



**HAL**  
open science

**Speciation of arsenic in seafood samples by HPLC-ICP-MS coupling after microwaves assisted extraction (MAE). Contribution to the evaluation of risks by assessment of its bioaccessibility.**

Vincent Dufailly

► **To cite this version:**

Vincent Dufailly. Speciation of arsenic in seafood samples by HPLC-ICP-MS coupling after microwaves assisted extraction (MAE). Contribution to the evaluation of risks by assessment of its bioaccessibility.. Chemical Sciences. AgroParisTech, 2008. English. NNT : 2008AGPT0077 . pastel-00005007

**HAL Id: pastel-00005007**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00005007>**

Submitted on 10 Apr 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

**SPÉCIALITÉ : PHYSICO-CHIMIE ANALYTIQUE**

présentée et soutenue le 27/11/2008

par

**VINCENT DUFALLY**

---

**Spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche  
par couplage HPLC-ICP-MS  
après extraction assistée par micro-ondes (MAE).  
Contribution à l'évaluation des risques  
par l'estimation de sa bioaccessibilité**

---

Co-directeur de thèse : **Professeur Diane Beauchemin**

Co-directeur de thèse : **Docteur Jean-Marc Frémy**

Devant le jury :

**Président :** Pr Jacques GUILLOT (École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France)  
**Membres :** Pr Diane BEAUCHEMIN (Queen's university, Kingston, ON, Canada)  
Dr Jean-Marc FRÉMY (AFSSA-DERNS-UERPC, Maisons-Alfort, France)  
Dr Thierry GUÉRIN (AFSSA-LERQAP-CIME, Maisons-Alfort, France)  
**Rapporteurs :** Dr Olivier DONARD (Université de Pau et Pays de l'Adour, Pau, France)  
Pr José BROEKAERT (University of Hamburg, Hamburg, Allemagne)

**AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS**  
LABORATOIRE D'ÉTUDES ET DE RECHERCHES SUR  
LA QUALITÉ DES ALIMENTS ET LES PROCÉDÉS ALIMENTAIRES

**À mes grand-pères disparus.  
Et à mes grand-mères courageuses.**

## **COLLABORATIONS ET REMERCIEMENTS**

Cette thèse est le fruit de trois années de travail qui n'aurait pas pu aboutir, sans l'aide, les conseils et les encouragements de nombreuses personnes. Ces quelques lignes vont me permettre de leur exprimer toute ma reconnaissance.

Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire d'Études et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés alimentaires. J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Laurent Laloux et à son prédécesseur Monsieur Laurent Rosso pour la confiance qu'ils m'ont témoignée en m'accueillant au sein de leur laboratoire.

Avant toute chose, je souhaite remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ces travaux de thèse et avec qui j'ai pu avoir un échange constructif au cours de la soutenance. Je remercie tout particulièrement Monsieur Jacques Guillot pour avoir accepté de présider ce jury de thèse et Messieurs José Broekaert et Olivier Donard pour avoir accepté d'examiner ces travaux de thèse en tant que rapporteurs.

Je tiens à adresser mes remerciements au Professeur Diane Beauchemin et à Monsieur Jean-Marc Frémy, mes deux codirecteurs de thèse, pour leur patience, leur gentillesse et leur disponibilité. J'adresse particulièrement un grand merci à Diane et son équipe pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire du département de chimie de la Queen's University durant mes 6 mois de stage au Canada.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Thierry et Laurent, qui ont encadré ces travaux de thèse et qui m'ont mis le pied à l'étrier. Je souhaite les remercier pour la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée, ainsi que pour la liberté et l'autonomie qu'ils m'ont accordées durant ces trois ans. Je les remercie également pour leur disponibilité, leur patience et leur rigueur dans le travail, notamment lors de la rédaction. Merci enfin à tous les deux pour votre amitié et votre soutien durant ces 5 dernières années. J'espère sincèrement qu'on aura l'occasion de travailler à nouveau ensemble dans le futur !

Je voudrais aussi remercier tous mes collègues de l'unité CIME (ou devrais-je dire CIME Circus ?). Je commencerai donc par remercier le noyau dur des irréductibles : Christelle (pour ta patience et ton énergie communicative), Christian (pour nos discussions footballistiques quotidiennes), Claude (pour ta gentillesse, ton humour et ton sens artistique indiscutable !) et Rachida (pour ta bonne humeur et ta gentillesse). Merci à vous quatre pour votre aide, votre soutien, et les bons moments quotidiens passés autour du café matinal (accompagné de croissants tous les premiers du mois ! J'espère que la tradition va survivre à mon départ !). Ce fut un réel plaisir grâce à vous de venir travailler.

Je n'oublie pas les autres membres de l'unité qui sont venus nous rejoindre par la suite : Ali, Sandrine, Stéphanie et la petite dernière Axelle (qui va avoir le plaisir de poursuivre ces travaux de thèse dans les 3 années qui viennent). Enfin merci à Caroline dont les travaux de Master ont aussi contribué à cette thèse.

Je pense aussi à tous mes autres collègues de l'AFSSA. Avec une mention spéciale pour Patricia (pour sa personnalité inimitable : les repas du midi n'auraient pas été si drôles et animés sans toi ! Fais un gros bisous à ton petit Romain et à tes deux « bêtes » Ratatouille et Blinis) et Ronel (pour son humour et sa bonne humeur : mes hommages Cher Docteur !). Merci aussi à Nadège, Baïa, Christine, Béatrice, Laurent Maurice, Fabrice, Sylvie, Sophie, Martial et aux informaticiens Serge et Olivier qui m'ont sauvé la vie plus d'une fois ! J'ai aussi une pensée pour Anne-Sophie la ch'ti, pour m'avoir fait découvrir le ch'nord et sa belle ville de Lille.

Je voudrais aussi remercier « the canadian team » : Shulan, Ayaz, Liyan, Adam, Steve, Jenna et Owen, pour leur accueil et leur bonne humeur et pour avoir supporté « my terrible french accent » ! Thank you guys !

Merci à mes deux potes de toujours (et j'espère pour toujours) Benoît et Julien. Même si on n'a plus l'occasion de se voir autant qu'avant, lorsqu'on se retrouve, c'est comme si on s'était quitté la veille. Merci d'être là les gars !

Merci aussi à mes « z'amis » de la fac : Sandrine (ma binôme préférée), Aurélien, Sophie, Ambroise, Jean-Yves et Gaëlle. Merci de m'avoir toujours soutenu et encouragé.

Enfin, merci à mes correcteurs d'orthographe attitrés qui ont beaucoup souffert : Bru, Claire, Simon et Stéphane. Vous m'avez beaucoup aidé lors des derniers moments de la rédaction ! Et merci aussi pour le week-end mémorable en Auvergne qui m'a permis de prendre un grand bol d'air avant la dernière ligne droite de la thèse.

Pour finir, tout ceci n'aurait pas été possible sans l'amour, la confiance et le soutien de mes parents (exemples de courage et de générosité), de ma sœur, de mon frère et de ma belle-famille (même si tu n'aimes pas cette expression Française !). Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon amour.

Enfin, merci à toi Nanou avec tout mon amour. Merci de me rendre plus heureux chaque jour qui passe.

## TABLE DES MATIÈRES

COLLABORATIONS ET REMERCIEMENTS .....	3
TABLE DES MATIÈRES.....	6
LISTE DES FIGURES .....	10
LISTE DES TABLEAUX .....	11
LISTE DES ABREVIATIONS .....	12
PUBLICATIONS .....	15
COMMUNICATIONS .....	16
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	18
PARTIE I. PROBLÉMATIQUE DE L'ARSENIC.....	21
I. 1. Généralités.....	22
I. 1. 1. Propriétés .....	22
I. 1. 2. Les différentes formes arséniées .....	22
I. 1. 2. a. <i>Les formes inorganiques</i> .....	24
I. 1. 2. b. <i>Les composés organométalliques</i> .....	25
I. 1. 2. b. i. <i>Les formes méthylées</i> .....	25
I. 1. 2. b. ii. <i>Les formes organiques</i> .....	25
I. 1. 2. b. iii. <i>Autres formes</i> .....	25
I. 1. 3. Source d'émission .....	26
I. 1. 3. a. <i>Sources naturelles</i> .....	26
I. 1. 3. b. <i>Sources anthropiques</i> .....	26
I. 1. 4. L'arsenic dans l'environnement.....	27
I. 1. 4. a. <i>Arsenic dans l'atmosphère</i> .....	27
I. 1. 4. b. <i>Arsenic dans les sols</i> .....	28
I. 1. 4. c. <i>Arsenic dans les eaux</i> .....	28
I. 2. Toxicité de l'arsenic .....	29
I. 2. 1. Devenir dans l'organisme humain .....	30
I. 2. 2. Toxicité aiguë.....	30
I. 2. 3. Toxicité chronique .....	31
I. 2. 4. Valeurs toxicologiques de référence .....	31
I. 2. 5. Effets cancérogènes .....	33
I. 2. 6. Besoins essentiels et effets thérapeutiques .....	33
I. 3. Exposition humaine.....	34
PARTIE II. OPTIMISATION PAR PLAN D'EXPÉRIENCES D'UNE MÉTHODE DE SÉPARATION DE COMPOSÉS ARSÉNIÉS PAR COUPLAGE HPLC/ICP-MS .....	36
II. 1. Introduction .....	37
II. 2. Spéciation de l'arsenic : état de l'art .....	37
II. 2. 1. Méthode de séparation par HPLC .....	38
II. 2. 1. a. <i>Séparation en mode isocratique</i> .....	44
II. 2. 1. b. <i>Séparation en mode gradient</i> .....	45

