

Résidus et contaminants des denrées alimentaires :
25 ans de progrès dans leur analyse

III. MÉTHODES DE CONFIRMATION BASÉES SUR
LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

DE BRABANDER H.F.¹, MAGHUIN-ROGISTER G.²

1. Interfaculty Centre of Excellence for Food Science, Nutrition and Health, Research Group Veterinary Public Health and Zoonoses, Veterinary Public Health & Food Safety – Lab. Chemical Analysis, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan, 133, 9820 Merelbeke

2. Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires (LADA)
Centre d'Analyse des Résidus en Traces (CART), Département des Sciences des Denrées alimentaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20 - bât. B43b, 4000 Liège

Texte d'une conférence donnée le 11 mai 2005 dans le cadre de la célébration des 25 ans d'existence du Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires, de l'Université de Liège. Les diapositives des exposés sont disponibles sur le site de la section Wallonie-Bruxelles de la WAVFH (World Association of Veterinary Food Hygienists) : <http://www.wavfh.ulg.ac.be/>

Correspondance : Prof. G. Maghuin-Rogister Email : G.Maghuin@ulg.ac.be

RESUME : Les techniques d'analyse ont considérablement évolué depuis une vingtaine d'années grâce à l'apparition d'équipements nouveaux, financièrement accessibles à d'avantage de laboratoires ce qui a permis d'augmenter le nombre de substances sous surveillance et d'abaisser de plus en plus les limites de détection. Les techniques de chromatographie liquide en particulier deviennent de plus en plus performantes et on peut espérer disposer dans un proche avenir de méthodes LC-MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) particulièrement performantes et respectueuses de l'environnement. En contre partie des progrès réalisés par les chimistes au niveau des performances des méthodes analytiques, d'autres chimistes mettent au point des traitements indétectables, ce qui permet aux fraudeurs d'échapper au contrôle. Avec les techniques d'analyse par spectrométrie de masse multiple si on ne connaît pas à l'avance la molécule à surveiller, on ne « voit » plus rien. Il faut donc se tourner vers d'autres méthodes comme les méthodes biologiques afin de détecter une activité hormonale ou toxique. Cette évolution sur le plan analytique n'est pas sans conséquence au niveau des services d'inspection. Il revient aux services de contrôle de définir les règles d'interprétation des résultats analytiques afin de guider la prise de décision quant à la conformité des échantillons examinés par rapport à la législation. Enfin, l'autorité compétente doit tenir compte de l'évolution de la situation en matière de résidus et de contaminants des denrées alimentaires en adaptant ses prises de décision à propos de la conformité ou non d'un produit

EVOLUTION DES LIMITES DE DÉTECTION

L'amélioration continue des techniques analytiques depuis les années '70 permet d'abaisser de plus en plus les limites de détection. De nos jours, les concentrations en résidus et contaminants sont le plus souvent exprimées en ppm (part par million), ppb (part par billion américain c'est-à-dire milliard français), ppt (part par trillion) ou encore en nanomoles (10^{-9}), picomoles (10^{-12}), femtomoles (10^{-15}), attomoles (10^{-18}) et probablement demain zeptomoles (10^{-21}) voire yoc-tomoles (10^{-24}). Ainsi, rien que dans les techniques de spectrométrie, on est passé en GC-MS (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) d'une valeur de spécification pour la limite de détection (avec un rapport signal sur bruit = 3) pour un composé de référence, la décafluorobenzophénone, de 30.000 femto-grammes (fg) en 1989 à 200 fg en 2003, soit un gain de 100 fois et pour la LC-MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) de 15.000 fg à 11 fg c'est-à-dire un facteur 1000 ! En extrapolant ces performances, on peut prévoir qu'en 2010, on pourrait détecter 100 attogrammes (ag). Si on se rappelle que, d'après la définition du nombre d'Avogadro ($N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$ molécules par mole), si 248,42 g de testostérone correspondent à $6,023 \cdot 10^{23}$ molécules, 100 ag correspondent à 200.000 molécules. Or il est probable qu'au cours de ce siècle, des techniques analytiques (exemple : ATTA : *Atom Trap Trace Analysis*) (Hoekstra, 2005) permettront de détecter une molécule de « résidu » ou de « contaminant » dans 1 litre de solution. Dans cette situation, on devra s'interroger sur la fiabilité d'un résultat d'analyse qui serait entièrement dépendant de la probabilité de prélever ou non, lors de la prise d'essais en vue de l'analyse, cette molécule présente dans un litre de solution d'extrait d'échantillon.

