

■ Application du couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse en tandem (CPG/SM/SM) à l'analyse de produits alimentaires

L.B. Fay

Centre de Recherche Nestlé, Nestec SA, Vers-chez-les-Blanc, Case Postale 44, 1000 Lausanne 26, Suisse

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse en tandem est un des plus puissants outils d'identification de l'instrumentation analytique. Grâce à sa sélectivité et à sa sensibilité cette technique connaît un développement croissant dans la recherche alimentaire. Dans cet article, trois applications de cette méthodologie à l'analyse de produits alimentaires seront présentées : l'analyse de contaminants, l'identification d'acides gras et la caractérisation de molécules aromatiques volatiles.

Comme beaucoup d'autres outils analytiques, la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) n'est pas une technique récente. Elle s'est développée depuis les

premiers travaux de Thomson au début du siècle [1] jusqu'à devenir aujourd'hui une des plus puissantes techniques de l'instrumentation analytique. Un SM/SM consiste en une source d'ionisation, deux analyseurs de masse, séparés par une cellule de fragmentation (cellule de collision), et un détecteur d'ions. Le mode le plus courant d'utilisation de la SM/SM est l'analyse des ions fils. Dans ce cas, la molécule analysée est ionisée puis l'ion parent formé est sélectionné par le premier analyseur de masse. Cet ion est fragmenté par collision avec les molécules du gaz contenu dans la cellule de collision (dissociation induite par collision). Les ions fils obtenus sont séparés dans le second analyseur de masse. Le spectre bidimensionnel obtenu correspond au spectre d'un ion parent (Fig. 1). Ainsi l'ion parent, l'ion fils ou le fragment neutre perdu lors de la collision peuvent-ils être désignés comme variables indépendantes dans une expérience SM/SM et permettent les modes d'analyse correspondants.

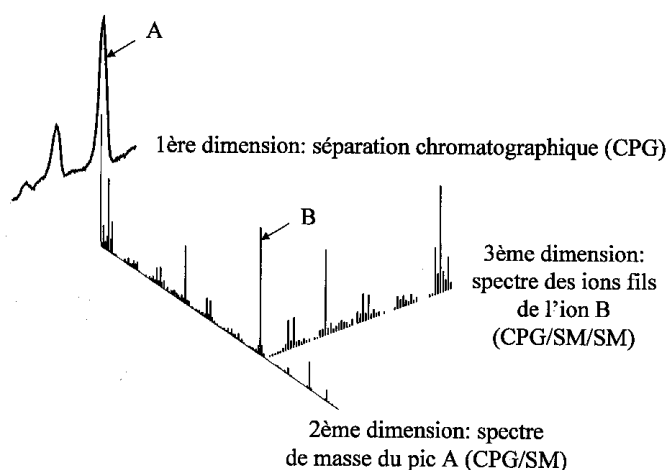


Figure 1. Représentation schématique de la séparation et de l'identification des composés présents dans un mélange par couplage CPG/SM/SM.

Les configurations des spectromètres SM/SM peuvent être divisées en deux catégories [2]. La première comprend les instruments dont les analyseurs sont couplés dans l'espace (« tandem in space ») [3]. Appartiennent à cette catégorie, les SM/SM comprenant deux analyseurs quadrupolaires, deux analyseurs magnétiques ou les appareils hybrides construits avec, par exemple, un secteur magnétique couplé à un quadrupole ou à un spectromètre de masse à temps de vol.

Dans le second groupe on trouve les instruments dont les analyseurs sont couplés dans le temps (« tandem in time ») [4,5]. Ces instruments possèdent des analyseurs capables de stocker des ions comme par exemple les spectromètres de masse à résonance cyclotronique ou les trappes d'ions. Après stockage, les ions sont fragmentés dans le même analyseur et les ions fils obtenus sont analysés.