II. 2. 2. Méthode de détection : ICP-MS .....	46
II. 2. 2. a. <i>Historique</i> .....	46
II. 2. 2. b. <i>Principe</i> .....	46
II. 2. 2. c. <i>Principaux sous-systèmes constitutifs de l'ICP-MS</i> .....	47
II. 2. 2. c. i. <i>La torche à plasma</i> .....	48
II. 2. 2. c. ii. <i>L'interface et les lentilles ioniques</i> .....	48
II. 2. 2. c. iii. <i>Le spectromètre de masse</i> .....	48
II. 2. 2. c. iv. <i>Le système de détection</i> .....	48
II. 2. 3. Bilan de l'état de l'art .....	49
II. 3. Conditions expérimentales .....	49
II. 3. 1. Couplage HPLC/ICP-MS .....	49
II. 3. 2. Séparation chromatographique par échange d'ions .....	50
II. 4. Optimisation par la méthode des plans d'expériences .....	50
II. 4. 1. Principe .....	50
II. 4. 2. Étude préliminaire .....	50
II. 4. 3. Construction du plan d'expériences .....	52
II. 4. 3. a. <i>Sélection des facteurs et des réponses à étudier</i> .....	52
II. 4. 3. b. <i>Notion de plan factoriel, d'aliases et de contrastes</i> .....	53
II. 4. 3. c. <i>Plan factoriel <math>2^{7-4}</math></i> .....	54
II. 4. 3. d. <i>Détermination et vérification du modèle mathématique</i> .....	55
II. 5. Résultats expérimentaux .....	56
II. 6. Résultats complémentaires et discussion .....	65
II. 6. 1. Estimation de l'influence des paramètres sur la séparation des 7 espèces As.....	65
II. 6. 1. a. <i>Influence sur les résolutions</i> .....	65
II. 6. 1. b. <i>Influence sur le temps d'analyse</i> .....	68
II. 6. 1. c. <i>Influence sur les sensibilités des espèces inorganiques</i> .....	69
II. 6. 2. Vérification des modèles mathématiques pour la séparation des 7 espèces.....	70
II. 6. 3. Détermination des conditions chromatographiques optimales (7 espèces).....	71
II. 6. 4. Influence de l'interférence $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ sur la séparation .....	72
II. 6. 5. Optimisation des conditions pour la séparation de 9 composés arséniés .....	74
CONCLUSIONS DE LA PARTIE II.....	77
PARTIE III. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DIGESTION DOUCE : MINÉRALISATION ASSISTÉE PAR MICRO-ONDES .....	78
III. 1. Introduction .....	79
III. 2. Extraction des composés arséniés : état de l'art.....	79
III. 2. 1. Méthode par extraction liquide-solide « classique » avec ou sans sonification.	82
III. 2. 2. L'extraction enzymatique.....	83
III. 2. 3. Techniques d'extraction alternatives.....	84
III. 2. 3. a. <i>Extraction accélérée par solvant (ASE)</i> .....	84
III. 2. 3. b. <i>Traitement par l'acide trifluoroacétique (TFA)</i> .....	85
III. 2. 4. Extraction assistée par micro-ondes .....	85
III. 2. 5. Bilan de l'état de l'art.....	87
III. 3. Conditions expérimentales .....	88
III. 3. 1. Extraction assistée par micro-ondes .....	88
III. 3. 1. a. <i>Instrumentations</i> .....	88
III. 3. 1. b. <i>Échantillons et matériaux de référence certifiés</i> .....	88
III. 3. 1. c. <i>Préparation des échantillons avant analyse</i> .....	89
III. 3. 1. c. i. <i>Préparation physique des échantillons</i> .....	89
III. 3. 1. c. ii. <i>Préparation chimique des échantillons</i> .....	89



III. 3. 2. Quantification des espèces arséniées.....	90
III. 3. 3. Quantification de l'As total.....	91
III. 4. Résultats et discussions.....	93
III. 4. 1. Optimisation des conditions d'extraction de la procédure MAE.....	93
III. 4. 1. a. <i>Étude préliminaire</i> .....	93
III. 4. 1. b. <i>Comparaison des conditions d'extraction 100 % H<sub>2</sub>O et 80 % MeOH.</i> .....	95
III. 4. 1. c. <i>Comparaison des résultats avec la littérature</i> .....	98
III. 4. 2. Validation interne de la méthode.....	99
III. 4. 2. a. <i>Linéarité</i> .....	99
III. 4. 2. b. <i>Limites de détection et de quantification</i> .....	100
III. 4. 2. c. <i>Spécificité</i> .....	103
III. 4. 2. d. <i>Justesse</i> .....	105
III. 4. 2. e. <i>Répétabilité</i> .....	106
III. 4. 2. f. <i>Reproductibilité interne</i> .....	107
III. 5. Applications de la méthode de spéciation.....	108
III. 5. 1. Échantillons de produits de la pêche non dégraissés.....	108
III. 5. 2. Échantillons aqueux.....	109
III. 5. 3. Participation à la certification d'un MRC sur un produit de la pêche.....	111
CONCLUSIONS DE LA PARTIE III.....	114
PARTIE IV. ÉTUDE DE LA BIOACCESSIBILITE DE L'ARSENIC : MÉTHODE DE LIXIVIATION EN CONTINU ET SPÉCIATION PAR COUPLAGE HPLC/ICP-MS.....	115
IV. 1. Introduction.....	116
IV. 2. Bioaccessibilité et biodisponibilité de l'arsenic : état de l'art.....	116
IV. 2. 1. Biodisponibilité et méthodes <i>in vivo</i> .....	117
IV. 2. 2. Bioaccessibilité et méthodes <i>in vitro</i> .....	118
IV. 2. 3. Bilan de l'état de l'art.....	122
IV. 3. Conditions expérimentales.....	122
IV. 3. 1. Instrumentation.....	123
IV. 3. 1. a. <i>Instrumentation pour les travaux réalisés au Canada</i> .....	123
IV. 3. 1. b. <i>Instrumentation pour les travaux réalisés en France</i> .....	123
IV. 3. 2. Acquisition des données.....	123
IV. 3. 2. a. <i>Acquisition des données pour les travaux réalisés au Canada</i> .....	123
IV. 3. 2. b. <i>Acquisition des données pour les travaux réalisés en France</i> .....	123
IV. 3. 3. Échantillons et matériaux de référence certifiés.....	124
IV. 3. 4. Procédure de lixiviation en ligne.....	124
IV. 3. 5. Méthode statique.....	125
IV. 3. 6. Vérification du bilan en masse.....	125
IV. 3. 6. a. <i>Procédure pour les travaux réalisés au Canada</i> .....	125
IV. 3. 6. b. <i>Procédure pour les travaux réalisés en France</i> .....	126
IV. 3. 7. Quantification des espèces arséniées dans les lixiviats.....	126
IV. 3. 7. a. <i>Procédure pour les travaux réalisés au Canada</i> .....	126
IV. 3. 7. b. <i>Procédure pour les travaux réalisés en France</i> .....	126
IV. 4. Résultats expérimentaux.....	126

---

IV. 5. Discussion .....	133
IV. 5. 1. Évaluation de la bioaccessibilité de l'As total dans les produits de la pêche ..	133
IV. 5. 1. a. <i>Résultat de la lixiviation en continu</i> .....	133
IV. 5. 1. b. <i>Comparaison des méthodes statique et de lixiviation en continu</i> .....	134
IV. 5. 2. Influence de la salive sur la séparation des espèces As .....	135
IV. 5. 2. a. <i>Influence du pH sur la séparation des espèces As</i> .....	136
IV. 5. 2. b. <i>Influence de la quantité de sels sur la séparation des espèces As</i> .....	138
IV. 5. 2. c. <i>Conclusions</i> .....	139
IV. 5. 3. Spéciation des lixiviats de salive .....	140
CONCLUSIONS DE LA PARTIE IV .....	144
CONCLUSIONS GENERALES .....	146
BIBLIOGRAPHIE .....	150
ANNEXES .....	174

<b>LISTE DES FIGURES</b>
--------------------------

<b>Figure 1 :</b>	<b>Schéma simplifié des différents éléments constitutifs d'un ICP-MS.....</b>	<b>47</b>
<b>Figure 2 :</b>	<b>Chromatogramme pour une solution étalon des 7 espèces As à 20 As µg L<sup>-1</sup> dans les conditions chromatographiques initiales .....</b>	<b>51</b>
<b>Figure 3 :</b>	<b>Résultats du plan d'expériences pour la résolution As(III)/MA (R<sub>1</sub>).....</b>	<b>65</b>
<b>Figure 4 :</b>	<b>Résultats du plan d'expériences pour la résolution MA/DMA (R<sub>2</sub>) .....</b>	<b>65</b>
<b>Figure 5 :</b>	<b>Résultats du plan d'expériences pour la résolution DMA/As(V) (R<sub>3</sub>).....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 6 :</b>	<b>Résultats du plan d'expériences pour la résolution As(V)/AB (R<sub>4</sub>).....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 7 :</b>	<b>Résultats du plan d'expériences pour la résolution AB/TMAO (R<sub>5</sub>) .....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 8 :</b>	<b>Résultats du plan d'expériences pour la résolution TMAO/AC (R<sub>6</sub>) .....</b>	<b>67</b>
<b>Figure 9 :</b>	<b>Résultats du plan d'expériences pour le temps d'analyse (T).....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 10 :</b>	<b>Résultats du plan d'expériences pour la sensibilité de l'espèce As(III) (S<sub>1</sub>).....</b>	<b>69</b>
<b>Figure 11 :</b>	<b>Résultats du plan d'expériences pour la sensibilité de l'espèce As(V) (S<sub>2</sub>).....</b>	<b>69</b>
<b>Figure 12 :</b>	<b>Chromatogrammes observés dans les conditions initiales et optimales pour une solution étalon des 7 espèces As à 20 µg As L<sup>-1</sup> .....</b>	<b>72</b>
<b>Figure 13 :</b>	<b>Chromatogramme observé dans les conditions optimales pour les solutions à 0; 0,1; 0,5; 1; 5 % HCl à m/z = 75 .....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 14 :</b>	<b>Chromatogramme observé dans les conditions optimales pour une solution étalon des 9 espèces As à 20 µg As L<sup>-1</sup> .....</b>	<b>76</b>
<b>Figure 15 :</b>	<b>Schéma général de la procédure MAE.....</b>	<b>90</b>
<b>Figure 16 :</b>	<b>Chromatogramme à m/z = 75 pour des solutions de 4, 8, 16, 32 et 64 % de MeOH .....</b>	<b>97</b>
<b>Figure 17 :</b>	<b>Chromatogramme observé pour une solution dopée avec une quantité des espèces As correspondante aux LQ initiales .....</b>	<b>101</b>
<b>Figure 18 :</b>	<b>Chromatogramme d'une solution dopée au niveau des LQ (cf. Tableau XXII). .....</b>	<b>102</b>
<b>Figure 19 :</b>	<b>Étude de la spécificité pour 7 espèces arséniées .....</b>	<b>104</b>
<b>Figure 20 :</b>	<b>Chromatogramme observé à m/z = 75 de DOLT 4.....</b>	<b>111</b>
<b>Figure 21 :</b>	<b>Schéma de l'appareil digestif humain .....</b>	<b>118</b>
<b>Figure 22 :</b>	<b>Schéma du dispositif de la lixiviation en continu .....</b>	<b>125</b>
<b>Figure 23 :</b>	<b>Teneurs en As total (en %) de la lixiviation sur les 4 MRC (n = 5, ± SD).....</b>	<b>134</b>
<b>Figure 24 :</b>	<b>Chromatogramme des solutions étalons à 10 µg As L<sup>-1</sup> des 7 espèces As.....</b>	<b>137</b>
<b>Figure 25 :</b>	<b>Chromatogramme des solutions étalons à 10 µg As L<sup>-1</sup> des 7 espèces As dans différentes quantités de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,07-7 g L<sup>-1</sup>).....</b>	<b>138</b>
<b>Figure 26 :</b>	<b>Chromatogramme observé pour une solution étalon à 10 µg As L<sup>-1</sup> des 7 espèces As préparée dans de la salive diluée au dixième. ....</b>	<b>140</b>
<b>Figure 27 :</b>	<b>Proportion bioaccessible moyenne (%) des 3 MRC pour chaque espèce et pour l'As total. ....</b>	<b>142</b>