EVOLUTION DES TECHNIQUES D'ANALYSE

Les techniques de chromatographie liquide deviennent de plus en plus performantes grâce à la diminution de la taille des particules de

phase solide dont sont remplies les colonnes (*Ultra Performance Liquid Chromatography* : UPLC), ce qui a pour résultat d'améliorer la qualité des séparations et de réduire le temps d'analyse d'un facteur dix, ou encore grâce à l'augmentation des températures (*Ultra High Temperature*) de permettre l'amélioration des propriétés de solvant de l'eau (*Super Heated Water*) en raison de la diminution de sa constante diélectrique. En combinant ces deux dans le futur, on peut espérer disposer de méthodes LC-MS particulièrement performantes et respectueuses de l'environnement puisqu'elles utiliseraient l'eau à la place de solvants organiques toxiques.

EVOLUTION DES TECHNIQUES DE FRAUDE

En contre-partie des progrès réalisés par les chimistes au niveau des performances des méthodes analytiques, d'autres chimistes mettent au point des traitements indétectables, ce qui permet aux fraudeurs d'échapper au contrôle. Ainsi dans les années '80 alors qu'on détectait par chromatographie en couche mince (TLC : *Thin Layer Chromatography*) une série de substances identifiées douées d'activité hormonale (Verbeke, 1979), la substitution d'une hormone anabolisante connue par une hormone non encore répertoriée conduisait à l'apparition de nouvelles taches sur la plaque TLC. Il est apparu ainsi que des fraudeurs utilisaient autre chose que des hormones déjà connues. Actuellement avec les techniques d'analyse par spectrométrie de masse multiple, où on suit les ions filles provenant d'un ion parent déterminé et caractéristiques de la molécule à contrôler. Si on ne connaît pas à l'avance la molécule à surveiller, on ne « voit » plus rien. Il faut donc se tourner vers d'autres méthodes comme les méthodes biologiques afin de détecter une activité hormonale.

Un premier exemple est pris dans le monde du dopage. Aux Jeux Olympiques de Salt Lake City en 2002, les contrôleurs des douanes entre les USA et le Canada ont découvert une fiole dans la poche d'un individu. Le laboratoire des douanes a pu identifier dans cette fiole un nouvel anabolisant, la désoxyméthyltestostérone (DMT).

C'est ce qu'on appelle une « *designer drug* » synthétisée à la demande d'un athlète particulier qui peut ainsi bénéficier d'une impunité quasi certaine. La probabilité d'être pris pour usage de produits dopants étant quasi nulle avec les méthodes de contrôle traditionnelles. En effet si la substance n'est pas présente sur le marché et si la molécule standard qui permettrait l'analyse par spectrométrie de masse n'est pas disponible pour les laboratoires chargés du contrôle, il est quasiment impossible de la détecter et de l'identifier dans des échantillons soumis au contrôle.

Un autre exemple est celui de la norboléthone, une substance semblable à la tétrahydrogestrinone (THG), elle-même très proche de la trenbolone, une hormone anabolisante pour les bovins mise au point dans les années '70 et autorisée en engraissement dans certains pays (figure 1).

