBE, Paris (1995).
- Iida Takao, Hirakawa Hironori, Matsueda Takahiko, Takenaka Shigeyuki and Nagayama Junya. Polychlorinated dibenzo-P-dioxins and related compounds in breast milk of Japanese primiparas and multiparas. *Chemosphere*, (1999) **38** (11), 2461-2466
- IKEM A., NWANKWOALA A., ODUEYUNGBO S., NYAVOR K., EGIEBOR N. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. *Food chemistry* (2002) **77** (4), 439-447.
- JARACZEWSKA KAMILA, JANINA LULEK, ADRIAN COVACI, STEFAN VOORSPOELS, AGNIESZKA KALUBA-SKOTARCZAK, KRZYSZTOF DREWS, PAUL SCHEPENS. Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland. *Science of the Total Environment* (2006) **372**, 20–31
- JENNINGS W. *Gas Chromatography with Glass Capillary Columns*, ACADEMIC PRESS, New York (1980)
- JORHEM L. Determination of Metals in Foods by Atomic Absorption Spectrometry after Dry Ashing : NMKL Collaborative Study. *Journal of AOAC International* (2000) **83** (5), 1204-1211
- JORHEM L. and ENGMAN J. Determination of Lead, Cadmium, Zinc, Copper, and Iron in Foods by Atomic Absorption Spectrometry after microwave Digestion : NMKL collaborative Study. *Journal of AOAC International* (2000) **83** (5), 1189-1203.
- KARADJOVA I. ; S. GIROUSI, E. ILIADOU, AND I. STRATIS. Determination of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni and Pb in Milk, Cheese and Chocolate. *Mikrochim. Acta* (2000) **134**, 185-191
- KARAVOLTSOS S., SAKELLARI A., DIMOPOULOS M., DASENAKIS M., SCOULLOS M. Cadmium content in foodstuffs from the Greek market. *Food Additives and Contaminants* (2002) **19** (10), 954-962

- KIVIRANTA HANNU, RAIJA PURKUNEN, AND TERTTU VARTIAINEN. Levels and Trends of PCDD/Fs and PCBs in Human Milk in Finland. *Chemosphere* (1999) **38** (2), 311-323
- KOGEVINAS M. Studies of cancer in humans. *Food Additives and Contaminants* (2000) **17** (4), 317-324
- KRAUTHACKER BLANKA, ELSA REINER, ANA VOTAVA-RAIC, DUGKA TJESIC-DRINKOVIC AND DANICA BATINIC. ORGANOCHLORINE PESTICIDES AND PCBs IN HUMAN MILK COLLECTED FROM MOTHERS NURSING HOSPITALIZED CHILDREN. *Chemosphere* (1998) **37** (1), 27-32
- KRELOWSKA-KULAS M., KEDZIOR W. and POPEK S. Content of some metals in goat's milk from southern Poland. *Nahrung* (1999) **43** (5), 317-319
- KROKOS F., CREASER C.S., WRIGHT C., STARTIN J.R. LEVELS OF SELECTED ORTHO AND NON-ORTHO POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN UK RETAIL MILK. *Chemosphere* (1996) **32**, (4), 661-664
- KUNISUE TATSUYA, MASAYOSHI MURAOKA , MASAKO OHTAKE , AGUS SUDARYANTO , NGUYEN HUNG MINH , DAISUKE UENO , YUMI HIGAKI , MIYUKI OCHI , OYUNA TSYDENOVA , SATOKO KAMIKAWA , TOMOYUKI TONEGI , YUMI NAKAMURA , HIROSHI SHIMOMURA , JUNYA NAGAYAMA , SHINSUKE TANABE. Contamination status of persistent organochlorines in human breast milk from Japan: Recent levels and temporal trend. *Chemosphere* (2006) **64**, 1601–1608
- KUNISUE TATSUYA, MASAYUKI SOMEYA, FUJIO KAYAMA, YIHE JIND, SHINSUKE TANABE. Persistent organochlorines in human breast milk collected from primiparae in Dalian and Shenyang, China. *Environmental Pollution* (2004) **131**, 381-392
- LALOUX L. Lait et produits laitiers, p.177, in : *Fraudes alimentaires - Approche réglementaire et méthodologie analytique* - DUCAUZE C.J. Ed., LAVOISIER Tech. & Doc., Paris (2003)
- LARSEN E. H. and RASMUSSEN L. Chromium, lead and cadmium in Danish milk products and cheese determined by Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometry after direct injection or pressurized ashing. *Lebensm Unters Forsch* (1991) **192**, 136-141
- LARSEN J. C., FARLAND W. and WINTERS D. Current risk assessment approaches in different countries. *Food Additives and Contaminants* (2000) **17** (4), 359-369
- LAUWERYS R., BUCHET J.P., ROELS H., BROUWERS J., STANESCOU D. Epidemiological survey of workers exposed to cadmium. Effects on lung, kidney and several biological indices, *Arch. Environ. Health* (1974) **28**, 145–148
- LEOTSINIDIS M., ALEXOPOULOS A., KOSTOPOULOU-FARRI E. Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: Association with dietary habits and other factors. *Chemosphere* (2005) **61**, 238-247
- LICATA P., TROMBETTA D., CRISTANI M., GIOFRÈ F., MARTINO D., CALÒ M., NACCARI F. Levels of « toxic » and « essential » metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environment International* (2004) **30**, 1-6

- LIEM A. K. D. Important developments in methods and techniques for the determination of dioxins and PCBs in foodstuffs and human tissues. *Trends in analytical chemistry* (1999) **18** (7), 499-507
- LIEM A. K. D., FURST P. and RAPPE C. Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Additives and Contaminants* (2000) **17** (4), 241-259
- LLOMPART M., PAZOS M., LANDIN P., and CELA R. Determination of Polychlorinated Biphenyls in Milk samples by Saponification-Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* (2001) **73**, 5858-5865
- LOPEZ A. M., PRIETO M. F., MIRANDA M., CASTILLO C., HERNANDEZ J., BENEDITO J. L. Cadmium and lead accumulation in cattle in NW Spain. *Veterinary and human toxicology* (2003) **45** (3), 128-130
- LUTTER C., V. LYENGA, R. BARNES, T. CHUVAKOVA, G. KAZBEKOVA, T. SHARMANOV. BREAST MILK CONTAMINATION IN KAZAKHSTAN: IMPLICATIONS FOR INFANT FEEDING. *Chemosphere*, (1998) **31** (9- 12), 1761-1772
- MAEDA T., NAKATANI M., TANIMOTO Y. Effet de l'oxygène gazeux comme modificateur de matrice dans le dosage direct du cadmium et du plomb dans le sang et les aliments, par absorption atomique avec four de graphite. *Bunseki Kagaku* (1990) **38** (12), 734-736
- MALISCH R. Increase of the PCDD/F-contamination of milk, butter and meat samples by use of contaminated citrus pulp. *Chemosphere* (2000) **40**, 1041-1053
- MALISCH R., BRUNS-WELLER E., KNOLL A., FURST P., MAYER R., WIESMULLER T. Results of an "emergency quality control study" as confirmation of a PCDD/PCDF-contamination of milk and butter samples. *Chemosphere* (2000) **40**, 1033-1040
- MARTINO F. A. R., MARÍA LUISA FERNÁNDEZ SÁNCHEZ AND ALFREDO SANZ-MEDEL The potential of double focusing ICP-MS for studying elemental distribution patterns in whole milk, skimmed milk and milk whey of different milk. *Analytica Chimica Acta* (2001) **442**, 191-200
- MASCINI M., A. MACAGNANO, G. SCORTICHINI, M. DEL CARLO, G. DILETTI, A. D'AMICO, C. DI NATALE, D. Compagnonea. Biomimetic sensors for dioxins detection in food samples. *Sensors and Actuators B* (2005) **111-112**, 376-384
- MATA L., PEREZ M. D., PUYOL P., CALVO M. Distribution of added lead and cadmium in human and bovine milk. *Journal of Food Protection* (1995) **58** (3), 305-309
- MEHENNAOUI S., DELACROIX-BUCHET A., DUCHÉ A., ENRIQUEZ B., KOLF-CLAUW M., MILHAUD G. Comparative study of cadmium transfer in ewe and cow milks during rennet and lactic curds preparation, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (1999) **37**, 389-395
- MEJIA E.C., PRESTON R.T., et FAJERSSON P. Effects of restricted suckling versus artificial rearing on milk production, calf performance and reproductive efficiency of dual purpose Mpwapwa cattle in a semi-arid climate. *Livestock Research for Rural Development* (1998) **10** (1), 1-12