<b>LISTE DES TABLEAUX</b>
---------------------------

<b>Tableau I :</b>	<b>Noms, acronymes et structures chimiques des principales espèces arséniées (d'après Francesconi et Kuehnelt, 2004) .....</b>	<b>23</b>
<b>Tableau II :</b>	<b>pKa et formes prédominantes selon le pH des composés As (d'après Suner <i>et al.</i>, 2001) .....</b>	<b>24</b>
<b>Tableau III :</b>	<b>Doses létales des différents composés arséniés chez la souris et le hamster (d'après Hugues, 2002) .....</b>	<b>29</b>
<b>Tableau IV :</b>	<b>Valeurs toxicologiques de référence (d'après Pichard <i>et al.</i>, 2005) .....</b>	<b>32</b>
<b>Tableau V :</b>	<b>Séparation des espèces arséniées en mode isocratique .....</b>	<b>40</b>
<b>Tableau VI :</b>	<b>Séparation des espèces arséniées en mode gradient.....</b>	<b>42</b>
<b>Tableau VII :</b>	<b>Conditions chromatographiques initiales (d'après Kolhmeyer <i>et al.</i> (2002)).....</b>	<b>51</b>
<b>Tableau VIII :</b>	<b>Niveaux des facteurs du plan d'expériences .....</b>	<b>53</b>
<b>Tableau IX :</b>	<b>Plan fractionnel et complémentaire 2<sup>7-4</sup> (séparation 7 espèces) .....</b>	<b>54</b>
<b>Tableau X :</b>	<b>Récapitulatif des facteurs et interactions influents (7 espèces) .....</b>	<b>70</b>
<b>Tableau XI :</b>	<b>Conditions chromatographiques optimales (7 espèces) .....</b>	<b>71</b>
<b>Tableau XII :</b>	<b>Récapitulatif des facteurs et interactions influentes (9 espèces) .....</b>	<b>74</b>
<b>Tableau XIII :</b>	<b>Conditions chromatographiques optimales (9 espèces) .....</b>	<b>75</b>
<b>Tableau XIV :</b>	<b>Récapitulatif des méthodes d'extraction dans la littérature.....</b>	<b>80</b>
<b>Tableau XV :</b>	<b>Programme d'extraction MAE .....</b>	<b>89</b>
<b>Tableau XVI :</b>	<b>Résultats de l'étude préliminaire .....</b>	<b>94</b>
<b>Tableau XVII :</b>	<b>Taux de récupération (%) d'As total et des espèces As certifiés pour 5 MRC.....</b>	<b>95</b>
<b>Tableau XVIII :</b>	<b>Teneurs des espèces As pour les 2 conditions d'extraction dans 5 MRC(mg kg<sup>-1</sup>).....</b>	<b>96</b>
<b>Tableau XIX :</b>	<b>Teneurs observées dans la littérature sur 3 CRM (mg kg<sup>-1</sup>).....</b>	<b>98</b>
<b>Tableau XX :</b>	<b>Résultats linéarité et stabilité .....</b>	<b>100</b>
<b>Tableau XXI :</b>	<b>Évaluation des limites de quantification initiales .....</b>	<b>101</b>
<b>Tableau XXII :</b>	<b>Évaluation et vérification des limites et de détection de quantification .....</b>	<b>102</b>
<b>Tableau XXIII :</b>	<b>Évaluation de la spécificité .....</b>	<b>105</b>
<b>Tableau XXIV :</b>	<b>Évaluation de la justesse .....</b>	<b>106</b>
<b>Tableau XXV :</b>	<b>Évaluation de la répétabilité et test de Cochran.....</b>	<b>107</b>
<b>Tableau XXVI :</b>	<b>Résultats dans des produits de la pêche (n = 5) .....</b>	<b>109</b>
<b>Tableau XXVII :</b>	<b>Teneurs en As dans les échantillons aqueux (µg L<sup>-1</sup>) .....</b>	<b>110</b>
<b>Tableau XXVIII :</b>	<b>Teneurs observées en As dans le DOLT 4 (mg kg<sup>-1</sup>).....</b>	<b>111</b>
<b>Tableau XXIX :</b>	<b>Teneurs en AB obtenues dans le DORM 2 et le DOLT 4 avec ou sans dilution. ....</b>	<b>112</b>
<b>Tableau XXX :</b>	<b>Études <i>in vitro</i> ayant évalué la bioaccessibilité de l'As dans des matrices environnementales .....</b>	<b>120</b>
<b>Tableau XXXI :</b>	<b>Teneurs des espèces As dans les lixiviats de salive de 3 MRC (mg kg<sup>-1</sup>).....</b>	<b>141</b>
<b>Tableau XXXII :</b>	<b>Pourcentages bioaccessibles des espèces As dans les 3 MRC (%) ..</b>	<b>141</b>

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>
-------------------------------

**AB** : Arsénobétaïne  
**AB2** : Arsénobétaïne 2 ou Triméthylarsoniopropionate (TMAP)  
**AC** : Arsénocholine  
**AFNOR** : Agence Française de NORmalisation  
**AFS** : Spectrométrie à fluorescence atomique (ou Atomic Fluorescence Spectrometry)  
**AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
**Ar** : Argon  
**As** : Arsenic  
**As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** : Oxyde d'arsenic  
**As(III)** : Arsénite  
**As(V)** : Arséniate  
**ASE** : Extraction accélérée par solvant (ou Accelerated Solvant Extraction)  
**AsH<sub>3</sub>** : Arsine  
**BARGE** : Groupe européen de recherche sur la biodisponibilité (ou BioAvailability Research Group Europe)  
**BDSA** : Acide Benzène 1,2-disulfonique  
**BFD** : Maladie des pieds noirs (ou Blackfoot disease)  
**Bi** : Bismuth  
**C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N** : Acétonitrile  
**C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>** : Acide tartrique  
**C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N** : Pyridine  
**C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>** : Acide citrique  
**CCA** : Complexe cuivre/chrome/arsenic  
**CCT** : Collision Cell Technology  
**CE** : Electrophorèse capillaire (ou Capillary Electrophoresis)  
**CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Acide formique  
**CH<sub>3</sub>COOH** : Acide acétique  
**CH<sub>3</sub>COONa** : Sel ithanoïque de sodium  
**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme  
**CIME** : Unité des Contaminants Inorganiques et Minéraux dans l'Environnement  
**CIRC** : Centre International de Recherche contre le Cancer  
**Cl** : Chlore  
**Cps** : Coups par seconde  
**CRL-HM** : Community Reference Laboratory for Heavy Metals in feed and food  
**CT** : Trappe cryogénique (ou Cryogenic trapping)  
**CV<sub>r</sub>** : coefficient de variation de répétabilité moyen  
**CV<sub>R</sub>** : Coefficient de reproductibilité moyen  
**CQI** : Contrôles Qualité Interne  
**DERNS** : Direction l'Evaluation des Risques Nutritionnels et Sanitaires  
**DGAI** : Direction Générale de l'Alimentation  
**DGS** : Direction Générale de la Santé  
**DMA** : Acide diméthylarsinique  
**EDTA** : Acide éthylène-diamine-tétraacétique  
**EPA** : Agence de protection de l'environnement (ou Environmental Protection Agency)  
**ES** : Electrospray  
**EtOH** : Ethanol  
**FI** : Injection en flux continu  
**GC** : Chromatographie en phase gazeuse (ou Gaz Chromatography)

**GF** : Four (ou Graphite Furnace)  
**H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>** : Acide oxalique  
**H<sub>2</sub>O** : Eau  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène  
**H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>4-</sup>** : Ion dihydrogénéorthophosphate  
**HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : Ion hydrogénéorthophosphate  
**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>** : Acide orthophosphorique  
**HCl** : Acide chlorhydrique  
**HG** : Génération d'hydrure (ou Hydride Generation)  
**HNO<sub>3</sub>** : Acide nitrique  
**HPLC** : Chromatographie liquide haute performance (ou High Performance Liquid Chromatography)  
**IARC** : International Agency for Research on Cancer  
**IC** : Intervalle de Confiance  
**ICP-AES** : Plasma induit couplé à la Spectrométrie d'Emission Atomique (ou Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy)  
**ICP-MS** : Plasma induit couplé à la Spectrométrie de masse (ou Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry)  
**IEC** : Chromatographie à échange d'ions (ou Ion Exchange Chromatography)  
**IUPAC** : International Union of Pure and Applied Chemistry  
**INERIS** : Institut National de l'Environnement industriel et des RISques  
**K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Sulfate de potassium  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Dihydrogénophosphate de potassium  
**LERH** : Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Hydrologie  
**LERQAP** : Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés alimentaires  
**LD** : Limite de Détection  
**LD<sub>50</sub>** : Dose létale de 50 % d'une population donnée  
**Liq/Sol** : Extraction liquide/solide  
**LNR** : Laboratoire National de Référence  
**LQ** : Limite de Quantification  
**MA** : Acide monométhylarsonique  
**MAE** : Extraction assistée par micro-ondes (ou Micro-waves Assisted Extraction)  
**MeOH** : Méthanol  
**MES** : Acide 4-morpholine-éthanosulfonique  
**min** : Minute  
**MRC** : Matériaux de Référence Certifiés  
**MS** : Spectrométrie de masse (ou Mass Spectrometry)  
**m/z** : Masse sur charges  
**N** : Azote  
**n** : Nombre d'essais  
**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium  
**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : Phosphate de sodium disodique  
**NaCl** : Chlorure de sodium  
**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate de sodium monobasique  
**NaHCO<sub>3</sub>** : Bicarbonate de sodium  
**NaOH** : Hydroxyde de sodium  
**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate d'ammonium  
**NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>** : Bicarbonate ammonique  
**NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate d'ammonium  
**NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>** : Nitrate d'ammonium

**NIT** : Nitarsonsone  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé (ou World health organization », WHO)  
**p** : Niveaux de concentrations  
**P** : Phosphore  
**p-ASA** : Acide p-arsanilique  
**PEEK** : Polyétheréthercétone  
**PLE** : Extraction liquide sous pression (ou Pressure Liquid Extraction)  
**PM** : Phase Mobile  
**PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>** : Phosphate  
**PTFE** : Polytétrafluoréthylène  
**R** : Résolution  
**ROX** : Roxarsonsone  
**S** : Sensibilité  
**Se** : Sélénium  
**SAA** : Spectroscopie d'Absorption Atomique (ou Absorption Atomic Spectrometry, AAS)  
**Sb** : Antimoine  
**T** : Temps d'analyse  
**TFA** : Acide trifluoroacétique  
**TMAH** : Hydroxyde de tétraméthylammonium  
**TMAO** : Oxyde de triméthylarsine  
**TMAP** : Triméthylarsoniopropionate ou Arsénobétaïne 2 (AB2)  
**TMA<sup>+</sup>** : Ion tétraméthylarsonium  
**tr** : Temps de rétention  
**TRA** : Mode temps résolu (ou Time-Resolved-Analysis)  
**UERPC** : Unité d'Evaluation des Risques Physico-Chimiques  
**v/v** : Volume sur volume  
**ω<sub>a</sub>** : Largeur des pics  
**Ø** : Diamètre

**PUBLICATIONS****Articles publiés**

**Dufailly, V., L. Noël, J-M. Frémy, D. Beauchemin et T. Guérin (2007)** "Optimisation by experimental design of an HPLC/ICP-MS speciation method for arsenic in fish products following microwave assisted extraction." *J. Anal. At. Spectrom.* 22: 1168-1173.