Le « renouvellement » d'anciennes molécules est aussi pratiqué. C'est le cas du mistyquinox. Le carbadox et l'olaquinox sont des additifs, à action promotrice de croissance, d'aliments pour porcs, mais qui ne sont plus autorisés actuellement. Il y a quelques temps, de nouveaux composés de ce type sont apparus. En particulier, le méthylolaquinox était suspecté d'être présent dans des aliments pour volailles en Espagne ou pour lapins en Italie. L'isolaquinox fut finalement identifié (figure 2).

Ces exemples sont le reflet d'un effet pervers de la recherche de nouveaux médicaments par l'industrie pharmaceutique : des milliers de molécules sont synthétisées. Un très petit nombre d'entre elles et même souvent une seule est finalement autorisée comme médicament vétérinaire ou comme *feed additive*. Les procédures de synthèse et les propriétés pharmacologiques de toutes ces molécules sont néanmoins connues, parfois par le biais de publications scientifiques. Des chimistes sans scrupules peuvent alors s'emparer de ces procédures pour produire ces molécules en grandes quantités et les écouler au marché noir à destination des producteurs d'animaux.

Autre exemple encore, celui d'analogues de testostérone. L'AIT ou

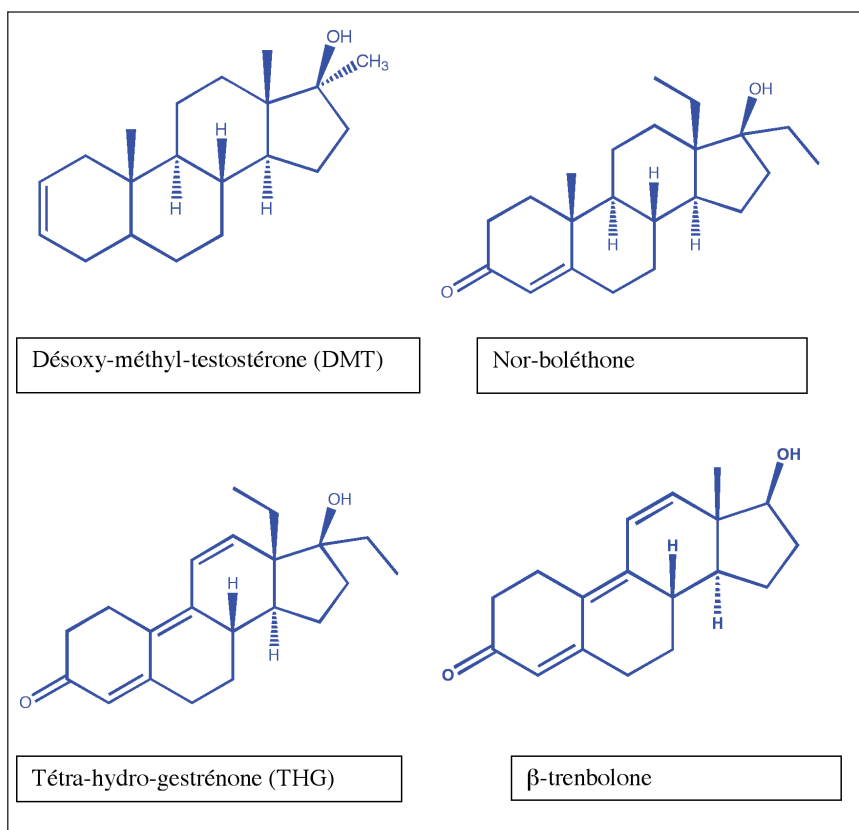


Figure 1 : formules de la désoxyméthyltestostérone (DMT), la nor-boléthone, la tétrahydrogestrinone (THG) et la trenbolone