- MENESES M., SCHUHMACHER M., DOMINGO J. L. A design of simple models to predict PCDD/F concentrations in vegetation and soils. *Chemosphere* (2002) **46**, 1393-1402
- MILACIC RADMILA, BLAZ KRALJ. Determination of Zn, Cu, Cd, Pb, Ni and Cr in some Slovenian foodstuffs. *Eur Food Res Technol* (2003) **217**,211–214
- MILHAUD G., VASSAL L., FEDERSPIEL B., DELACROIX- BUCHET A., MEHENNAOUI S., CHARLES E., ENRIQUEZ B., KOLF-CLAUW M. Devenir du cadmium du lait de brebis dans la crème et les caillés présure ou lactique, *Lait* (1998) **78**, 689–698
- MILHAUD G.E., DELACROIX-BUCHET A., HAN M., MEHENNAOUI S., DUCHE A., ENRIQUEZ B., KOLF-CLAUW M. Devenir du cadmium du lait de chèvre dans la crème et les caillés présure et lactique, *Lait* (2000) **80**, 277-288
- MINH NGUYEN HUNG, MASAYUKI SOMEYA, TU BINH MINH, TATSUYA KUNISUE, HISATO IWATA, MAFUMI WATANABE, SHINSUKE TANABE, PHAM HUNG VIET, BUI CACH TUYEN. Persistent organochlorine residues in human breast milk from Hanoi and Hochiminh city, Vietnam: contamination, accumulation kinetics and risk assessment for infants. *Environmental Pollution* (2004) **129**, 431–441
- Munier R. L. Principes des méthodes chromatographiques. AZOULAY, Paris (1972).
- NEWSOME W. HARVEY, DAVID DAVIES, AND JOSÉE DOUCET. PCB AND ORGANOCHLORINE Pesticides IN CANADIAN HUMAN MILK-1992. *Chemosphere* (1995) **30** (11),2143-2153
- NEWSOME W.H., DAVIES D. J. and SUN W.F Residues of polychlorinated biphenyls (PCB) in fatty foods of the Canadian diet. *Food Additives and Contaminants* (1998) **15** (1), 19-29
- NEWSOME W.HARVEY AND DAVID DAVIES. DETERMINATION OF PCB METABOLITES IN CANADIAN HUMAN MILK. *Chemosphere* (1996) **33** (3), 559-565
- NORÉN KOIDU, DAIVA MEIRONYT. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. *Chemosphere* (2000) **40**, 1111-1123
- OHTA M., OSHIMA S., IWASA T., OSAWA N., KUMATORIYA K., YAMAZAKI A., TAKASUGA T., MATSUSHITA M., UMEDZU N. Formation of PCDDs and PCDFs during the combustion of polyvinylidene chloride. *Chemosphere* (2001) **44**, 1389-1394
- OSKARSSON A., HALLEN I. P., SUNDBERG J. and GRAWE K. P. Risk assessment in relation to neonatal metal exposure. *Analyst* (1998) **123**, 19-23
- PAPADOPOULOS ATHANASIOS, IRENE VASSILIADOU, DANAE COSTOPOULOU, CHRISTINA PAPANICOLAOU, LEONDIOS LEONDIADIS. Levels of dioxins and dioxin-like PCBs in food samples on the Greek market. *Chemosphere* (2004) **57**, 413–419
- PAUMGARTTEN FRANCISCO J. R., CRISTINAM. CRUZ, IBRAHIM CHAHOUD, RICHARD PALAVINSKAS, AND WOLFGANG MATHAR. PCDDs, PCDFs, PCBs,



- and Other Organochlorine compounds in Human Milk from Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Research Section A* (2000) **83**, 293-297
- PIRARD C., FOCANT J.-F., PAUW E. An improved clean-up strategy for simultaneous analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD), polychlorinated dibenzofurans (PCDF), and polychlorinated biphenyls (PCB) in fatty food samples. *Anal Bioanal Chem* (2002) **372**, 373-381
- PITARCH E., SERRANO R., LOPEZ F. J., HERNANDEZ F. Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* (2003) **376**, 189-197
- PLOCKINGER B., ULM M. R., GOLASZEWSKI T., MEISINGER V., SUZIN J., GRUDZINSKA M., ZDZIENNICKI A., DADAK C. Lead, mercury, and cadmium exposure of neonates in Poland compared to Austria and other European countries. *Trace elements and electrolytes* (1996), **13** (1), 22-25
- POLDER A., J.O. ODLAND, A. TKACHEV, S. FØREID, T.N. SAVINOVA, J.U. SKAARE. Geographic variation of chlorinated pesticides, toxaphenes and PCBs in human milk from sub-arctic and arctic locations in Russia. *The Science of the Total Environment* (2003) **306**, 179-195
- POLDER ANUSCHKA, GEORG BECHER, TATJANA N. SAVINOVA AND JANNECHE UTNE SKAARELY. Dioxins, PCBs and some Chlorinated Pesticides in Human Milk from the Kola Peninsula, Russia. *Chemosphere* (1998) **37** (9- 12), 1795-1806
- PORTIER C. Risk ranges for various endpoints following exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Food Additives and Contaminants* (2000) **17** (4), 335-346
- QUEIROLO F., VALENTA P., STEGEN S., BRECKL S.-W. Heavy metal concentrations in oak wood growth rings from the Taunus (Federal Republic of Germany) and the Valdivia (Chili) regions. *Trees*(Berlin, West) (1990) **4** (2), 81-87
- RAMONAITYTE D.T. Copper, zinc, tin and lead in canned evaporated milk, produced in Lithuania : the initial content and its change at storage. *Food Additives and Contaminants* (2001) **18** (1), 31-37
- RAMONAITYTE DANUTE TERESE. Copper, zinc, tin and lead in canned evaporated milk, produced in Lithuania : the initial content and its change at storage. *Food additives and contaminants* (2001) **18** (1), 31-37
- RAMOS L. , L.M. HERNANDEZ, M.J. GONZALEZ. Study of the distribution of the polychlorinated biphenyls in the milk fat globule by supercritical fluid extraction. *Chemosphere* (2000) **41**, 881-888
- RAMOS L., E. ELJARRAT , L.M. HERNTINDEZ, J. RIVERA AND M.J. GONZTILEZ. COMPARATIVE STUDY OF METHODOLOGIES FOR THE ANALYSIS OF PCDDs AND PCDFs IN POWDERED FULL-FAT MILK. PCB, PCDD AND PCDF LEVELS IN COMMERCIAL SAMPLES FROM SPAIN. *Chemosphere* (1999) **38** (11) , 2577-2589
- RAMOS L., E. ELJARRAT, L.M. HERNÁNDEZ, J. RIVERA, M.J. GONZÁLEZ. Levels of polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in commercial yoghurt samples in Spain Comparison with different dairy products. *Analytica Chimica Acta* (1999) **402**, 241-252