Le couplage SM/SM en mode d'analyse des ions fils peut se comparer au couplage CPG/SM (Fig. 2). Dans un CPG/SM la première étape correspond à l'injection du composé dans la colonne. L'étape analogue en SM/SM est l'introduction du composé dans la source d'ionisation. La seconde étape des deux schémas analytiques est la séparation d'une molécule des autres composés du mélange. Dans un CPG/SM la séparation des composés se déroule dans le temps, les molécules étant éluées de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne. Dans un appareil SM/SM, le fractionnement des composants du mélange se réalise sur la base d'un processus physique de séparation des ions selon leur rapport masse sur charge (m/z). Dans un CPG/SM la molécule séparée des autres constituants du mélange est ensuite ionisée dans la source d'ionisation du spectromètre de masse. En SM/SM l'espèce ionique séparée est transférée dans la cellule de fragmentation où elle est dissociée par collision. La dernière étape, l'identification, est réalisée par un analyseur de masse fonctionnant de manière identique dans les deux techniques, CPG/SM et SM/SM.

Si la SM/SM offre à elle seule des capacités analytiques remarquables, son couplage avec une technique chromatographique (par exemple la CPG) permet de découpler ses pos-

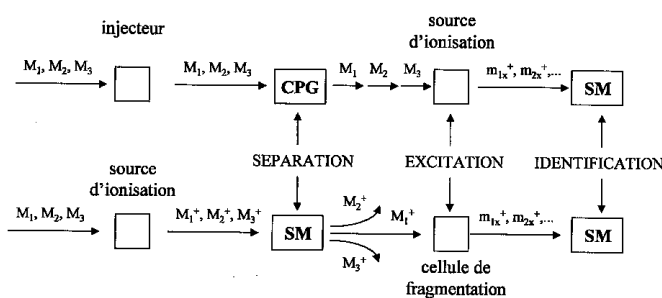


Figure 2. Comparaison du couplage CPG/SM avec la spectrométrie de masse en tandem.

sibilités en terme de sélectivité et de sensibilité. En effet, bien que les intensités absolues du signal et du bruit diminuent lorsque le nombre d'étapes analytiques augmente, la technique additionnelle accroît la sélectivité, l'intensité du bruit chimique diminuant plus rapidement que celle du signal. Ainsi, une augmentation du nombre d'étapes analytiques résulte en une augmentation du rapport signal sur bruit et donc de la sensibilité [6]. Associée au pouvoir séparatif de la CPG, la SM/SM permet l'identification et/ou la quantification de composés présents à l'état de traces dans des matrices complexes comme par exemple l'analyse de produits alimentaires. Le couplage CPG/SM/SM est ainsi particulièrement adapté à l'étude de problèmes rencontrés tant au niveau de l'assurance de qualité qu'au niveau du développement de nouveaux produits.

Dans la suite de cet article, plutôt que de présenter un catalogue des utilisations du couplage CPG/SM/SM dans l'analyse de produits alimentaires, nous discuterons en détail trois applications de la méthode : l'analyse de contaminants, l'identification d'acides gras et la caractérisation de molécules aromatiques volatiles.

Analyse de contaminants alimentaires

Le dosage des pesticides dans les matières premières et les produits finis est une des premières applications alimentaires dans laquelle le couplage CPG/SM/SM a été utilisé de manière intensive. Ce type d'analyse nécessite la détection de composés présents à l'état de traces en mélange avec les composants de la matrice alimentaire se trouvant à des concentrations considérablement plus élevées. Certes, la GC couplée à la MS peut être utilisée pour permettre la détection sélective des composés recherchés. Néanmoins, les limites de détection atteignables sont fonction du niveau d'interférence généré par les ions de la matrice qui peuvent obscurcir le signal du pesticide dosé. Le couplage CPG/SM/SM constitue une approche permettant de réduire le bruit chimique de la matrice et ainsi augmenter le degré de confiance du résultat rendu. Une étude comparative a en effet montré que le couplage CPG/SM/SM a une meilleure sélectivité de détection que les techniques CPG/SM à basse et à haute résolution [7]. Des résultats similaires ont été décrits lors de l'analyse de gibberellines dans des extraits végétaux [8].