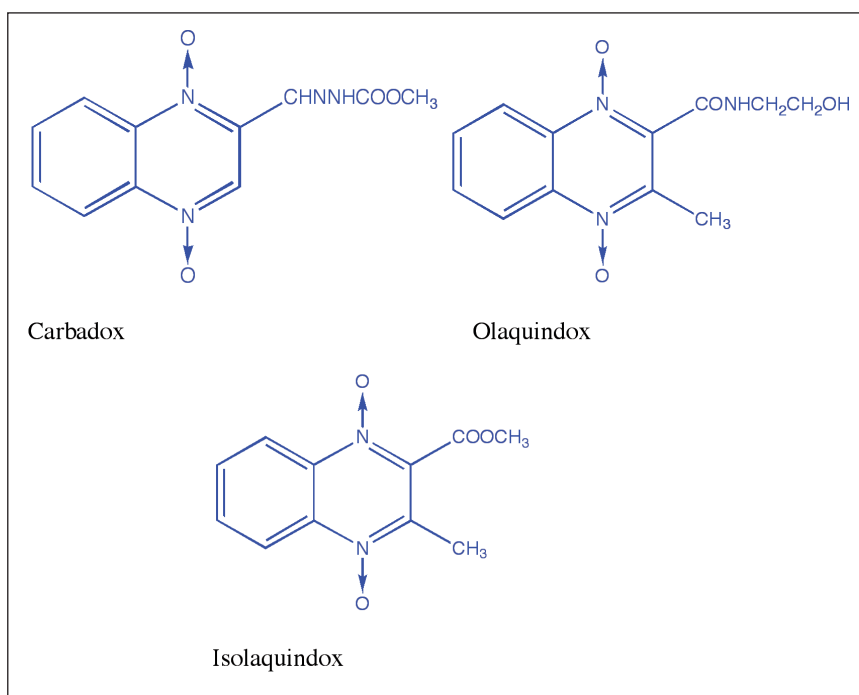


Figure 2 : formules chimiques du carbadox, olaquinox, isolaquinox

« Black Juice » contient une molécule très proche de la testostérone (figure 3). La testostérone elle-même est convertie dans l'organisme en oestradiol. Les sportifs qui prennent de la testo-

stérone en trop grande quantité risquent donc de subir les conséquences qu'on imagine pour leur intégrité de mâles. L'enzyme qui assure la conversion de la testostérone en oestradiol

n'est pas capable de catalyser cette conversion à partir d'A1T, la double liaison en position 1,2 au lieu de position 4-5 (figure 3) semble donc empêcher la transformation. Cette molécule d'A1T serait très populaire auprès des athlètes de certains pays émergents et il est possible de s'en procurer même en grandes quantités via internet. L'analyse par GC-MS de dérivés triméthylsilyl de cette substance montre que son comportement chromatographique et son spectre de masse sont similaires à ceux de la boldénone, un autre anabolisant de type androgène. Il y a donc un risque de confusion entre ces deux molécules si l'analyse est appliquée aveuglément sans pratiquer tous les contrôles requis en spectrométrie de masse en tandem. Comme la boldénone est parfois considérée comme une substance endogène (De Brabander *et al.*, 2004), la confusion avec l'A1T pourrait avoir des conséquences graves du point de vue du contrôle.

Un autres cas concerne des précurseurs qui sont convertis dans l'organisme en hormones actives : le bêta-sitostérol, un phytoestrogène naturel, est converti en AED (androstènedione) ou en ADD (androstadiènedione), substances qui sont elles-mêmes des précurseurs respectivement de la testostérone ou de la boldénone (Poelmans *et al.*, 2003) (figure 4). Des enzymes bactériens sont en effet capables de convertir le beta-sitostérol en AED. C'est aussi possible à partir du stigmasteranol, produit de réduction du sitostérol, présent dans des margarines de régime réputées pour abaisser le cholestérol (Gylling and Miettinen, 1999). Des phytostanols alimentaires, présents dans des margarines de régime, pourraient donc être transformés en hormones au niveau de nos intestins !