- RAMOS L., M. TORRE, F. LABORDA, M.L. MARINA. Determination of polychlorinated biphenyls in soybean infant formulas by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* (1998) **823**, 365–372
- RAMOS L., M. TORRE, M.L. MARINA. Gas chromatography determination of polychlorinated biphenyls in powdered and liquid soybean milks. *Journal of Chromatography A* (1998) **815**, 272–277
- RENNER, E. Milk and dairy products in human nutrition. Volkswirtschaftlicher Verlag, München (1983), pp. 450
- RENNER, E. Micronutrients in milk and milk-based food products. Elsevier Applied Science, London (1989), pp. 311
- ROBIN J. – coordonnateur. Introduction aux méthodes électrochimiques. MASSON et Cie, Paris (1967)
- RODRIGUEZ RODRIGUEZ E.M., E. DELGADO URETRA, C. DIAZ ROMERO. Concentrations of cadmium and lead in different types of milk. *Z Lebensm Unters Forsch A* (1999) **208**, 162–168
- ROSSIPAL E. AND KRACHLER M. Pattern of trace elements in human milk during the course of lactation. *Nutrition Research* (1998) **18** (1), 11-24
- RUANGWISES N., RUANGWISES S. Heavy metals in green mussels (*Perna viridis*) from the Gulf of Thailand. *Journal of Food Protection* (1998) **61** (1), 94-97
- RYAN J. J., LIZOTTE R., PANOPIO L. G., SHEWCHUK C., LEWIS D. A. and SUN WING F. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in human milk samples collected across Canada in 1986-87. *Food Additives and Contaminants* (1993) **10** (4), 419-428
- SAITO KOICHI, MASAHIKO OGAWA, MIKIKO TAKEKUMA, ATSUKO OHMURA, MIGAKU KAWAGUCHI, RIE ITO, KOICHI INOUE, YASUHIKO MATSUKI, HIROYUKI NAKAZAWA. Systematic analysis and overall toxicity evaluation of dioxins and hexachlorobenzene in human milk. *Chemosphere* (2005) **61**, 1215–1220
- SANTILLO D., FERNANDES A., STRINGER R., ALCOCK R., ROSE M., WHITE S., JONES K., and JOHNSTON P. Butter as an indicator of regional persistent organic pollutant contamination : further development of the approach using polychlorinated dioxins and furans (PCDD/Fs), and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs). *Food Additives and Contaminants* (2003) **20** (3), 281-290
- SANTOS E. E., LAURIA D. C. AND PORTO DA SILVEIRA C. L. Assessment of daily intake of trace elements due to consumption of foodstuffs by adult inhabitants of Rio de Janeiro City. *Science of the Total Environment* (2004) **327**, 69-79
- SASAMOTO TAKEO, FUSAO USHIO, NORIHISA KIKUTANI, YUKI SAITOH, YUMIKO YAMAKI, TSUNEO HASHIMOTO, SHOZO HORII, JUN-ICHI NAKAGAWA, AKIHIRO IBE. Estimation of 1999–2004 dietary daily intake of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs by a total diet study in metropolitan Tokyo, Japan. *Chemosphere* (2006) **64**, 634–641
- Sasamoto Takeo, Horii Shozo, Ibe Akihiro, Takada Naoko and Shirota Kinji. Concentration changes of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in human breast milk samples as shown by a follow-up survey. *Chemosphere* (2006) **64** (4), 642-649

- SCHECTER A. J., OLSON J., PAPKE O. Exposure of laboratory animals to polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans from commercial rodent chow. *Chemosphere* (1996) **32** (3), 501-508
- SCHECTER A., I. KASSI AND O. PAPKE. PARTITIONING OF DIOXINS, DIBENZOFURANS, AND COPLANAR PCBS IN BLOOD, MILK, ADIPOSE TISSUE, PLACENTA AND CORD BLOOD FROM FIVE AMERICAN WOMEN. *Chemosphere* (1998) **37** (9-12), 1817-1823
- SCHECTER A., OLSON J. R. Cancer Risk Assessment Using Blood Dioxin Levels and Daily Dietary TEQ Intake in General Populations of Industrial and Non-Industrial Countries. *Chemosphere* (1997) **34** (5-7), 1569-1577
- SCHECTER A., PAPKE O., BALL M., HOANG D. C., LE C. D., NGUYEN Q. M., HOANG T. Q., NGUYEN N. T. P., PHAM H. P., HUYNH K.C., DIEU T. V., CONSTABLE J. D., SPENCER J. Dioxin and Dibenzofuran levels in Blood and Adipose Tissue of Vietnamese from Various Locations in Vietnam in Proximity to Agent Orange Spraying. *Chemosphere* (1992) **25** (7-10), 1123-1128
- SCHECTER A., PISKAC A. L., GROSHEVA E.I., MATOROVA N. I., RYAN J. J., FURST P., PAPKE O., ADIBI J., PAVUK M., SILVER A., GHAFFAR S. Levels of dioxins and dibenzofurans in breast milk of women residing in two cities in the Irkutsk region of Russian Siberia compared with American levels. *Chemosphere* (2002) **47**, 157-164
- SCHECTER ARNOLD, JOHN JAKE RYAN, OLAF PAPKE. DECREASE IN LEVELS AND BODY BURDEN OF DIOXINS, DIBENZOFURANS, PCBS, DDE, AND HCB IN BLOOD AND MILK IN A MOTHER NURSING TWINS OVER A THIRTY-EIGHT MONTH PERIOD. *Chemosphere* (1998) **31** (9-12), 1807-1816
- SEWART A. AND K. C. JONES. A survey of PCB congeners in U.K. cows' milk. *Chemosphere* (1996) (32) (12), 2481-2492
- SHE J., M.X. PETREAS, P. VISITA, M. MCKINNEY, F. J. SY, J.J. WINKLER, K. HOOPER AND R.D. STEPHENS. CONGENER-SPECIFIC ANALYSIS OF PCBs IN HUMAN MILK FROM KAZAKHSTAN. *Chemosphere* (1998) **31** (3), 431-442
- SIKIRIC M., BRAJENOVIC N., PAVLOVIC I., HAVRANEK J.L., PLAVLJANIC N. Determination of metals in cow's milk by flame atomic absorption spectrophotometry. *Czech J. Anim. Sci.* (2003) **48** (11), 481-486
- SISAK M., M. FRANEK, K. HRUSKA. Application of radioimmunoassay in the screening of polychlorinated biphenyls in cow's milk. *Analytica Chimica Acta* (1995) **311**, 415-422
- SLOB W., M. OILING, H.J.G.M. DERKS, A.P.J.M. DE JONG. CONGENER-SPECIFIC BIOAVAILABILITY OF PCDD/Fs AND COPLANAR PCBs IN COWS : LABORATORY AND FIELD MEASUREMENTS. *Chemosphere* (1995) **31** (8), 3827-3838
- SOECHITRAM S. D., CHAN S. M., NELSON E. A. S., BROUWER A., and SAUER P. J. J. Comparison of dioxin and PCB concentrations in human breast milk samples from Hong Kong and the Netherlands. *Food Additives and Contaminants* (2003) **20** (1), 65-69

- STEVENS J.B. Disposition of toxic metals in the agricultural food chain.I, Steady-State bovine milk biotransfer factors. *Environmental Science & Technolog* (1991) **25** (7), 1289-1294
- SUDARYANTO AGUS, TATSUYA KUNISUE, NATSUKO KAJIWARA, HISATO IWATA, TUSSY A. ADIBROTO, PHILLIPUS HARTONO, SHINSUKE TANABE. Specific accumulation of organochlorines in human breast milk from Indonesia: Levels, distribution, accumulation kinetics and infant health risk. *Environmental Pollution* (2006) **139**, 107-117
- SWARUP D., DWIVEDI S. K. and DEY S. Lead and cadmium levels in blood and milk of cows from Kanpur city. *Indian Journal of Animal Sciences* (1997) **67** (3), 222-223
- SZYRWINSKA KATARZYNA , JANINA LULEK. Exposure to specific polychlorinated biphenyls and some chlorinated pesticides via breast milk in Poland. *Chemosphere* (2007) **66**, 1895–1903
- TAHVONEN R., KUMPULAINEN J. Lead and cadmium contents in milk, cheese and eggs on the finnish market. *Food Additives and Contaminants* (1995) **12** (6), 789-798
- TAJIMI M., R. UEHARA, M. WATANABE, I. OKI, T. OJIMA, Y. NAKAMURA. Correlation coefficients between the dioxin levels in mother s milk and the distances to the nearest waste incinerator which was the largest source of dioxins from each mother s place of residence in Tokyo, Japan. *Chemosphere* (2005) **61**, 1256–1262
- Takekuma Mikiko, Saito Koichi, Ogawa Masahiko, Matumoto Ryuji and Kobayashi Susumu. Levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in human milk in Saitama, Japan, and epidemiological research. *Chemosphere* (2004) **54** (1), 127-135
- TRANCHANT J. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, 4ème édition, MASSON, Paris (1995)
- TRIPATHI R. M., RAGHUNATH R., SASTRY V. N., KRISHNAMOORTHY T. M. Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. *The Science of the Total Environment* (1999) **227**, 229-235
- Uehara Ritei, Guan Peng, Nakamura Yosikazu, Matsuura Nobuo, Kondo Naomi and Tada Hiroshi. Human milk survey for dioxins in the general population in Japan *Chemosphere* (2006) **62** (7), 1135-1141
- URSINYOVA MONIKA AND VLASTA MASANOVA. Cadmium, lead and mercury in human milk from Slovakia. *Food Additives & Contaminants* (2005) **22** (6), 579-589
- VARTIAINEN TERTTU, SEPPO SAARIKOSKI, JOUNI J. JAAKKOLA, AND JOUKO TUOMISTO. PCDD, PCDF, AND PCB CONCENTRATIONS IN HUMAN MILK FROM TWO AREAS IN FINLAND. *Chemosphere* (1997) **34** (12), 2571-2583
- VAZ R. Average Swedish dietary intakes of organochlorine contaminants via foods of animal origin and their relation to levels in human milk, 1975-90. *Food Additives and Contaminants* (1995) **12** (4), 543-558
- VAZ R., SLORACH S. A. and HOFVANDER Y. Organochlorine contaminants in Swedish human milk : studies conducted at the National Food Administration 1981-1990. *Food Additives and Contaminants* (1993) **10** (4), 407-418
- VRECL MILKA, MATJAZ URSIC, AZRA POGACNIK, LUCIJA ZUPANCIC-KRALJ, JANJA JAN. Excretion pattern of co-planar and non-planar tetra- and hexa-