Différentes méthodes de dosage de contaminants alimentaires utilisant la CPG/SM/SM ont été publiées ces dernières

années montrant l'intérêt croissant des laboratoires de contrôle de qualité pour cette méthodologie. Par exemple Schachterle et al. [9,10] ont développé des méthodes de screening de 19 pesticides (incluant des fongicides, des herbicides et des insecticides chlorés et organophosphorés) dans des fruits et des légumes frais. Des méthodes ont été publiées décrivant l'analyse de phtalates [11], de triazines [12], de pesticides organochlorés [13] et de chlorophenols [14] dans des eaux de boisson, ou de propylène et d'éthylène glycol dans des anchois [15].

Analyse structurale d'acides gras

La recherche de nouvelles sources d'huiles végétales ou l'étude des effets des traitements technologiques nécessite l'identification structurale des acides gras des huiles investiguées. Les méthodes classiques de CPG-SM ne permettent pas de connaître la position des doubles liaisons des acides gras insaturés. En effet, dans le spectromètre de masse, les acides gras libres ou leurs dérivés estérifiés subissent un réarrangement des double liaisons sous l'effet de l'ionisation par impact électronique.

L'utilisation de la SM/SM et de l'ionisation chimique négative permet de pallier à ces inconvénients [16]. L'ionisation chimique en mode négatif des acide gras conduit à la formation d'un ion intense $(M-H)^-$. Décomposé par collision à haute énergie, cet ion produit un spectre dans lequel les ions fils obtenus sont régulièrement séparés par 14 Dalton issus des clivages successifs de chaque liaison C-C et de l'éjection simultanée d'alcènes et d'hydrogène [17,18]. Dans le cas d'un acide gras *n*-mono-insaturé, le clivage allylique va dominer alors que celui de la double liaison et de la liaison vinylique induira des ions de faible intensité. Deux signaux intenses (carbones *n*-1 et *n*+3) séparés par trois signaux faibles (carbones *n*, *n*+1 et *n*+2) vont permettre de localiser la double liaison par comptage du nombre de signaux entre l'ion parent $(M-H)^-$ et le premier ion de faible intensité [19]. Cette méthode originellement développée après ionisation des molécules isolées par bombardement d'ions rapides a été adaptée à l'analyse de mélanges. Les acides gras sont dérivés sous forme d'esters pentafluorobenzyles, fractionnés par CPG puis ionisés par ionisation chimique négative [20]. Les ions $(M-H)^-$ sont décomposés dans une cellule de collision à haute énergie et le spectre d'ions fils obtenus interprété comme précédemment décrit.

Cette technique a été utilisée pour identifier les acides gras cycliques insaturés formés, au cours du chauffage d'huiles de friture, par cyclisation intramoléculaire d'acides C₁₈ polyinsaturés [21-22].

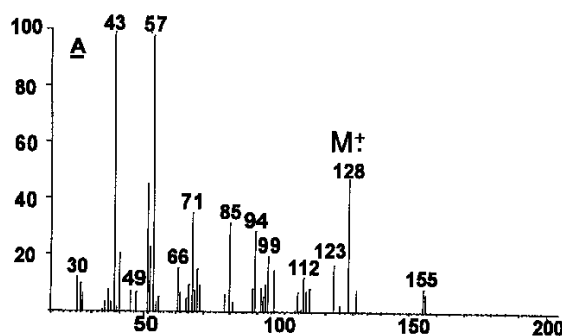
Analyse de molécules aromatiques volatiles

La composition en molécules volatiles des huiles essentielles ou des arômes générés thermiquement, par exemple durant la cuisson des aliments, peut être d'une très grande complexité. Parmi ces molécules, certaines vont posséder une note aromatique intense et caractéristique (molécule-clé) alors que d'autres composants du mélange n'ont pas d'im-