ATTITUDES DES SERVICES DE CONTRÔLES PAR RAPPORT AUX PROGRÈS ANALYTIQUES

On a vu plus haut que les techniques d'analyse ont considérablement évolué depuis une vingtaine d'années grâce à l'apparition d'équipements nouveaux, financièrement accessi-

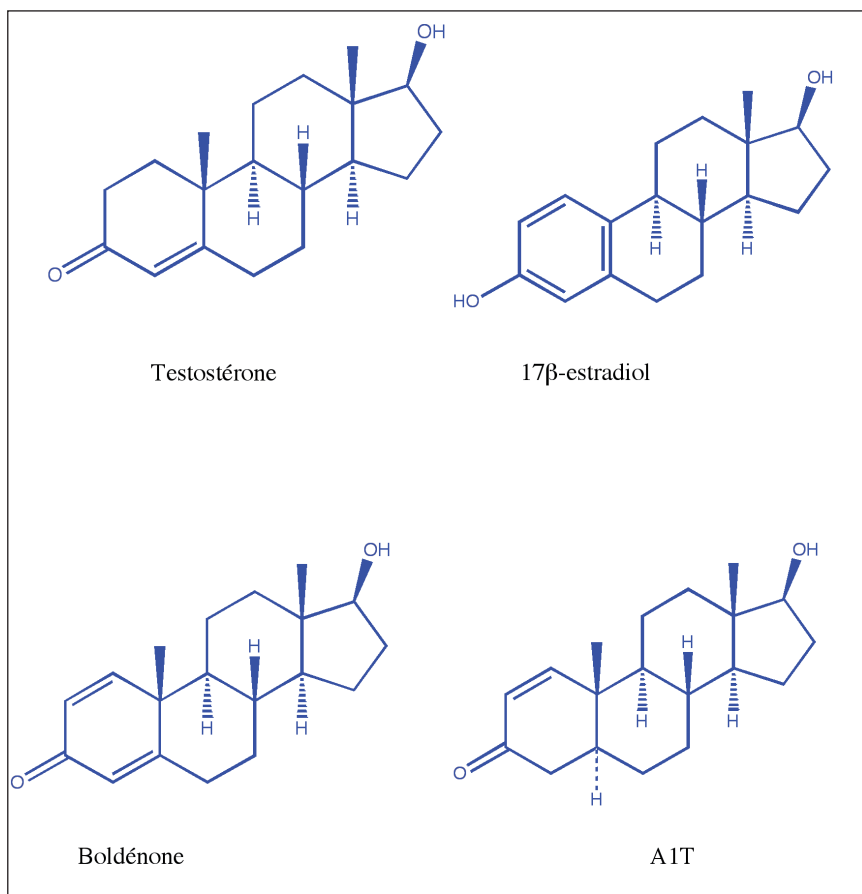


Figure 3 : formules chimiques de la testostérone, l'oestradiol, la boldénone et de l'AIT.