- chlorobiphenyls in ovine milk and faeces. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2005) **204**,170– 174
- Wang Shu-Li, Lin Chin-Yu, Guo Yueliang Leon, Lin Long-Yau, Chou Wei-Ling and Chang Louis W. Infant exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls (PCDD/Fs, PCBs)—correlation between prenatal and postnatal exposure *Chemosphere* (2004) **54** (10), 1459-1473
- WALISZEWSKI S. M., PARDIO S. V. T. , WALISZEWSKI K. K. N., CHANTIRI P. J. N., INFANRON R. R. Ma., RIVERA J. Detection of some organochlorine pesticides in cow's milk. *Food Additives and Contaminants* (1996) **13** (2), 231-235
- WEIGERT P., GILBERT J, PATEY A. L., KEY P. E., WOOD R., BARYLKO-PIKIELNA N. Analytical quality assurance for the WHO gems/food-Euro Programme—results of 1993/94 Laboratory proficiency Testing. *Food Additives and Contaminants* (1997) **14** (4), 399-410
- WUTHE J., HAGENMAIER H., PAPKE O., KETTMANN C., FROMMBERGER R. and LILLICH W. Dioxin and Furan (PCDD/PCDF) Levels in Human Blood and Human Milk of People Living in a PCDD/PCDF Contaminated Area. *Chemosphere* (1992) **25** (7-10), 1135-1140
- YANG JIYEON, DONGCHUN SHIN, SOUNGEUN PARK, YOONSEOK CHANG, DONGHYUN KIM, MICHAEL G. IKONOMOU. PCDDs, PCDFs, and PCBs concentrations in breast milk from two areas in Korea: body burden of mothers and implications for feeding infants. *Chemosphere* (2002) **46**, 419–428
- YANG YOON-HEE, YOON-SEOK CHANG, BYUNG-HOON KIM, DONG-CHUN SHIN, MICHAEL G. IKONOMOU. Congener-distribution patterns and risk assessment of polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in Korean human milk. *Chemosphere* (2002) **47**, 1087–1095
- YU ZHIWEI, LUBICA PALKOVICOVA , BEATA DROBNA , JAN PETRIK , ANTON KOCAN ,TOMAS TRNOVEC , IRVA HERTZ-PICCIOTTO. Comparison of organochlorine compound concentrations in colostrum and mature milk. *Chemosphere* (2007) **66**, 1012–1018
- ZWEIG G. and SHERMA J. *Gas Chromatographic Analysis*, Vol. IV, ACADEMIC PRESS, New York (1972).
- [http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/CHIM/Jumber/CPG/chromato\\_gaz.htm](http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/CHIM/Jumber/CPG/chromato_gaz.htm)

# **Annexes**

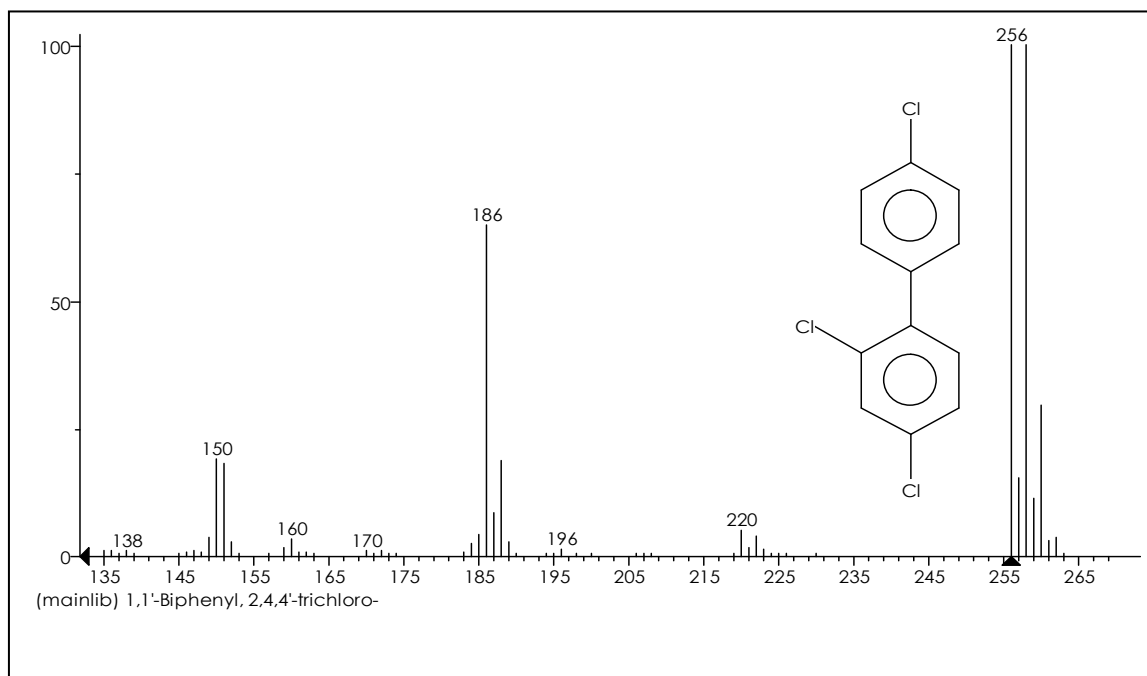
# ANNEXES

## ANNEXE 1 : IDENTIFICATION

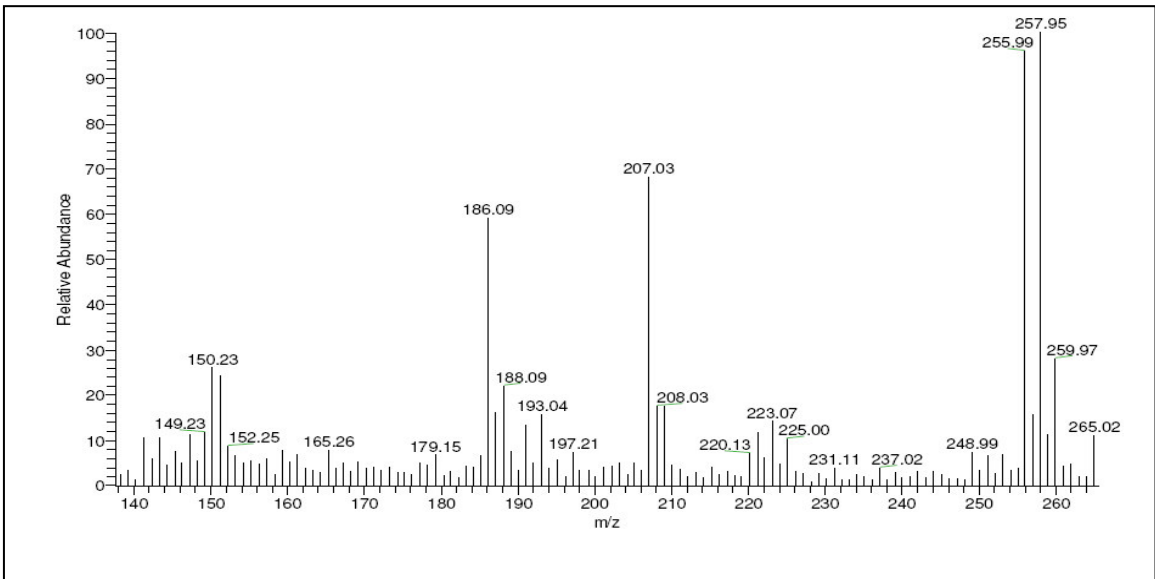
L'identification des dioxines et PCBs est validée si les résultats de la GC-MS satisfont aux critères suivants :