**Dufailly, V., L. Noël et T. Guérin (2008)** "Optimisation and critical evaluation of a collision cell technology ICP-MS system for the determination of arsenic in foodstuffs of animal origin." *Anal. Chim. Acta* 611: 134-142.

**Dufailly, V., T. Guérin, L. Noël, J-M. Frémy et D. Beauchemin (2008)** "Simple method for the speciation analysis of bioaccessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry." *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* *J. Anal. At. Spectrom.* 23: 1263-1268.

**Articles soumis**

**Dufailly, V., L. Noël, J-M. Frémy, D. Beauchemin et T. Guérin (2008)** "Arsenic speciation by IEC/ICPMS in seafood samples following microwave-assisted extraction and comparison with bioaccessible data." *Soumis à Anal. Chim. Acta.*



## COMMUNICATIONS

### Communications orales

Dufailly, V., L. Noël, J-M. Frémy, D. Beauchemin et T. Guérin "Optimisation par plan d'expériences d'une méthode de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche par couplage HPLC/ICP-MS." Spectr'Atom 2007, 21-24 mai 2007, Pau, France.

Dufailly, V., T. Guérin, L. Noël, J-M. Frémy et D. Beauchemin "Development of a robust method to assess the speciation of arsenic in seafood." 34<sup>th</sup> Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopic Societies (34<sup>th</sup> FACSS 2007), october 14-18 2007, Memphis, TN, USA.

Dufailly, V., T. Guérin, L. Noël, J-M. Frémy et D. Beauchemin "Évaluation de la bio-accessibilité de composés arséniés dans les produits de la pêche en combinant lixiviation en continu et spéciation par couplage IEC/ICP-MS." 10<sup>th</sup> Annual Chemistry and Biochemistry Graduate Research Conference Concordia University, november 23-24 2007, Montréal, QC, Canada. **"Best analytical presentation" prize.**

Dufailly, V., L. Noël, J-M. Frémy, D. Beauchemin et T. Guérin "Arsenic speciation in seafood by IEC-ICP-MS: risk assessment contribution by estimating its bio-accessibility and exposure. " 2nd International Congress "Arsenic in the environment: Arsenic from nature to humans", may 21-23 2008, Valencia, Spain.

Dufailly, V., T. Guérin, L. Noël, J-M. Frémy et D. Beauchemin "Simple method for risk assessment of arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. " EnviroAnalysis 2008, june 23-25 2008, Toronto, ON, Canada.

Dufailly, V., T. Guérin, L. Noël, J-M. Frémy et D. Beauchemin "Spéciation et bio-accessibilité de l'Arsenic dans les produits de la pêche par couplage IEC-ICP-MS." 54<sup>th</sup> ICASS 2008, 3-6 août 2008, Montréal, QC, Canada.

**Communications affichées**

**Dufailly, V.**, L. Noël, J-M. Frémy, D. Beauchemin et T. Guérin "Simultaneous determination of 9 arsenic species by high performance liquid chromatography / inductively coupled plasma mass spectrometry." The 2007 European Winter Plasma, february 18-23 2007, Taormina, Sicily, Italy.

**Dufailly, V.**, L. Noël, J-M. Frémy, D. Beauchemin et T. Guérin "Optimisation par plan d'expériences d'une méthode de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche par couplage HPLC/ICP-MS." SEP07, 20-22 mars 2007, Grenoble, France.

**Dufailly, V.**, T. Guérin, **L. Noël**, J-M. Frémy et D. Beauchemin "Determination of bio-accessible arsenic species in seafood by combination of fast continuous leaching and IEC/ICP-MS speciation." 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, november 7-9, 2007, Prague, Czech Republic.

**Dufailly, V.**, T. Guérin, L. Noël, J-M. Frémy et **D. Beauchemin** "Simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry." 2008 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, january 7-12 2008, Temecula, CA, USA.

**Dufailly, V.**, T. Guérin, L. Noël, J-M. Frémy et **D. Beauchemin** "Simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry." Food Safety Research Forum, Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (OMAFRA), april 23 2008, Guelph, ON, Canada.

**Dufailly, V.**, **L. Noël**, J-M. Frémy, D. Beauchemin et T. Guérin "Arsenic speciation in seafood by IEC-ICP-MS: risk assessment contribution by estimating its bio-accessibility and exposure." 4<sup>th</sup> International Conference on Trace Element Speciation in Biomedical, Nutritional and Environmental Sciences, may 25- 29 2008, Munich-Neuherberg, Germany.

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

« *Quod acre venenum aliis, aliis est medecina* » (« Ce qui est un poison violent pour certains, est un remède pour d'autres »). Ce proverbe latin illustre bien le caractère ambigu de l'arsenic considéré dans l'inconscient collectif comme le poison par excellence. Cette image est relayée par diverses références qu'elles soient historiques (L'affaire Lavoisin sous le règne de Louis XIV, la thèse de l'empoisonnement de Napoléon ou l'affaire Marie Besnard), romanesques (Madame Bovary) ou même cinématographiques (« *Arsenic and old lace* »). Mais ces sources omettent un fait important : les formes d'arsenic sont diverses et ne renferment pas toutes les mêmes propriétés toxicologiques ou la même capacité d'absorption par l'organisme.

La présence de l'arsenic dans l'environnement, notamment dans les produits de la pêche, représente un risque potentiel pour la consommation humaine. Le principe de la démarche d'évaluation du risque sanitaire s'effectue en quatre étapes qui sont l'identification du danger, l'étude des relations doses-réponse, l'estimation de l'exposition humaine et la caractérisation du risque pour la santé. (WHO/FNU/FOS,1995) Cette dernière nécessite une connaissance approfondie des effets du contaminant chimique sur le fonctionnement de l'organisme et des doses à partir desquelles le contaminant représente un danger ainsi qu'une estimation quantifiée de l'exposition. Néanmoins, les agences gouvernementales évaluent généralement les risques alimentaires liés à la présence d'arsenic dans les produits de la pêche en analysant uniquement l'arsenic élémentaire, sans prendre en compte les différentes formes en présence ni leur biodisponibilité. Ainsi, un aliment peut être déclaré impropre à la consommation alors que les formes arséniées qu'il contient ne sont peut-être pas considérées comme toxiques ou ne sont pas absorbées par l'organisme. La mise en évidence des différences de toxicité et d'absorption par l'organisme selon les formes arséniées imposent donc, à tous les acteurs soucieux de l'amélioration de la sécurité sanitaire des aliments destinés à l'homme, la mise au point de méthodes de spéciation et d'évaluation de la biodisponibilité de l'As dans ces matrices alimentaires. Le terme « d'analyse de spéciation » est défini comme l'ensemble des activités analytiques d'identification et/ou de dosage des quantités d'une ou plusieurs espèces chimiques d'un même élément dans un échantillon. (IUPAC, Templeton *et al.*, 2000)

L'objectif principal de cette étude a donc été de mettre au point une méthode permettant à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), une meilleure évaluation des risques encourus par le consommateur en déterminant d'une part la spéciation des différentes formes arséniées présentes dans les produits de la pêche, d'autre part, leur bioaccessibilité. Les résultats des travaux de thèse sont présentés dans ce mémoire sous forme d'articles publiés ou soumis. Ces travaux s'articulent en quatre parties distinctes.

La première partie présentera le contexte général et la problématique liés à la présence de l'arsenic dans l'environnement. Nous exposerons les propriétés physico-chimiques, les sources d'émission, les différentes formes, l'exposition humaine et la toxicité de cet élément.

La deuxième partie sera consacrée à l'optimisation par la méthodologie des plans d'expériences d'une méthode de séparation, par couplage entre une séparation par échange d'ions (IEC) et une détection par ICP-MS, des principaux composés arséniés susceptibles d'être retrouvés dans les produits de la pêche. Après une étude exhaustive de l'état de l'art des diverses méthodes de séparation et de détection de l'As dans les matrices environnementales justifiant les choix analytiques adoptés, nous présenterons les résultats de l'évaluation de l'influence des paramètres étudiés et de leurs interactions éventuelles sur la séparation des composés arséniés ainsi que la détermination des conditions chromatographiques optimales. (Article I)

Le développement d'une méthode de mise en solution douce par extraction assistée par micro-ondes des espèces arséniées présentes dans les produits de la pêche constituera le troisième volet de ces travaux. Cette méthode d'extraction doit permettre l'extraction quantitative des formes arséniées présentes sans perte ou modification des espèces initialement présentes dans l'échantillon. Dans un premier temps, nous présenterons une étude bibliographique des méthodes d'extraction de l'arsenic testées dans les matrices biologiques. Ensuite, nous nous intéresserons aux résultats expérimentaux de l'optimisation des conditions d'extraction de l'As dans des produits de la pêche à l'aide de matériaux de référence certifiés (MRC) puis à l'évaluation des critères analytiques de la méthode optimisée selon les normes en vigueur. (Article III)

Enfin, nous découvrirons deux applications qui ont pu être opportunément menées au cours de ces travaux, l'une portant sur l'analyse d'eaux minérales, afin d'évaluer cette méthode sur des matrices chargées en sels autres que des produits de la pêche et, l'autre sur la certification d'un échantillon de foie d'aiguillat (*Squalus acanthias*) organisée par le NRC canadien.

La quatrième et dernière partie de ce mémoire sera consacrée à l'évaluation de la bioaccessibilité de l'As et de ses différentes formes arséniées dans les produits de la pêche. Cette évaluation a été réalisée par la mise en place d'une méthode *in vitro* de lixiviation en continu associée à la méthode de spéciation de l'As optimisée dans les parties précédentes. (Article II) Cette méthode en continu a également été comparée à une méthode statique (ou batch) plus classiquement utilisée dans la littérature.