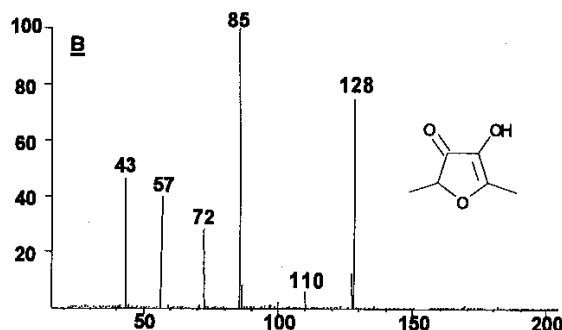
pact olfactif. Pour l'analyste qui s'intéresse aux molécules-clés de l'arôme, il importe donc de pouvoir sélectivement analyser ces composants souvent présents à l'état de trace, sans interférence avec les autres constituants de la préparation. Dans ce contexte le couplage CPG/SM/SM apparaît être l'un des outils les plus performants mis à la disposition du chimiste aromaticien [23,24].

La SM/SM permet d'ajouter une troisième dimension au couplage CPG/SM (voir Fig. 1). Elle permet d'obtenir des spectres de masse purs à partir de molécules coéluées avec d'autres composants de l'extrait aromatique. Ainsi la figure 3 présente l'identification de la 4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2H)-furanone formée après chauffage de xylose en présence de glycine. La CPG/SM ne permettant pas l'identification de cette molécule coéluée avec d'autres produits de la réaction, la CPG/SM/SM fut utilisée afin d'obtenir, après collision de l'ion moléculaire, un spectre dépourvu de contamination. De manière similaire, la CPG/SM/SM s'est révélée être une technique alternative à la CPG/SM permettant l'identification de plusieurs sesquiterpènes de l'huile de vétiver, huile essentielle d'une très grande complexité [25,26].

L'utilisation de précurseurs marqués aux isotopes stables permet d'étudier les mécanismes de formation de molécules aromatiques. La CPG/SM/SM a été utilisée pour étudier les voies de formation du Furanéol (4-hydroxy-2,5-diméthyl-



CPG/SM, impact électronique à 70 eV



CPG/SM/SM: dissociation de l'ion m/z 128

Figure 3. Identification de la 4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2H)-furanone formée à partir de xylose et de glycine par CPG/SM et CPG/SM/SM. L'utilisation de la SM/SM permet d'obtenir un spectre de masse exempt de contamination.

3(2H)-furanone) et de l'homofuranéol (4-hydroxy-2(or 5)-éthyl-5(or 2)-méthyl-3(2H)-furanone), composés aromatiques qui contribuent aux caractéristiques sensorielles de nombreux produits alimentaires naturels ou générés thermiquement (fraise, ananas, café rôti, ragoût de boeuf...). Après réaction de Maillard à partir de précurseurs marqués par le ^{13}C (pentose et acides aminés), les produits de réaction formés ont été identifiés. La localisation, dans ces composés, des atomes de carbone marqués par les isotopes stables, a permis de proposer un mécanisme réactionnel de formation des deux furanones [27,28]. Les mécanismes de formation des alcoylpyrazines par réaction de Maillard de précurseurs marqués aux isotopes stables ont également été étudiés par CPG/SM/SM [29]. La figure 4 illustre la localisation de l'isotope stable dans la 2-éthyl-5-méthyl-pyrazine formée après réaction entre le glucose et l'alanine marquée.

Enfin, la CPG/SM/SM est une technique qui permet de différencier des diastéréoisomères. Les travaux réalisés à partir des 4 diastéréoisomères du dihydrocarvéol ont montré la complémentarité du couplage CPG/SM/SM avec la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier [30,31].

Bibliothèques de spectres SM/SM

Un des atouts de la CPG/SM réside dans la disponibilité de vastes bibliothèques de spectres de masse [32]. Ces bibliothèques, gérées de manière centralisée ou non, peuvent, en plus d'informations spectrales, contenir des indices de rétention chromatographique et des descripteurs sensoriels.