- Le signal obtenu pour chacun des deux ions choisis, ou la somme des deux ions de chacun des composés, doit être au moins trois fois plus élevé que le bruit de fond (rapport signal/bruit > 3) ;
- Le rapport isotopique des ions choisis ne doit pas s'écarter de plus de 15 % du rapport obtenu pour le composé correspondant dans la solution étalon ou du rapport isotopique calculé théoriquement.
- Les temps de rétention des deux ions de quantification coïncident à 3 secondes près.
- Les temps de rétention des dioxines et PCBs naturels coïncident à 2 secondes près avec le temps de rétention du même isomère marqué (normalement, le temps de rétention de l'isomère marqué est inférieur de 1 à 2 secondes à celui de la molécule non marquée).

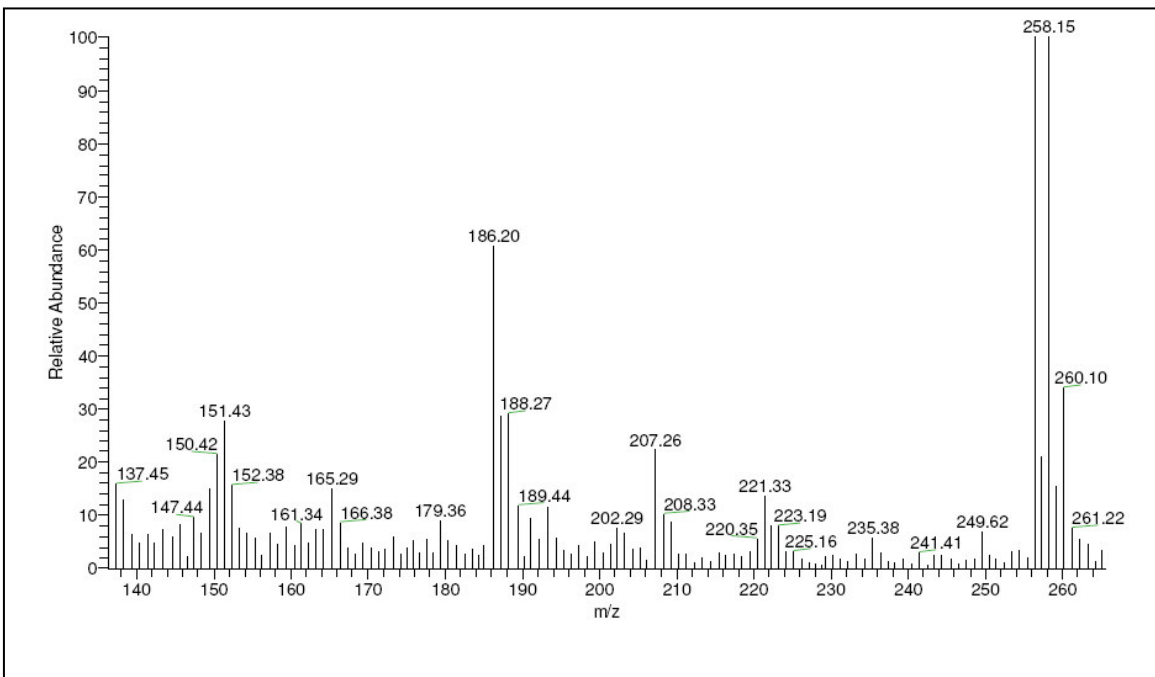
Un exemple d'identification est présenté sur **les figures 24, 25 et 26**.



**Figure 24 : Spectre de masse du 2,4,4'-trichlorobiphényle (PCB-28) dans la bibliothèque de spectre**



**Figure 25 : Spectre de masse du standard 2,4,4'-trichlorobiphényle (PCB-28)**

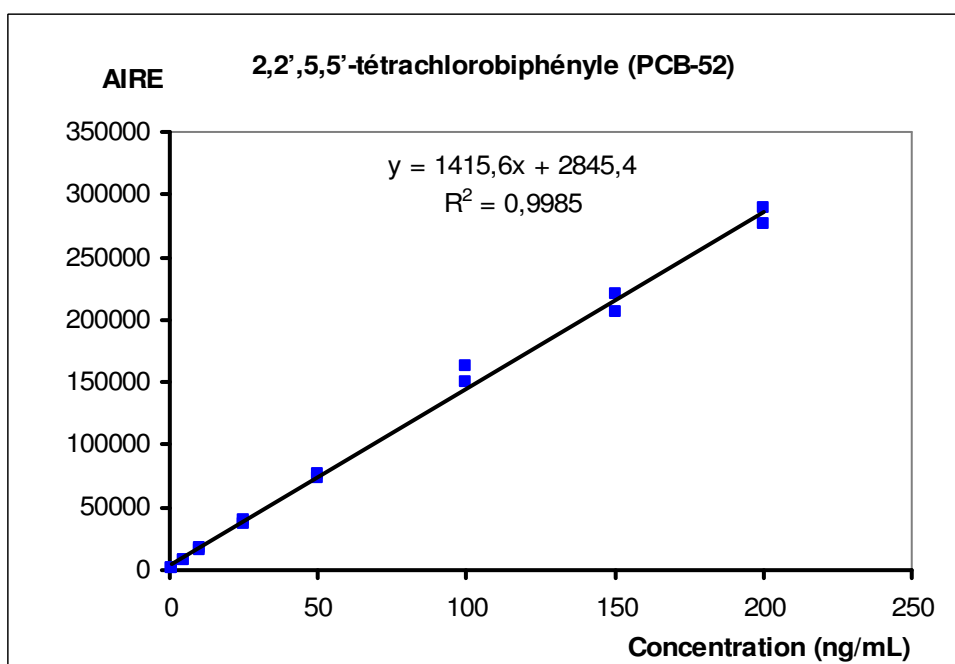
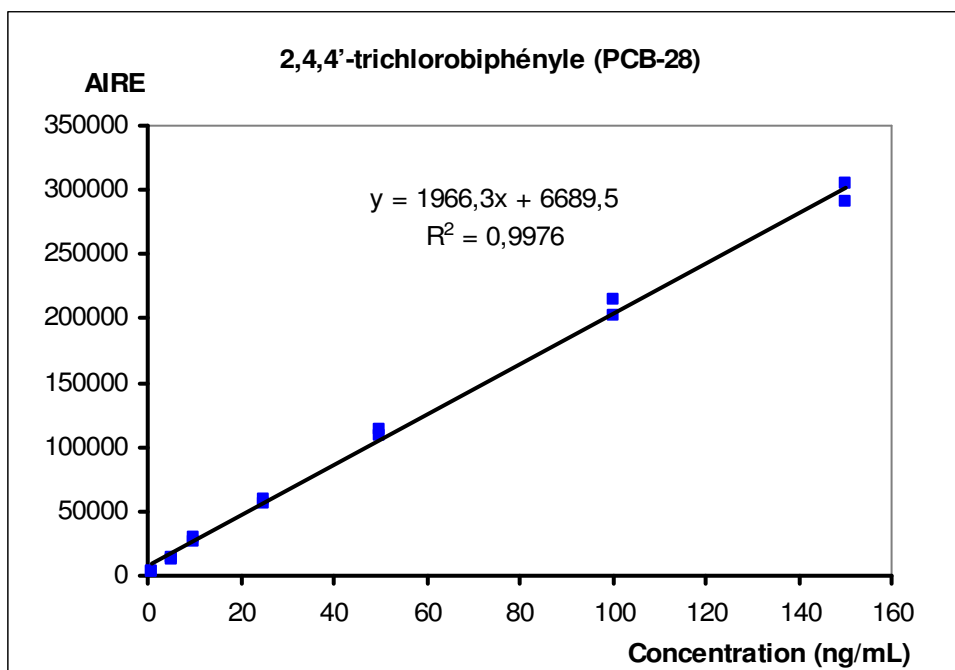