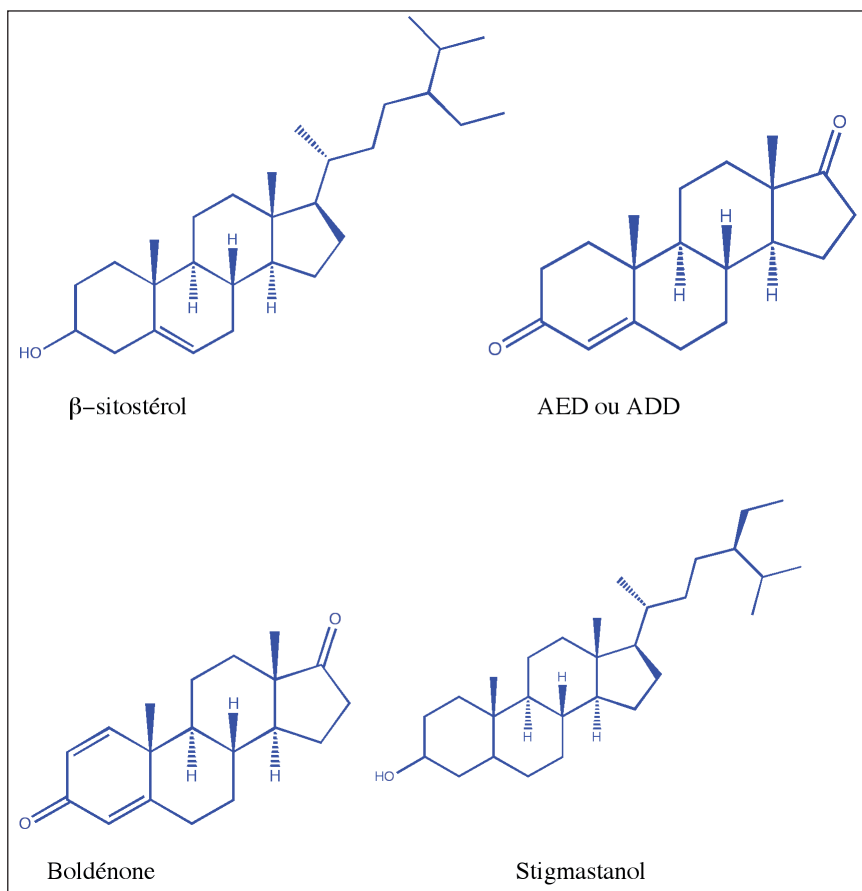


Figure 4 : formules chimiques du bêta-sitostérol, l'androstènedione (AED), l'androstadiènedione (ADD) et le stigmastanol

bles à d'avantage de laboratoires. De ce fait, le nombre de substances sous surveillance s'est accru ainsi que la capacité à les détecter à des concentrations de plus en plus basses. Cette évolution sur le plan analytique n'est pas sans conséquence au niveau des services de contrôles. Ce n'est évidemment pas aux laboratoires d'analyse d'imposer aux services de contrôle une évolution parallèle à celles des performances analytiques. C'est plutôt le rôle des services de contrôle de définir les règles d'interprétation des résultats analytiques afin de guider la prise de décision quant à la conformité des échantillons examinés par rapport à la législation.

Récemment la notion de niveau minimum de performance requise pour les résidus de substances interdites (MRPL : *Minimum Required Performance Level*) est apparu dans la législation européenne (article 4 de la directive 2002/657/CE) (Commission of the European Communities, 2002). La ressemblance phonétique en anglais avec une autre grandeur seuil, la limite maximum de résidus (MRL : *Maximum Residue Level*), cette fois pour les substances autorisées comme médicaments à usage vétérinaire, a introduit une confusion dans les esprits, certains voyant dans les MRPLs des sortes de MRLs applicables aux substances interdites. Ce qui n'est évidemment pas le cas, les MRLs étant établies sur une base toxicologique sans considération des contraintes analytiques alors que les MRPLs servent seulement à évaluer la capacité des laboratoires à détecter des résidus de substances interdites en vue d'harmoniser, au niveau européen, les prises de décision quant à la conformité sur base d'un résultat d'analyse. La décision 2005/34/CE (Commission of the European Communities, 2005) permet de clarifier les choses. Cette décision impose, à l'importation lorsque les résultats d'analyse sont inférieurs aux MRPLs, que les produits ne soient pas interdits d'entrée dans la chaîne alimentaire. L'autorité compétente doit tenir un registre des résultats en cas de récidive. Lorsque les résultats sont récurrents, indiquant ainsi un problème potentiel, les services de contrôle doivent informer

la Commission et les autres Etats Membres au sein du Comité permanent de surveillance de la chaîne alimentaire et de la santé animale. La Commission doit ensuite porter cette matière à l'attention de l'autorité compétente du pays à l'origine du problème et faire des propositions appropriées. La notion de MRPL trouve ses limites lorsqu'il s'agit de cocktails de substances. En effet si un échantillon est contaminé par un mélange de substances interdites et que chacune des ces substances présente une concentration en résidus inférieure à la MRPL, on peut s'interroger sur le bien-fondé d'une décision qui déclarerait cet échantillon conforme. Dans ce cas le renfort de tests biologiques, tels que des récepteurs essais, pratiqués sur différentes fractions chromatographiques obtenues au départ de l'extrait d'échantillon, pourrait être précieux. Pour les pics chromatographiques « actifs » dans le bioessai, des examens complémentaires par GC ou LC-MS devraient alors permettre d'identifier tous les composants toxiques du mélange.