Dans le cas du couplage CPG/SM/SM, la disponibilité de bibliothèques de spectres est tout autre. En principe, rien ne s'oppose à la collection de spectres d'ions fils obtenus après dissociation par collision d'ions moléculaires. Ces spectres de référence pourraient être utilisés ultérieurement en comparaison avec des spectres SM/SM mesurés à partir d'échantillons inconnus. Cependant, il n'existe pas actuellement de bibliothèques de spectres SM/SM disponibles commercialement.

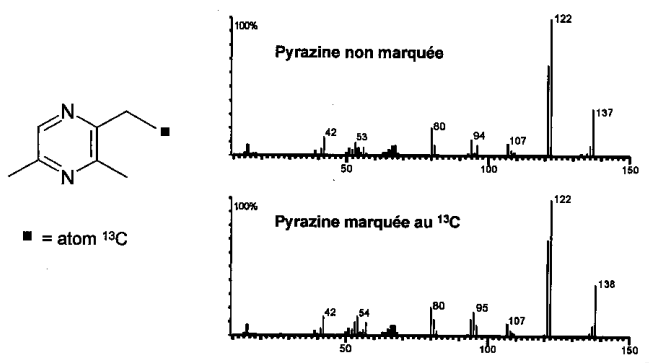


Figure 4. Localisation de l'isotope stable dans le spectre SM/SM de la 2-éthyl-5-méthyl-pyrazine. Les ions moléculaires protonés m/z 137 et 138 ont été formés par ionisation chimique positive avec de l'isobutane. L'ion à m/z 122 correspond à la perte du radical méthyle portant l'atome marqué au carbone ^{13}C .

Afin de parvenir à l'établissement de bibliothèques SM/SM, deux protocoles de standardisation des conditions opératoires d'acquisition, indépendants de l'instrument utilisé, ont été proposés. L'un utilise la dissociation induite par collision du cation de l'acétone à m/z 58 [33] l'autre, l'ion à m/z 231 (C_5F_9^+) du perfluorokérosène ou de la perfluorotributylamine [34]. Cette standardisation devrait conduire à une meilleure comparaison des spectres SM/SM obtenus à partir d'instruments différents tant en terme de configuration instrumentale (triple quadripôle, magnétique à 4 secteurs, hybride, trappe d'ions ...) qu'en terme de constructeur. Conjointement avec l'apparition sur le marché d'instruments CPG/SM/SM de table [35], ces développements devraient permettre une plus large utilisation de la CPG/SM/SM comme outil d'identification de structures moléculaires.

Conclusion

Le couplage CPG/SM/SM peut être considéré comme le prolongement naturel du couplage CPG/SM. Comme pour beaucoup d'autres techniques analytiques, l'attrait croissant de l'analyste pour la CPG/SM/SM est lié aux progrès instrumentaux réalisés.

Les développements de la chromatographie gazeuse, de la spectrométrie de masse quadripolaire ou avec des trappes d'ions et l'amélioration du contrôle informatique de l'instrument ont permis d'offrir à l'utilisateur des machines performantes et d'utilisation conviviale. Les instruments de CPG/SM/SM disponibles sur le marché permettent pour la plupart l'analyse en routine d'échantillons d'une très grande complexité et sont proposés à des prix accessibles pour un nombre croissant de laboratoires. Le couplage CPG/SM/SM devrait donc devenir dans les prochaines années un outil courant de l'instrumentation analytique tant pour le contrôle et la sécurité des aliments que pour le développement de nouveaux produits.