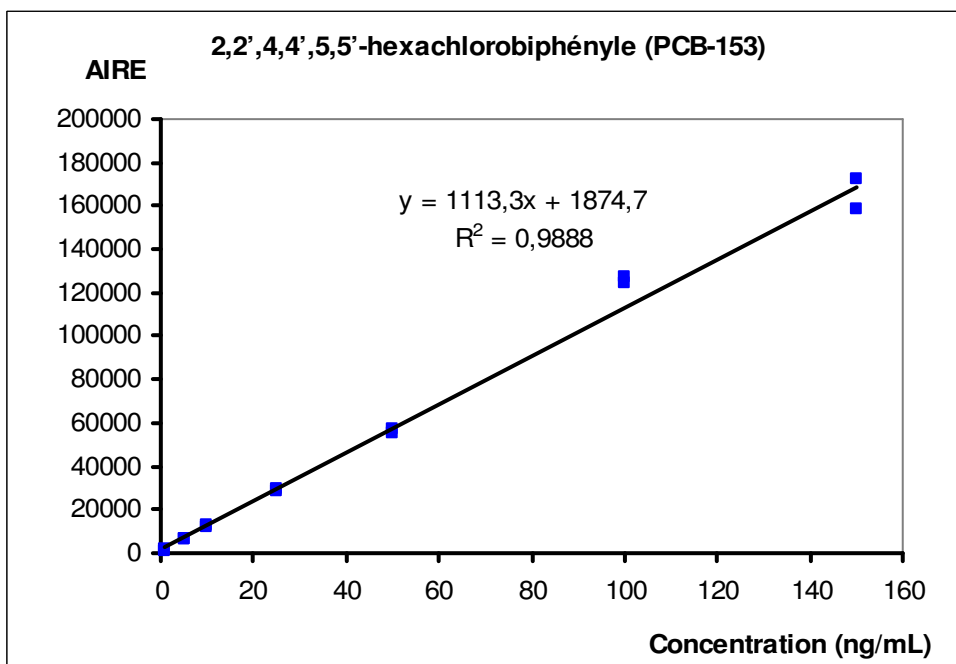
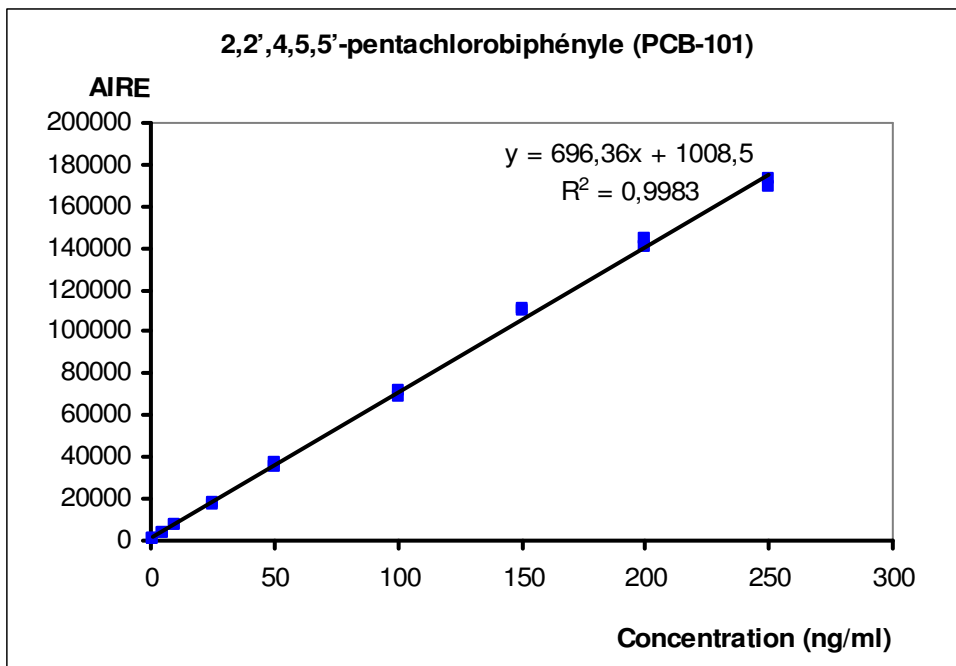
**Figure 26 : Spectre de masse du 2,4,4'-trichlorobiphényle (PCB-28) dans l'échantillon de lait N°2**

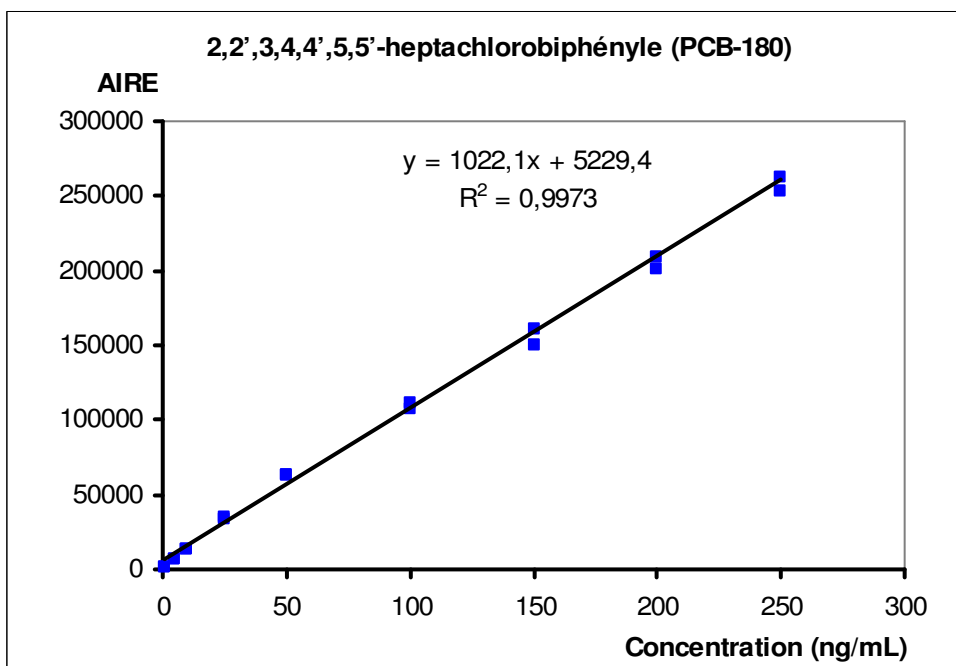
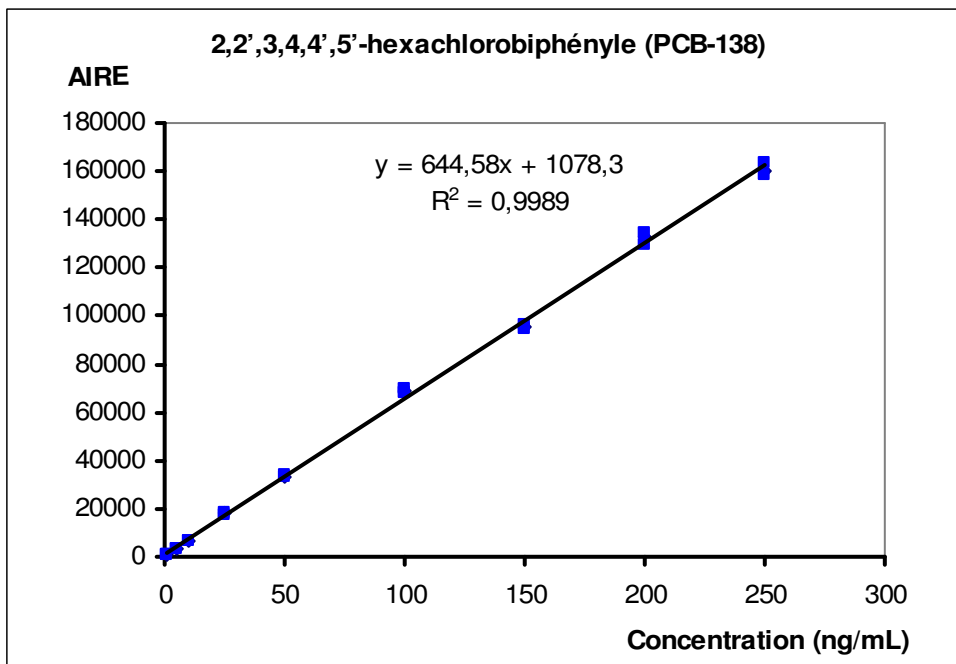