CONCLUSIONS

On dispose maintenant d'équipements de plus en plus performants ce qui permet de détecter des substances à des limites de concentrations de plus en plus basses. Le nombre de subs-

tances à surveiller va en augmentant en raison de la disponibilité au marché noir (via internet par exemple) de très nombreuses substances, parfois synthétisées uniquement dans le but d'échapper au contrôle (*designer drugs*).

Enfin, l'autorité compétente doit tenir compte de l'évolution de la situation en matière de résidus et de contaminants des denrées alimentaires en adaptant ses prises de décision à propos de la conformité ou non d'un produit.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient tout le personnel qui a participé au développement des méthodes du laboratoire d'analyse chimique.

SUMMARY

Since 20 years, the evolution of analytical methods has been spectacular due to the development of new equipments, financially available to more laboratories. These progresses allowed the increase of the number of substances under surveillance and to dramatically lower limits of detection. Particularly, liquid

chromatography techniques are more and more efficient. In a near future, the probability is high of having particularly efficient LC-MS methods respectful of the environment. By contrast to progress done by chemists at the level of analytical performances, other chemists are setting up undetectable treatments using new unauthorised substances allowing smugglers escaping to control. Using multiple mass spectrometry-based analytical techniques, not yet identified substances are undetectable. It is thus mandatory to use other methods such as bioassays which are able to detect hormonal or toxic activities. This evolution at the analytical level is not without consequence for the inspection services. It is the task of competent authorities and inspection services to define the rules of interpretation of analytical results in order to lead the decision about the conformity of examined samples towards legislation. Lastly, the competent authority has to take into account the evolution of the situation in terms of residues and contaminants in food by adapting their decisions about the conformity or not of a product.

BIBLIOGRAPHIE

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Comm.*, 1996, **L125**, 10-32.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES 2002/657/EC : Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the

performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Comm.*, 2002, **L221**, 8-36.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES 2005/34/EC : Commission Decision of 11 January 2005 laying down harmonised standards for the testing for certain residues in products of animal origin imported from third countries. *Off. J. Eur. Comm.*, 2005, **L16**, 61-63.

DE BRABANDER H. F., POELMANS S., SCHILT R., STEPHANY R. W., LE BIZEC B., DRAISCI R.,

STERK S.S., VAN GINKEL L. A., COURTHEYN D., VAN HOOFF N., MACRÌ A., DE WASCH K. Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review. *Food Addit. Contam.*, 2004, **21**, 515-525

GYLLING H., MIETTINEN T.A. Phytosterols, analytical and nutritional aspects. In : Proceedings of the tenth European Conference on Food Chemistry (Euro Food Chem. X), Budapest, Hungary, 22-24 September 1999

HOEKSTRA S. Atom Trap Trace Analysis of Calcium Isotopes. (PhD

- thesis). University of Groningen : Groningen, 2005, 136 p.
- POELMANS S., DE WASCH K., MARTELÉ Y., SCHILT R., VAN HOOF N., NOPPE H., VERSLYCKE T., JANSSEN C.R., COURTHEYN D., DE BRABANDER H.F. The possible transformation of phytosterols to boldenone. In : Proceedings of the twelve European Conference on Food Chemistry (Euro Food Chem. XII), Bruges, Belgium, 7-12 September 2003, 74-77.
- VERBEKE R. Sensitive multi-residue method for detection of anabolics in urine and in tissues of slaughtered animals. *J. Chromatogr.*, 1979, 177, 69-84.