## **PARTIE I.**

### **PROBLÉMATIQUE DE L'ARSENIC**

## I. 1. Généralités

### I. 1. 1. Propriétés

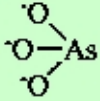
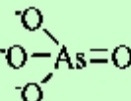
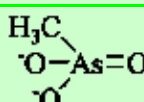
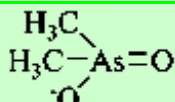
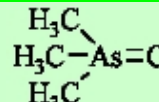
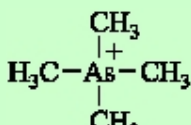
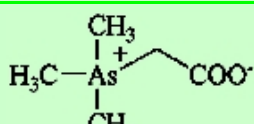
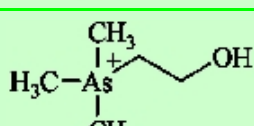
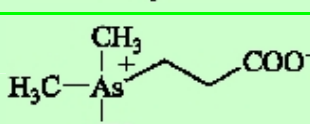
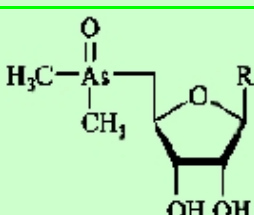
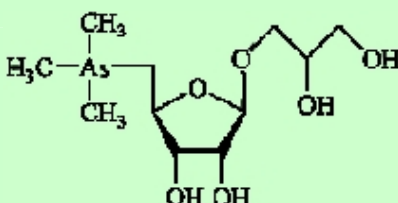
L'arsenic (As) est un métalloïde dont le nom vient du mot grec *arsenikon* (correspondant au sulfure d'arsenic : l'orpiment) signifiant "*qui dompte le mâle*", en raison de sa forte toxicité. Il est admis que l'alchimiste allemand Albertus Magnus (1193-1280) est le premier à avoir isolé l'élément As en chauffant du savon avec de l'orpiment. À l'état naturel, l'As est un solide sous sa forme élémentaire, mais on le retrouve le plus souvent, seul ou associé à divers autres métaux, dans des composés soufrés. (Boyle et Jonasson, 1973)

Selon la classification périodique du tableau de Mendeleïev, l'As (numéro atomique : 33, masse molaire : 74,92 g mol<sup>-1</sup>) est le troisième élément de la colonne 15 qui regroupe également l'azote (N), le phosphore (P), l'antimoine (Sb) et le bismuth (Bi). L'As peut se présenter sous de nombreux états de valence en raison de sa structure électronique ([Ar] 3d<sup>10</sup> 4s<sup>2</sup> 4p<sup>3</sup>) avec 3 électrons non appariés sur sa couche électronique externe. Ainsi, l'As existe dans l'environnement sous différents degrés d'oxydation : -III, 0, +III et +V. (Francesconi et Kuehnelt, 2004) En tant que métalloïde, l'As possède à la fois des propriétés métalliques et non métalliques, et présente des caractéristiques communes avec le phosphore.

### I. 1. 2. Les différentes formes arséniées

Actuellement, plus de 25 espèces arséniées ont été identifiées dans l'environnement et la biosphère, ayant des toxicités très différentes. (Vélez *et al.*, 2001) Le tableau I présente les noms, les acronymes et les structures chimiques de ces principales espèces arséniées.

**Tableau I :** Noms, acronymes et structures chimiques des principales espèces arséniées (d'après Francesconi et Kuehnelt, 2004)

Noms	Acronymes	Structure chimique
Arsénite	As (III)	
Arsenate	As (V)	
Acide monométhylarsonique	MA	
Acide diméthylarsinique	DMA	
Oxyde de triméthylarsine	TMAO	
Ion triméthylarsine	TMA <sup>+</sup>	
Arsénobétaïne	AB	
Arsénocholine	AC	
Triméthylarsoniopropionate	TMAP ou AB2	
Arséno-sucres diméthylés : Arséno-sucre 1 R = OH Arséno-sucre 2 R = OP(O)(O <sup>-</sup> )OCH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH Arséno-sucre 3 R = SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Arséno-sucre 4 R = OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		
Arséno-sucre triméthylés (Arséno-sucre 9)		



La présence et la répartition des différentes formes d'arsenic sont influencées par les conditions du milieu considéré (pH, oxydoréduction, réactions cinétiques). Les pKa et les formes prédominantes, selon le pH des 7 principaux composés As sont présentés dans le tableau II.

**Tableau II :** pKa et formes prédominantes selon le pH des composés As (d'après Suner *et al.*, 2001)

Espèces	pKa	pH→	1	2	3	4	5	6	7	8
As(III)	9,2	H <sub>2</sub> AsO <sub>3</sub>								
MA	3,6 / 8,2	Me-AsO(OH) <sub>2</sub>			Me-AsO <sub>2</sub> (OH) <sup>-</sup>					
DMA	1,3 / 6,3	Et-As <sup>+</sup> (OH) <sub>2</sub>	Et-AsO(OH)				Et-AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>			
As(V)	2,3 / 6,7 / 11,6	H <sub>3</sub> AsO <sub>4</sub>		H <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub> <sup>-</sup>			HAsO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>			
AB	2,2	Pro-As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> COOH		Pro-As <sup>+</sup> CHCOO <sup>-</sup>						
TMAO	3,6	Pro-As <sup>+</sup> OH			Pro-AsO					
AC	-	Pro-As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH								

Les dérivés arséniés sont classés en deux familles distinctes : les composés inorganiques et les composés organométalliques.

#### I. 1. 2. a. Les formes inorganiques

L'arsénite trivalente (As<sup>III</sup>) et l'arséniate pentavalente (As<sup>V</sup>) sont les deux espèces inorganiques largement présentes dans l'environnement. Ces deux composés sont facilement inter convertibles par oxydoréduction et sont donc généralement retrouvés conjointement. Cependant, As(V) est l'espèce thermodynamiquement majoritaire dans des conditions environnementales oxydantes. (Cullen et Reimer, 1989) Les quantités retrouvées de ces deux espèces dans les organismes marins sont souvent faibles (inférieures à 5 % de l'As total). (Edmonds et Francesconi, 1993)

*I. 1. 2. b. Les composés organométalliques**I. 1. 2. b. i. Les formes méthylées*

L'acide monométhylarsonique (MA), l'acide diméthylarsinique (DMA), l'oxyde de triméthylarsine (TMAO), l'ion tetraméthylarsonium ( $\text{TMA}^+$ ) appartiennent au groupe des formes méthylées. Les formes MA et DMA sont couramment retrouvées dans l'environnement. Ils proviennent généralement de la réduction et la bio-méthylation de As(V) favorisant l'élimination de l'arsenic dans certains organismes. (Ng *et al.*, 2003) Les composés TMAO et  $\text{TMA}^+$  sont fréquemment quantifiés dans les organismes marins même si les teneurs retrouvées sont généralement peu importantes.

*I. 1. 2. b. ii. Les formes organiques*

L'arsénobétaïne (AB), l'arsénocholine (AC) ou le triméthylarsoniopropionate (TMAP, aussi appelé arsénobétaïne 2 (AB2) en raison de sa structure chimique proche de AB) appartiennent aux groupes des formes organiques. L'AB est la forme arséniée majoritaire dans les organismes marins en représentant en moyenne 80 % de la quantité totale d'As présent. (Francesconi et Edmonds, 1997) En revanche, cette espèce ne semble pas présente dans les algues et l'eau de mer. (Sloth, 2004) L'AC est généralement présent à l'état de traces dans les organismes marins. En effet, Francesconi et Edmonds (1997) ont montré que cette espèce pourrait représenter un produit intermédiaire de AB dans les processus de bio-transformation au sein des organismes marins. Les travaux de Francesconi *et al.* (2000) ont permis pour la première fois d'identifier la forme TMAP (ou AB2) dans des poissons.

*I. 1. 2. b. iii. Autres formes*

Les organo-sucres (les 4 principaux sont présentés dans le tableau I) représentent la plus importante source d'arsenic dans les algues. Ces espèces ont aussi été identifiées dans d'autres organismes marins, mais les travaux de Francesconi et Edmonds (1997) ont indiqué que leurs présences seraient dues à la consommation d'algues. D'autres formes telles que les arséno-lipides, ou les sulfures d'arsenic (DMAS ou dérivés d'organo-sucres) ont fait l'objet d'un nombre limité d'études. (Hanaoka *et al.*, 2001a; Hansen *et al.*, 2004; Fricke *et al.*, 2004)

Enfin, les composés aromatiques arséniés, tels que l'acide 4-hydroxy 3-nitro benzène arsenic (Roxarsone, ROX), l'acide nitro-4-phenylarsonique (Nitarzone, NIT) ou l'acide 4-aminobenzène arsenic (acide p-arsanilic, p-ASA), sont utilisés comme additifs alimentaires dans l'industrie de la volaille pour prévenir la coccidiose et augmenter la prise de poids et la production d'œufs. (Pergantis *et al.*, 1997 ; Jackson et Bertsch, 2001 ; Jackson *et al.*, 2003)

### I. 1. 3. Source d'émission

L'As est un élément ubiquiste présent dans l'atmosphère, les sols, les sédiments, les milieux aquatiques et la biosphère. (Cullen et Reimer, 1989)

#### I. 1. 3. a. Sources naturelles

L'As est introduit dans l'environnement par l'érosion des roches, les précipitations, l'activité volcanique et la combustion des matériaux fossiles et des forêts. (Cullen et Reimer, 1989 ; Smedley et Kinniburgh, 2002 ; Mandal et Suzuki, 2002 ; Kim *et al.*, 2003 ; Wang et Mulligan, 2006) Il est le vingtième élément le plus abondant dans la croûte terrestre ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$  en moyenne). (Cullen et Reimer, 1989 ; Mandal et Suzuki, 2002) La concentration de l'As dans les sols varie ( $5\text{-}6 \text{ mg kg}^{-1}$  en moyenne) selon la nature de la roche source (Mandal et Suzuki, 2002 ; Wang et Mulligan, 2006)

#### I. 1. 3. b. Sources anthropiques

Les industries du secteur primaire et secondaire constituent les activités humaines qui contribuent (ou ont contribué) aux apports anthropiques d'As dans l'environnement.