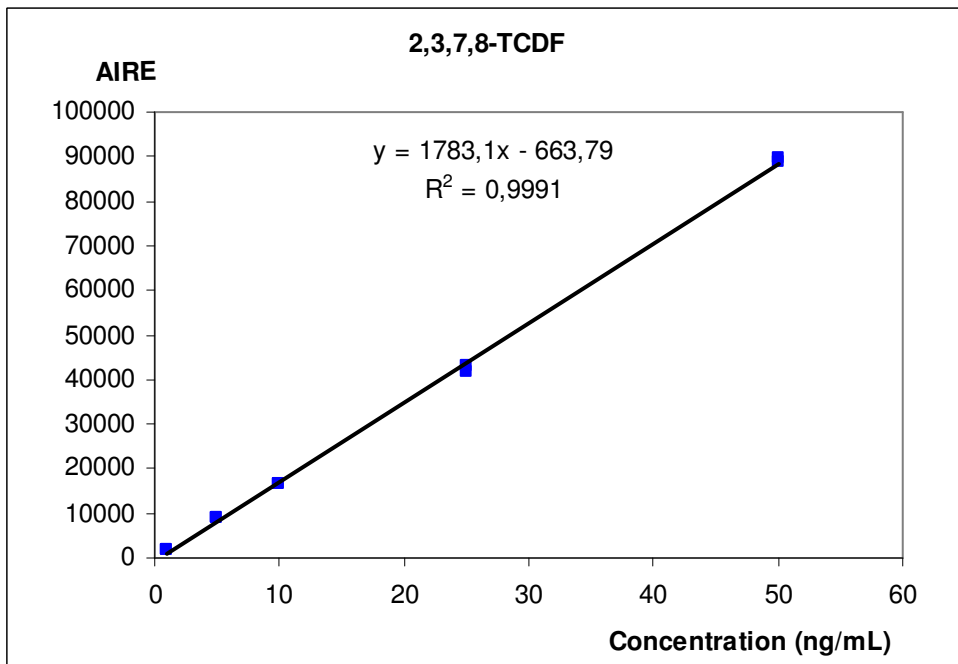
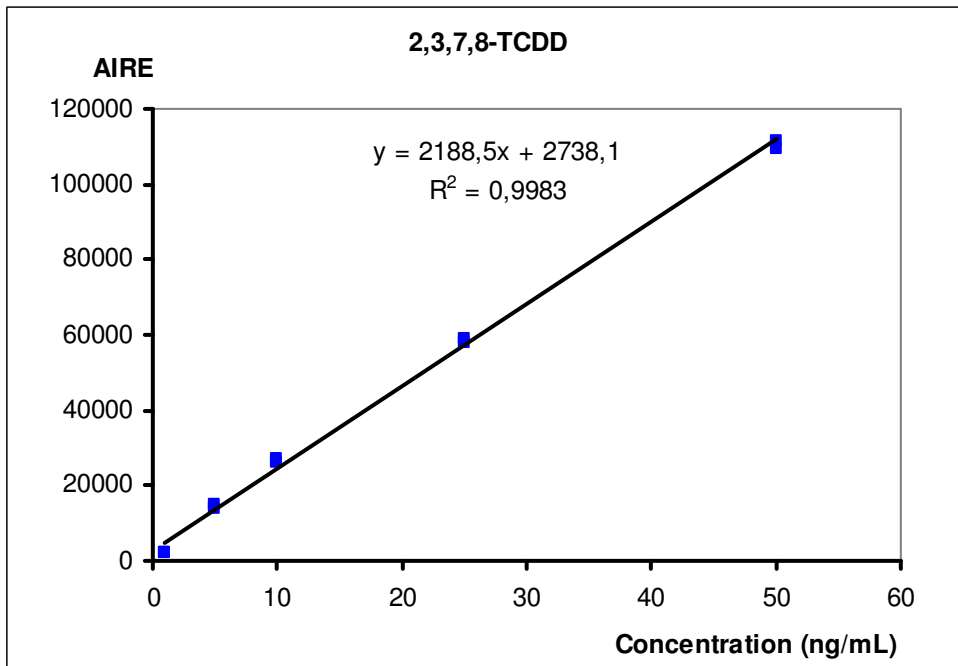
## ANNEXE 2 : QUANTIFICATION

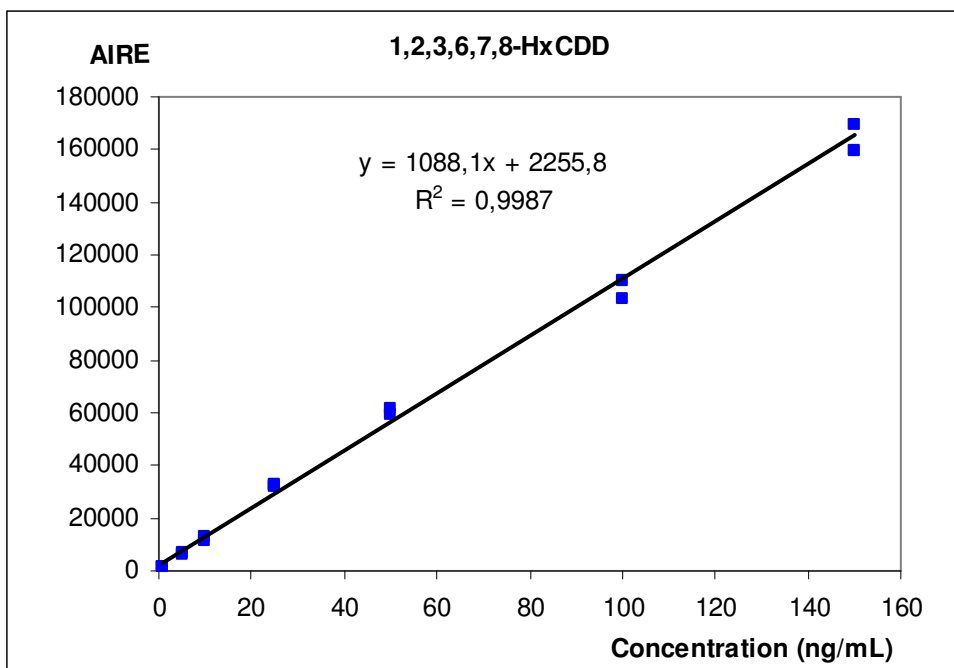
L'analyse quantitative des dioxines et des PCBs est effectuée grâce à l'aire des pics chromatographiques et à l'utilisation de la méthode d'étalonnage externe. Chaque étalon a été analysé deux fois, et la linéarité des courbes d'étalonnage vérifiée dans l'intervalle de concentrations étudié ( $R^2 > 0,99$ ). La validité des courbes d'étalonnage a été vérifiée quotidiennement par analyse d'étalons. Les courbes d'étalonnage externe des dioxines et des PCBs sont données dans les graphes de cette annexe :