Références

1. Thomson, J. J. *Phil. Mag.* **1910**, *18*, 824.
2. De Hoffmann, E. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 129-137.
3. Johnson, J. V.; Yost, R. A.; Kelley, P. E.; Bradford, D. C. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2162-2172.
4. White, R. L.; Wilkins, C. L. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 2211-2215.
5. Louris, J. N.; Cooks, R. G.; Syka, J. E. P.; Kelley, P. E.; Stafford, Jr. G. C.; Todd, J. F. *J. Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1677-1685.
6. Johnson, J. V.; Yost, R. A. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 758A-768A.
7. Durand, G.; Gille, P.; Fraisse, D.; Barceló, D. *J. Chromatogr.* **1992**, *603*, 175-184.
8. Moritz, T.; Olsen, J. E. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1711-1716.
9. Schachterle, S.; Brittain, R. D.; Mills, J. D. *J. Chromatogr. A* **1994**, *683*, 185-193.
10. Schachterle, S.; Feigel, C. *J. Chromatogr. A* **1996**, *754*, 411-422.
11. Brumley, W. C.; Shafter, E. M.; Tillander, P. E. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **1994**, *7*, 1230-1236.
12. Charrêteur, C.; Kerbaol, N.; Péron, J. J. *Analisis* **1996**, *24*, 336-343.
13. Lee, M. R.; Lee, J. S.; Hsiang, W. S.; Chen, C. M. *J. Chromatogr.* **1997**, *775*, 267-274.

14. Turnes, I.; Rodríguez, I.; Garcia, C. M.; Cela, R. *J. Chromatogr. A* **1996**, *743*, 283-292.
15. Matusik, J. E.; Eilers, P. P.; Waldron, E. M.; Conrad, S. M.; Sphon, J. A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **1993**, *76*, 1344-1347.
16. Jensen, N. J.; Gross, M. L. *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, *6*, 497-536.
17. Tomer, K. B.; Crow, F. W.; Gross, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5487-5488.
18. Jensen, N. J.; Tomer, B. T.; Gross M. L. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2018-2021.
19. Couderc, F. *Lipids* **1995**, *30*, 691-699.
20. Promé, J. C.; Aurelle, H.; Couderc, F.; Savagnac, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1987**, *1*, 50-52.
21. Le Quéré, J. L.; Sébédio, J. L.; Henry, R.; Couderc, F.; Demont, N.; Promé, J. C. *J. Chromatogr. Biomed. Applic.* **1991**, *562*, 659-672.
22. Le Quéré, J. L.; Sébédio, J. L. In *Deep Frying - Chemistry, Nutrition and Practical Applications*, Perkins, E. G.; Erickson, M. D., Eds.; AOAC Press, Champaign IL, 1996; pp 49-88.
23. Huston, C. K. In *Techniques for Analysing Food Aroma*, Marsili R., Ed.; Marcel Dekker Inc, New-York, 1997; pp 209-235.
24. Fay, L. B.; Blank, I.; Cerny, C. In *Flavour Science: Recent Developments*; Taylor AJ. Mottram D.S. Eds; The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996; pp 271-276.
25. Cazaussus, A.; Pes, R.; Sellier, N.; Tabet, J. C. *Chromatographia* **1988**, *25*, 865-869.
26. Sellier, N.; Cazaussus, A.; Budzinski, H.; Lebon, M. *J. Chromatogr.* **1991**, *557*, 451-458.
27. Blank, I.; Fay, L. B. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 531-536.
28. Blank, I.; Devaud, S.; Fay, L. B. In: *Flavour Science: Recent Developments*; Taylor, A. J.; Mottram, D. S. Eds.; The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996; pp 188-193.
29. Amrani-Hemaimi, M.; Cerny, C.; Fay, L. B. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2818-2822.
30. Decouzon, M.; Gériibaldi, S.; Rouillard, M.; Sturla, J. M. *Flavour Fragr. J.* **1990**, *5*, 147-152.
31. Decouzon, M.; Gal, J. F.; Gériibaldi, S.; Rouillard, M.; Sturla, J. M. *Org. Mass Spectrom.* **1990**, *25*, 312-316.
32. Hearmon, R. A. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, *344*, 164-166.
33. Martinez, R. I. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 245-248.
34. Mohan, K. R.; Bartlett, M. G.; Busch, K. L.; Schoen, A. E.; Gore, N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 576-582.
35. Sheehan, T. L. *International Laboratory*, March 1997, 11A-11D.