Les fumées émanant des industries de production d'oxyde d'arsenic ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) et de la combustion de produits fossiles (charbons, pétroles, huiles) sont les sources majeures de l'As anthropique atmosphérique. (Pichard *et al.*, 2005) L'As étant présent à de fortes proportions dans différents minerais métalliques, les résidus de l'activité minière conduisent à une pollution importante par lessivage des déchets miniers et infiltration des eaux. (Lombi *et al.*, 2000)

Les composés arséniés ont été utilisés massivement dans le domaine agricole jusque dans les années 1970, mais leur utilisation a tendance à décliner depuis. (Mandal et Suzuki, 2002 ; Fengxiang *et al.*, 2003) L'arsenic rentre encore dans la fabrication d'herbicides, raticides, fongicides et insecticides même si son utilisation a diminué après l'avènement des pesticides organochlorés et organophosphatés. (Cullen et Reimer, 1989 ; Pichard *et al.*, 2005) De nouvelles pollutions ont fait leur apparition avec l'utilisation de l'arsenic dans la fabrication d'antibiotiques (acide 4-hydroxy 3-nitrobenzènearsenic (Roxarsone, ROX), l'acide nitro-4-phenylarsonique (Nitarsonne, NIT) et acide 4-aminobenzènearsenic (acide p-arsanilic, p-ASA)) pour l'élevage de volailles dans certains pays. (Jackson et Bertsch, 2001) Les travaux de Bednar *et al.* (2003) ont montré que ces composés pouvaient être dégradés en espèces inorganiques (toxiques et mobiles) par les nitrates et la matière organique contenus dans les déjections des volailles. L'As est aussi beaucoup employé dans l'industrie du bois sous forme de complexe cuivre/chrome/arsenic (CCA). (Cullen *et al.*, 1984) Aux États-Unis, l'EPA (Environmental Protection Agency) a interdit l'usage des CCA dans le domaine privé (US EPA, 2002). Enfin, l'As est aussi utilisé comme : composant dans les batterie électriques (améliore la résistance à la corrosion électrique), semi conducteur, agent décolorant (industrie du verre) (Pichard *et al.*, 2005) ou pigment de peinture ( $\text{CuAsO}_4$ ). (Choong *et al.*, 2007) Il est aussi couramment employé dans le domaine médical. (Mandal et Suzuki, 2002)

#### I. 1. 4. L'arsenic dans l'environnement

##### *I. 1. 4. a. Arsenic dans l'atmosphère*

La production d' $\text{As}_2\text{O}_3$ , le raffinage des minerais de cuivre, la combustion du charbon et du pétrole représentent les contributions les plus importantes d'arsenic à la pollution atmosphérique. (Pichard *et al.*, 2005 ; Matschullat, 2000 ; Ding *et al.*, 2001) La concentration moyenne d'arsenic dans l'air est inférieure à  $4 \text{ ng m}^{-3}$  pour les zones reculées et en milieu rural alors qu'elle peut atteindre des valeurs supérieures à  $50 \text{ ng m}^{-3}$  dans certaines zones urbaines européennes (European Commission, 2001). D'autre part, des concentrations beaucoup plus importantes ( $> 1000 \text{ ng m}^{-3}$ ) ont pu être relevées à proximité de sites industriels aux États-Unis (WHO, 2001).

#### *I. 1. 4. b. Arsenic dans les sols*

La nature, la concentration la mobilité et la disponibilité de l'As présent dans les sols sont étroitement liées aux conditions chimiques (pH et potentiel redox) du milieu considéré, et à la présence d'espèces inorganiques ou organiques capables de retenir l'As. (Seidel *et al.*, 2002) La forme inorganique As(V), retenue par sorption ou précipitation avec les hydroxydes de fer, de manganèse et d'aluminium, est l'espèce majoritaire dans les sols présentant des conditions oxydantes. (Smedley et Kinniburgh, 2002) À l'inverse, dans les milieux réducteurs et acides, les oxydes de As(III) et les sulfures d'arsenic se présentent comme les formes les plus stables. (Sadiq, 1997)

D'autre part, l'activité microbienne joue également un rôle important dans la répartition de l'As dans les sols. En effet, certains micro-organismes sont capables de réduire ou d'oxyder l'arsenic minéral. (Ahmann *et al.*, 1997) Ainsi, les formes MA, DMA et TMAO peuvent être retrouvées dans certains sols suite à la bio-méthylation des espèces inorganiques par ce type de micro-organismes. Néanmoins, la présence de ces composés est aussi liée en partie à l'activité agricole (pesticides et fertilisants). (Lombi *et al.*, 2000) De plus, la réduction du Fe(III) en Fe(II) par des bactéries spécifiques dans les zones anoxiques entraînerait le relargage de l'As(V) adsorbé.

#### *I. 1. 4. c. Arsenic dans les eaux*

La concentration moyenne de l'As total dans l'eau de mer est de l'ordre de 1 à 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ . (Nakazato *et al.*, 2000) Dans les eaux douces, la teneur moyenne en As total est inférieure à 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  (sauf en cas de pollution anthropogénique spécifique à certaines régions). (Mandal et Suzuki, 2002 ; Smedley et Kinniburgh, 2002) Les eaux souterraines présentent généralement des teneurs similaires même si certaines eaux peuvent atteindre 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . (Gong *et al.*, 2006) La présence de l'arsenic dans ces eaux est liée à sa mobilisation dans les sols. Les conditions géochimiques du sol traversé par les eaux douces conditionnent la concentration en arsenic. (Kim *et al.*, 2003 ; Smedley et Kinniburgh, 2002) La dissolution et la spéciation de l'As dans les eaux naturelles sont gouvernées principalement par des facteurs physico-chimiques (pH, réactions redox, etc.). Ainsi, les formes As inorganiques sont les composés majoritaires dans les eaux. (Daus *et al.*, 2000) Néanmoins, les espèces As organiques peuvent être rencontrées (généralement en faible concentration) dans les milieux aquatiques possédant une activité microbienne importante. (Smedley et Kinniburgh, 2002)

En effet, l'activité biologique (tout comme dans les sols) peut entraîner la réduction de As(V) en As(III) ou la méthylation des composés inorganiques en MA ou DMA. (Guérin, 1998)

Des zones aquifères dans nombreuses régions du monde (Argentine, Bangladesh, Chili, Chine, Hongrie, Inde (région du West Bengale), Mexique, Roumanie, Taiwan, Vietnam et de nombreuses régions des États-Unis) présentent des concentrations importantes en As ( $> 50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Néanmoins, en terme d'exposition de la population, les pays les plus sérieusement touchés par les problèmes de contaminations d'arsenic dans les eaux restent l'Inde et le Bangladesh. (Smedley et Kinniburgh, 2002)

La concentration en As dans les eaux souterraines peut atteindre  $3,2 \text{ g L}^{-1}$  dans certaines parties de ces régions. (Smedley et Kinniburgh, 2002) Jusqu'à 90 % des puits sont infectés dans les districts les plus touchés du sud-est du Bangladesh. La population exposée à des eaux fortement chargées en arsenic est estimée à 35 millions au Bangladesh et à 6 millions dans la région du West Bengale où environ 5000 patients ont été identifiés comme présentant une intoxication à l'arsenic. (Smedley et Kinniburgh, 2002)

## I. 2. Toxicité de l'arsenic

La toxicité de l'As dépend de sa forme chimique et de son degré d'oxydation. Le composé minéral le plus toxique est l'arsine ( $\text{AsH}_3$ ) qui se présente sous forme de gaz. Une inhalation supérieure à  $250 \text{ mg m}^{-3}$  d'air de ce gaz est fatal quasi instantanément. (Bissen et Frimmel, 2003) Les doses létales ( $\text{LD}_{50}$ ) des espèces arséniées d'intérêt chez la souris ou le hamster sont répertoriées dans le tableau III.

**Tableau III :** Doses létales des différents composés arséniés chez la souris et le hamster (d'après Hugues, 2002)

Espèce	Animal	$\text{LD}_{50}$ ( $\text{mg As kg}^{-1}$ )
$\text{As}_2\text{O}_3$	Souris	26
As(III)	Souris	8
As(III)	Hamster	8
As(V)	Souris	22
$\text{MMA}^{\text{III}}$	Hamster	2
MMA	Souris	916
DMA	Souris	648
TMAO	Souris	5500
AB	Souris	$> 4260$

Le classement des toxicité des espèces selon les LD50 est donc le suivant :  $\text{MMA}^{\text{III}} > \text{As}(\text{III}) > \text{As}(\text{V}) > \text{As}_2\text{O}_3 > \text{DMA} > \text{MMA} > \text{AB} > \text{TMAO}$ . Généralement, la forme As(III) est considérée comme plus toxique que la forme As(V) (elle est 60 fois plus toxique selon Jain et Ali (2000)). Historiquement, la méthylation de ces deux formes inorganiques est présentée comme un mécanisme de détoxification dans la mesure où les formes méthylées MA et DMA sont considérées comme moins toxiques que les formes inorganiques. (Gebel, 2002)

Cependant, des travaux récents tendent à remettre en cause cette hypothèse en montrant que les formes trivalentes de MA et DMA pourraient être plus toxiques que As(III). (Petrick *et al.*, 2000 ; Aposhian *et al.*, 2000 ; Styblo *et al.*, 2000 et 2002 ; Dopp *et al.*, 2004 ; Hirano *et al.*, 2004) À l'inverse des espèces inorganiques, les formes organiques telles que AB, AC, TMAO,  $\text{TMA}^+$  ou les arsénosucres ne sont toxiques qu'à très hautes doses. (Kaise *et al.*, 1992 ; Neff, 1997) Le comité d'experts de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, ou « World Health Organization », WHO) a conclu que les espèces organiques arséniées n'entraînent pas de risques significatifs pour la santé du consommateur. (WHO, 2001)

### I. 2. 1. Devenir dans l'organisme humain

L'arsenic absorbé par voie orale se distribue dans tous les organes. Néanmoins, en cas d'intoxication aiguë, les concentrations les plus importantes sont retrouvées dans le foie et les reins, les cheveux et les ongles. (Pichard *et al.*, 2005) Les espèces inorganiques absorbées passent par une phase de méthylation pour faciliter leur élimination. (Gebel, 2002) L'arsenic est ensuite éliminé dans les urines par les reins (élimination de 43 à 63 % de la dose absorbée en 4 à 5 jours). (Pichard *et al.*, 2005) Les matières fécales peuvent éliminer jusqu'à 5 % de la dose absorbée par la voie orale. (Pichard *et al.*, 2005)

### I. 2. 2. Toxicité aiguë

L'empoisonnement aigu à l'arsenic est rare. Il est souvent le résultat de l'ingestion accidentelle ou suicidaire d'insecticides ou de pesticides. (Szymańska-Chabowska *et al.*, 2002)) Les effets aigus de l'ingestion d'As inorganique se manifestent rapidement par des troubles gastro-intestinaux (diarrhées, vomissements, hémorragies et douleurs abdominales), (Choong *et al.*, 2007) accompagnés d'une instabilité hémodynamique ou d'une encéphalite aiguë. (Bissen et Frimmel, 2003) Parfois, des troubles musculaires, un œdème facial ou une arythmie cardiaque peuvent aussi être observés. (Szymańska-Chabowska *et al.*, 2002)

La toxicité de l'As inorganique dépend aussi d'autres facteurs tels que l'état de santé, le régime alimentaire, l'âge, le sexe et les dispositions génétiques. Enfin, la toxicité est liée au degré d'exposition à cet élément. En effet, une dose de 0,1 à 0,3 g As jour<sup>-1</sup> est fatale à un individu non exposé à l'ingestion d'arsenic alors que la même dose pourra être supportée sans manifestation d'empoisonnement aigu par un individu soumis à une exposition chronique à l'arsenic. (Bissen et Frimel, 2003)

### I. 2. 3. Toxicité chronique

La grande majorité des effets liés aux dérivés de l'arsenic est induite par les dérivés inorganiques. L'un des organes cibles lors d'une ingestion chronique est la peau. (Choong *et al.*, 2007) L'hyperpigmentation et les kétaroses sur les paumes des mains et les plantes des pieds sont caractéristiques. (Caussy, 2003 ; Choong *et al.*, 2007) Ces effets cutanés apparaissent pour des niveaux d'exposition de l'ordre de 0,01 à 0,1 mg As kg<sup>-1</sup> jour<sup>-1</sup>. (Pichard *et al.*, 2005) Ces symptômes s'accompagnent d'effets cardiovasculaires, respiratoires, hématologiques, digestifs, neurologiques, sur le métabolisme du sucre et sur les fonctions de la reproduction. (Jain et Ali, 2000)

L'ingestion d'As contenu dans les eaux de boisson a aussi été associée à la maladie des pieds noirs (Blackfoot disease) dans le sud-ouest de Taiwan, suite à l'ingestion d'eau de boisson contenant de l'arsenic correspondant à des doses de 0,014 à 0,065 mg As kg<sup>-1</sup> jour<sup>-1</sup>. (Chiou *et al.*, 1995) Cette maladie provoque une altération progressive de la circulation sanguine périphérique des pieds, se manifestant par une sensation de froid et d'engourdissement, des ulcérations et une coloration noire de la peau. (Pichard *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 1988 et 1996 ; Tsai *et al.*, 1999) Si les études à Taiwan démontrent clairement un lien entre la maladie des pieds noirs et les apports excessifs d'arsenic par l'eau de boisson, cette observation n'a pas pu être mise en évidence dans d'autres régions. La malnutrition et/ou des co-expositions jouent aussi probablement un rôle dans l'apparition de cette maladie. (Pichard *et al.*, 2005)

### I. 2. 4. Valeurs toxicologiques de référence

Une Valeur Toxicologique de Référence (VTR) est un indice qui est établi à partir de la relation entre une dose externe d'exposition à une substance dangereuse et la survenue d'un effet néfaste. Le tableau IV présente les VTR publiées par différents organismes.