### ANNEXE 3 : CHROMATOGRAMMES OBTENUS POUR L'ECHANTILLON DE LAIT

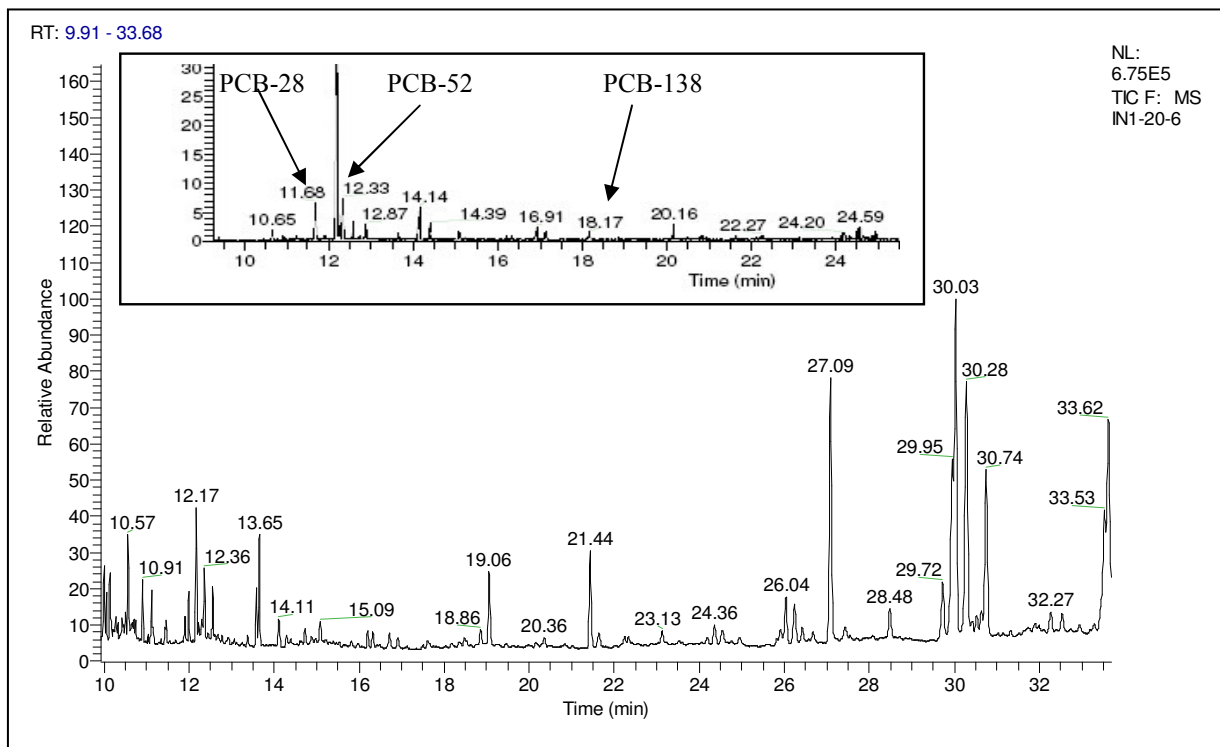
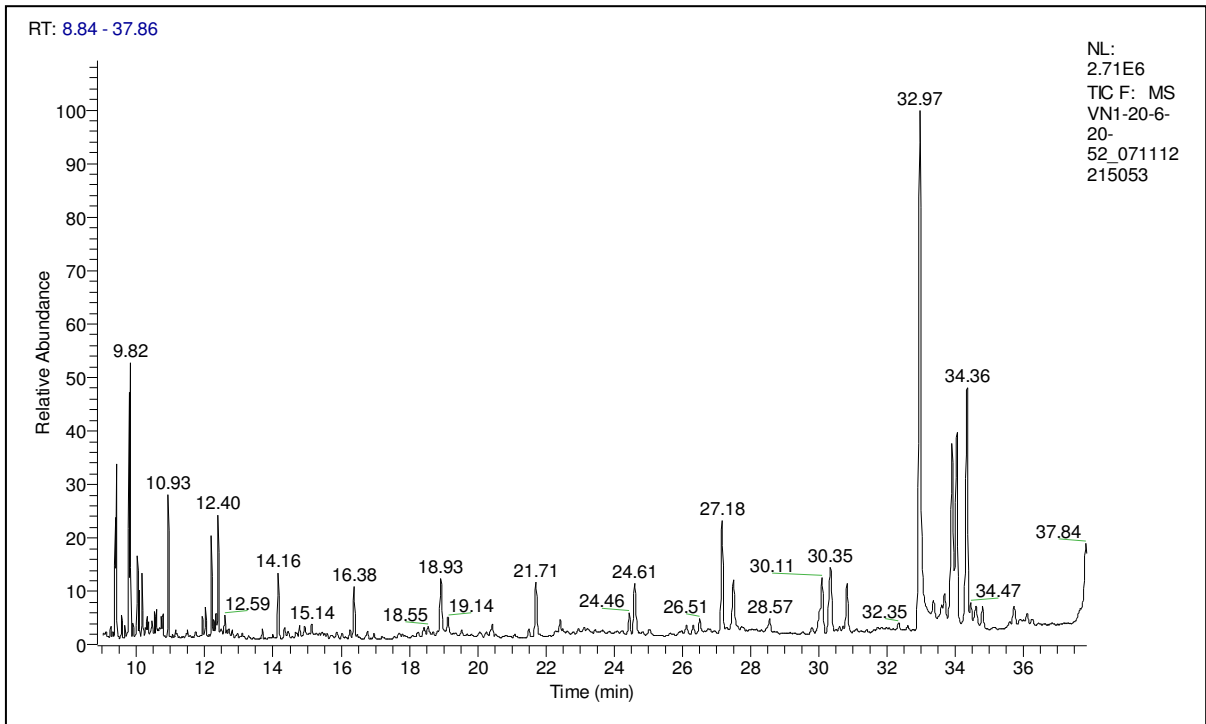
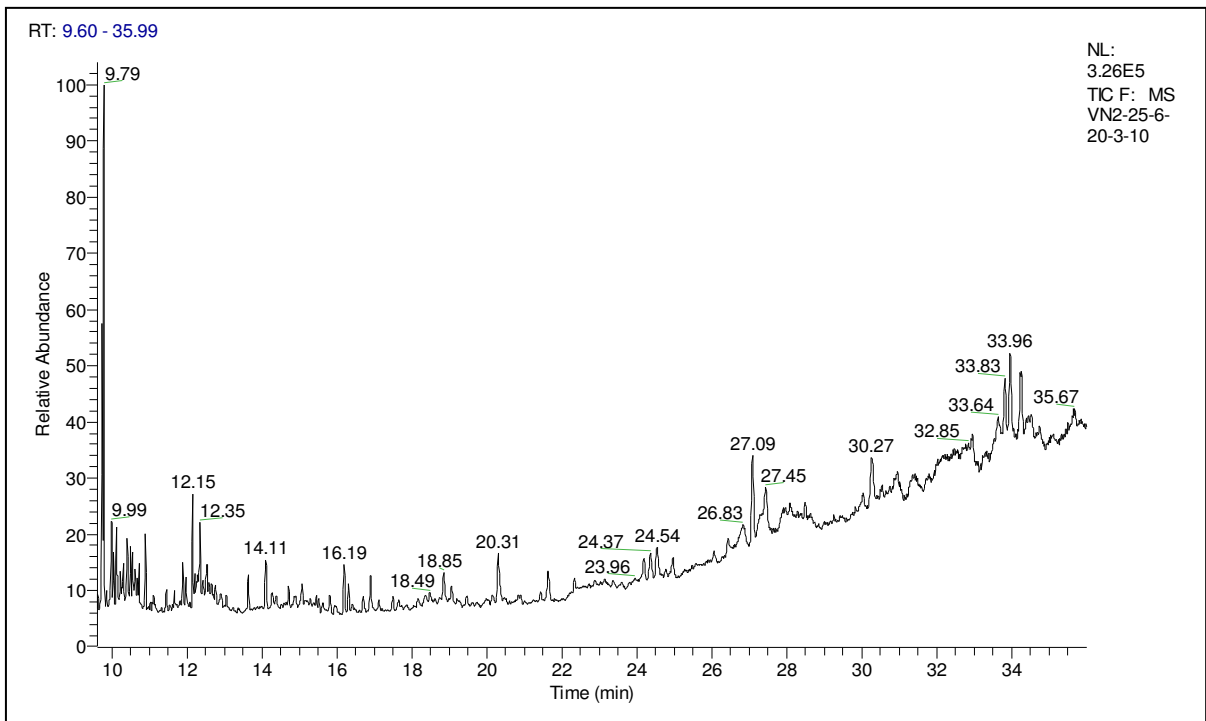


Figure 27 : Chromatogrammes obtenus pour l'échantillon de lait 1



**Figure 28 : Chromatogrammes obtenus pour l'échantillon de lait 2**



**Figure 29 : Chromatogrammes obtenus pour l'échantillon de lait 3**