**Tableau IV** : Valeurs toxicologiques de référence (d'après Pichard *et al.*, 2005)

Source	Voie d'exposition	Facteur de sécurité	Valeur de référence	Année
WHO	Exposition chronique par voie orale	-	DHTP = $15 \cdot 10^{-3} \text{ mg kg}^{-1} \text{ semaine}^{-1}$	1996
ATSDR	Exposition aiguë par voie orale	10	MRL = $5 \cdot 10^{-3} \text{ mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$	2007
ATSDR	Exposition chronique par voie orale	3	MRL = $3 \cdot 10^{-4} \text{ mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$	2007
US EPA	Exposition chronique par voie orale	3	RfD = $3 \cdot 10^{-4} \text{ mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$	1993
US EPA	Exposition chronique par inhalation	-	ERUi = $4,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{g m}^{-3}$	1998
US EPA	Exposition chronique par voie orale	-	ERUo = $1,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$	1998

La Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire (DHTP) a été fixée à  $15 \mu\text{g}$  d'As inorganique par kg de poids corporel et par semaine soit  $130 \mu\text{g jour}^{-1}$  pour un adulte de 60 kg. (WHO, 1989 et 1996) L'OMS a également établi une valeur-guide de  $10 \mu\text{g As L}^{-1}$  pour l'eau de boisson. (OMS, 2001)

L'ATSDR (Agency for Toxic Substances Disease Registry) propose un niveau de risque minimum (Minimum Risk Levels ou MRL) de  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$  pour une exposition aiguë (1 à 14 jours) par voie orale à l'arsenic inorganique. (ATSDR, 2007) Cette valeur a été établie à partir d'une intoxication massive de 220 personnes, ayant consommé de la sauce de soja contaminée avec de l'arsenic. (Mizuta *et al.*, 1956) Les doses journalières ont été estimées à  $3 \text{ mg jour}^{-1}$ . Les signes cliniques retenus sont l'œdème de la face et les symptômes gastro-intestinaux. Ce MRL a été déterminé en se basant sur le LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) de  $0,05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$  en y appliquant un facteur de sécurité de 10.

L'ATSDR propose également un MRL de  $3 \cdot 10^{-4} \text{ mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$  pour une exposition chronique (> 365 jours) par voie orale à l'arsenic inorganique. (ATSDR, 2007) De même, l'US EPA propose une valeur toxicologique dite « dose de référence » ou RfD de  $3 \cdot 10^{-4} \text{ mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ . (US EPA, 1993) Ces deux valeurs, qui prennent en compte l'eau (destinée à la boisson et à la préparation des aliments) et les aliments comme sources principales d'exposition de la population générale à l'As, ont été établies à partir de deux études épidémiologiques prenant en compte la « maladie des pieds noirs » ainsi qu'une hyperpigmentation ou une kératose. Dans les 2 cas, un facteur de sécurité de 3 a été appliqué pour rendre compte de la variabilité inter-espèce.

Enfin, l'US EPA propose une valeur de ERUi (Excès de risque unitaire par inhalation) de  $4,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{g m}^{-3}$  et de ERUo (Excès de risque unitaire par voie orale) de  $1,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ . (US EPA, 1998) L'ERUi a été établie en prenant en compte l'apparition des cancers pulmonaires dans les études épidémiologiques réalisées en milieu professionnel. (Brown et Chu, 1983a,b ; Enterline et Marsh, 1982)

### I. 2. 5. Effets cancérigènes

L'arsenic inorganique est un cancérigène reconnu pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (classé en groupe 1 (IARC, 1987)) et par l'US EPA (classé en groupe A (US EPA, 1998)). Les espèces MA et DMA ont également été identifiées comme possibles agents cancérigènes. (Brown *et al.*, 1997 ; Thomas *et al.*, 2001) L'arsenic est associé à différents types de cancers (poumons, foie, vessie et peau) observés chez des sujets exposés à de l'arsenic inorganique par voie orale ou respiratoire. (Tseng, 1977 ; Kaltreider *et al.*, 2001 ; Mandal et Suzuki, 2002)

Les différentes études épidémiologiques menées sur les populations contaminées à Taiwan (Tseng, 1977 ; Tseng *et al.*, 1986 ; Hsueh *et al.*, 1995 ; Chiou *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 2004) ou au Chili (Smith *et al.*, 1998) ont démontré de manière convergente que les expositions de longue durée à l'arsenic présent dans l'eau de boisson entraînaient une augmentation des cancers de la vessie, du rein, de la peau, du poumon et dans une moindre mesure du foie, du côlon et de la prostate.

Le même type d'études menées aux États-Unis n'a pas permis d'observer de lien entre la présence d'arsenic dans l'eau potable à des concentrations supérieures à 10  $\mu\text{g As L}^{-1}$  et l'incidence des cancers de la vessie ou du poumon ou la mortalité liée à ces cancers. (Morton *et al.*, 1976 ; Bates *et al.*, 1995) L'exposition à de plus faibles doses d'arsenic et des effectifs de population moins importants expliquent probablement ces divergences et ne remettent pas en cause les résultats observés dans les autres pays.

### I. 2. 6. Besoins essentiels et effets thérapeutiques

Des études ont montré que l'arsenic, malgré sa toxicité, était un élément essentiel au métabolisme des organismes vivants. (Uthus, 1992 ; Jain et Ali, 2000) Les besoins en arsenic pour l'homme ont été évalués entre 10 et 20  $\mu\text{g jour}^{-1}$ . (Uthus, 1992)

L'arsenic est aussi connu depuis longtemps pour divers effets thérapeutiques. Hippocrate (460-370 av JC) préconisait son utilisation contre la malaria ou la syphilis avec des dérivés organo-métalliques tels que l'arsphénamine et la néoarsphénamine. Il est aussi conseillé par la médecine chinoise traditionnelle contre l'asthme et le psoriasis. (Peters *et al.*, 1996) De nos jours, il est un des composés du seul traitement connu (Melarsoprol) contre la maladie du sommeil (trypanosomiase). Son efficacité a aussi été démontrée avec le trioxyde d'arsenic,  $\text{As}_2\text{O}_3$  où l'arsenic est à l'état trivalent, dans le traitement de leucémies aiguës promyélocyaires (cancer du sang). (Parmar *et al.*, 2004)

### I. 3. Exposition humaine

La voie orale est la principale voie d'absorption devant l'inhalation et l'absorption cutanée. L'exposition à l'arsenic en dehors du cadre professionnel est essentiellement due à l'ingestion d'aliments et d'eau contaminés. (Caussy, 2003) La dose journalière totale est principalement constituée par l'apport alimentaire. Les produits de la pêche, les légumes, le riz et la viande (avec l'utilisation de composés arséniés comme supplément animal) constituent les principaux apports en As de l'alimentation humaine. Néanmoins, les produits de la pêche sont considérés comme la source d'exposition majeure de l'arsenic au travers de l'alimentation humaine. (Ballin *et al.*, 1994) En France, l'arsenic total a été estimé à 4,5 mg kg<sup>-1</sup> (min-max 0,68 – 23 mg kg<sup>-1</sup>) dans les poissons, (SCOOP Task 3.2.11, 2004) ou à un niveau moyen de 2 mg kg<sup>-1</sup> dans le groupe des poissons et les mollusques et crustacés, les autres groupes présentant majoritairement des niveaux inférieurs à 50 µg kg<sup>-1</sup>. (Leblanc *et al.*, 2005)

Cependant, dans certaines régions, c'est l'eau de boisson qui constitue une source importante d'exposition à l'arsenic minéral. La directive européenne (98/83/CE, 1998) fixe à 10 µg L<sup>-1</sup> la concentration maximale en arsenic admissible dans les eaux destinées à la consommation humaine.

En France, l'apport journalier moyen par l'alimentation chez les adultes («normoévaluants» de 15 ans et plus) a été estimé à 109-147 µg d'arsenic total par la méthode des repas dupliqués (Leblanc *et al.*, 2000 ; Noël *et al.*, 2003), à 148 µg (dont 95 % proviennent des produits de la pêche) à partir des données des plans de surveillance (SCOOP Task 3.2., 2004) et à 62 µg par la méthode de l'alimentation totale française (French total diet study ou FTDS). (Leblanc *et al.*, 2005) Chez les enfants, les estimations vont de 43 µg jour<sup>-1</sup> (Leblanc *et al.*, 2005) à 101 µg jour<sup>-1</sup> (dont 91 % proviennent des produits de la pêche) (SCOOP Task 3.2.11, 2004).

Les estimations moyennes au niveau européen dans les produits de la mer varient considérablement d'une matrice à l'autre et selon les pays : de 0,019 (Grèce) à 18 mg kg<sup>-1</sup> (Belgique) pour les poissons et les produits de la mer. (SCOOP Task 3.2.11, 2004) À partir d'études similaires, les estimations au niveau européen et au niveau international varient respectivement entre 0,001 pour le Portugal (étude réalisée uniquement sur des boissons) et 309 µg jour<sup>-1</sup> pour l'Italie (dont 99 % proviennent des produits de la pêche). (SCOOP Task 3.2.11, 2004) Toutefois, seule une faible proportion (1-20 %) de l'arsenic total est présent sous les formes inorganiques les plus toxiques. (Edmonds et Francesconi, 1993 ; Schoof *et al.*, 1999)

Cependant, une grande incertitude persiste sur ces estimations dans la mesure où la proportion d'arsenic inorganique dépend en grande partie de la nature des aliments ingérés. Les poissons et les fruits de mer semblent avoir une faible teneur en arsenic minéral (< 1 % à 10 % selon les études). (Schoof *et al.*, 1999) En revanche, la concentration en arsenic minéral est plus élevée dans la viande, la volaille, les produits laitiers et les céréales. (WHO, 2001)

**PARTIE II.**

**OPTIMISATION PAR PLAN D'EXPÉRIENCES  
D'UNE MÉTHODE DE SÉPARATION DE COMPOSÉS ARSÉNIÉS  
PAR COUPLAGE HPLC/ICP-MS**

## II. 1. Introduction

Cette partie est consacrée aux principes des méthodologies utilisées et présente les aspects généraux d'optimisation de la méthode de séparation de différents composés arséniés par couplage HPLC/ICP-MS, à partir d'un article publié dans « Journal of Analytical and Atomic Spectrometry » (Article I). Après avoir justifié le choix du système analytique retenu en détaillant l'état de l'art de la spéciation de l'arsenic, nous exposerons les aspects théoriques et pratiques de l'optimisation des paramètres de séparation et de détection des espèces arséniées par la méthode des plans d'expériences.

Deux conditions chromatographiques différentes ont été optimisées dans cette partie de l'étude. La première correspond à la séparation des 7 composés As généralement retrouvés dans les produits de la pêche (As(III), As(V), MA, DMA, AB, TMAO et AC), objectif principal de ce projet. La deuxième étude englobe la séparation de ces 7 composés auxquels nous avons ajouté 2 composés anticoccidiens (additifs alimentaires) susceptibles d'être retrouvés dans les volailles d'importation : la roxarsonne (ROX) et l'acide p-arsanilique (p-ASA). À noter que cet objectif a été rajouté en urgence à la demande de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAl) dans un contexte de crise sanitaire dans la filière « volaille » en France et en Europe afin d'évaluer si ces composés pouvaient être autorisés temporairement sur le territoire en prévention de l'histomonose de la dinde. Suite au refus d'autorisation par la Direction Générale de la Santé (DGS) estimant la dangerosité trop importante de ces composés et de ses métabolites, lorsqu'ils sont utilisés comme additifs dans l'alimentation animale, et faute de financement, cette étude n'a pas été poursuivie ultérieurement. En conséquence et dans un esprit de synthèse, seuls les résultats concernant la séparation de 7 espèces arséniées seront détaillés. Ceux concernant la séparation de 9 espèces arséniées seront brièvement exposés en fin de partie et en annexe 1.

## II. 2. Spéciation de l'arsenic : état de l'art

La nécessité de la spéciation de l'arsenic est apparue au début du vingtième siècle à la suite de la découverte de fortes teneurs en arsenic dans les produits de la pêche. C'est dans les années 70 que la technique de génération d'hydrure (HG) associée à une détection par spectroscopie d'absorption atomique (SAA) a été utilisée pour la séparation des 2 composés inorganiques (As(III) et As(V)) et des deux composés méthylés (MA et DMA). (Braman et Foreback, 1973) Cependant, cette méthode est apparue rapidement limitée pour la spéciation de l'arsenic dans des matrices complexes. (Francesconi et Kuenelt, 2004)

Au cours des dernières décennies, diverses techniques ont été développées pour l'identification et la quantification des différentes espèces arséniées : techniques spectrophotométriques, HG-(CT)GC-AAS(ou AFS), HPLC-HG-AAS (ou AFS), GC-MS, HPLC-ESMS, HPLC-ESMS-MS, CE-UV, CE-MS, spectroscopie par rayon X, etc.. (Francesconi et Kuenelt, 2004) Cependant, les nombreuses revues de synthèse abordant la spéciation de l'arsenic (Guérin *et al.*, 1999 ; Gong *et al.*, 2002 ; Francesconi et Kuenelt, 2004 ; B'Hymer et Caruso, 2004 ; Le *et al.*, 2004 ; Leermakers *et al.*, 2006) montrent que la grande majorité des travaux utilise une méthode de séparation basée sur la chromatographie liquide haute performance (ou « High Performance Liquid Chromatography », HPLC) et une détection par plasma induit couplé à un spectromètre de masse (ou « Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry », ICP-MS). Ce couplage permet de combiner une méthode de séparation simple, rapide et reproductible avec un système de détection sensible, juste et fidèle et possédant une large gamme dynamique.

### II. 2. 1. Méthode de séparation par HPLC

Selon les conditions de pH, les espèces arséniées peuvent être cationiques, anioniques ou neutres permettant leur séparation par chromatographie, par appariement d'ions (Le *et al.*, 1998 ; Moldovan *et al.*, 1998 ; Wangkarn et Pergantis, 2000 ; Yamaoka *et al.*, 2001 ; Wrobel *et al.*, 2002 ; Karthikeyan et Iyer, 2004 ; Kannamkumarath *et al.*, 2004 ; Pan *et al.*, 2007 ; Rabieh *et al.*, 2008), par exclusion stérique (de manière beaucoup moins importante) (Nakazato *et al.*, 2000) ou par échange d'ions (ou « Ion exchange Chromatography », IEC). Cette dernière est la séparation la plus largement répandue. (Guérin *et al.*, 1999 ; Gong *et al.*, 2002 ; Francesconi et Kuenelt, 2004 ; B'Hymer et Caruso, 2004 ; Le *et al.*, 2004 ; Leermakers *et al.*, 2006)

Différentes combinaisons de colonne(s)/éluant(s) ont été envisagées dans la littérature pour la séparation simultanée des espèces inorganiques (As(III) et As(V)), méthylées (MA et DMA) et organiques (AB, TMAO, AC, TMA<sup>+</sup>, etc.). Par esprit de synthèse, seules les études ayant rapporté une séparation d'au moins 5 espèces As d'intérêt et présentes dans les produits de la pêche (As(III), As(V), MA, DMA, AB), et ayant été publiées depuis 1998 seront considérées dans le cadre de ces travaux. Les tableaux V et VI présentent l'ensemble de ces études en distinguant leur mode d'éluion (mode isocratique ou gradient, respectivement).

À noter que les temps de rétention (lorsqu'ils étaient disponibles) sont donnés uniquement à titre indicatif, car très souvent repérés visuellement sur les figures ; ce paramètre ne figurant quasiment jamais dans les résultats, il est impossible de savoir s'il s'agit d'un temps de rétention corrigé ou non. D'autre part, seules les matrices biologiques testées sont indiquées. Enfin, la signification des nombreuses abréviations utilisées, indispensables pour alléger ces tableaux, est indiquée en légende.



**Tableau V :** Séparation des espèces arséniées en mode isocratique

Colonne(s)	Phase mobile (composition)	pH	Débit (mL min <sup>-1</sup> )	Espèces séparées et temps de rétention (min)	Matrices analysées	Références
LC SAX <sup>1</sup>	15 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,1	1,0	As(III); As(V); MA; DMA; AB	DORM 1 <sup>a</sup> , DORM 2 <sup>a</sup>	Goessler <i>et al.</i> (1998)
LC SCX <sup>1</sup>	20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	2,0-3,0		AB; AC; TMA <sup>+</sup> ; TMAO		
LC SAX <sup>1</sup>	20 mM H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> /HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	4,2	1,5	As(III) (2,5); AB (2,8); DMA (3,3); MA (8,7); As(V) (11,3)	Vers de terre	Geiszinger <i>et al.</i> (1998)
LC SCX <sup>1</sup>	20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	3,0		AB (3,3); TMAO (5,5); AC (6,5); TMA <sup>+</sup> (7,5)		
PRP X100 <sup>2</sup>	20 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0-5,0	1,5	As(III) (1,8); DMA (2,1); MA (2,8); As(V) (4,0)	Requins	Hanaoka <i>et al.</i> (1999)
LC-SCX <sup>1</sup>	10 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N /CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,6		AB (3,5); TMAO (3,9); AC (4,4); TMA <sup>+</sup> (5,6)		
PRP X100 <sup>2</sup>	50 mM H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> /HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6,0	1,3	As (III) (5,0); DMA (6,0); MA (16,0); As(V) (27,0); AB	Urine, SRM 2670n <sup>b</sup>	Feldmann <i>et al.</i> (1999)
LC-SCX <sup>1</sup>	20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	2,7				
PRP X100 <sup>2</sup>	30 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6,0	1,3	As(III) (3,2); DMA (4,0); MA (4,8); As(V) (7,5)	Algues, rein, foie, muscle, urine, sang	Feldmann <i>et al.</i> (2000)
LC SCX <sup>1</sup>	20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	2,9		AB (3,7); DMAE (8,3); TMAO (9,3); AC (11,7); TMA <sup>+</sup> (14,2)		
PRP-X100 <sup>2</sup>	20 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,6	1,5	As(III) (2,0); DMA (2,7); MA (3,5); As(V) (7,5)	Algues	Madsen <i>et al.</i> (2000)
Zorbax 300 <sup>3</sup>	20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	2,2		DMA (1,6); AB (2,0); TMAO (3,2); AC (4,9); TMA <sup>+</sup> (5,5)		
GL-IC-A15 <sup>4</sup>	4 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,6	1,2	As(III) (3,2); DMA (4,0); MA (4,8); AB (7,5);	Urine	Sakai <i>et al.</i> (2001)
GL-IC-C75 <sup>4</sup>				TMAO (14,0); AC (21,0); TMA <sup>+</sup> (23,5); As(V) (27,0)		
GL-IC-EM <sup>4</sup>	5 mM H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	1,2	As(V) (5,5); MA (6,0); As(III) (6,5); DMA (8,0); AB (16,0);	Urine	Sakai <i>et al.</i> (2001)
C75L <sup>4</sup>				TMAO (22,0); AC (30,5); TMA <sup>+</sup> (34,0)		
PRP X100 <sup>2</sup>	6,7 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0	1,0	As(III); As(V); MA; DMA; AB	phoques	Ebisuda <i>et al.</i> (2002)
LC-SCX <sup>1</sup>	6,7 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	2,6		AB; AC; TMA <sup>+</sup> ; TMAO		
PRP X100 <sup>2</sup>	6,3 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0	1,0	As(III); As(V); MA; DMA; AB	Foie d'animaux marins, DORM 2 <sup>a</sup>	Kubota <i>et al.</i> (2002)
LC-SCX <sup>1</sup>	6,3 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	2,6		AB; AC; TMA <sup>+</sup> ; TMAO		
PRP X100 <sup>2</sup>	30 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6,0	1,0	As(III) (3,2); DMA (4,0); MA (4,8); As(V) (7,5)	Vers de terre	Langdon <i>et al.</i> (2002)
LC SCX <sup>1</sup>	20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	2,9		AB (3,7); DMAE (8,3); TMAO (9,3); AC (11,7); TMA <sup>+</sup> (14,2)		
PRP X100 <sup>2</sup>	20 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5-5,6	1,5	As(III) + AB (1,5); DMA (2,0); MA (3,5); As(V) (6,3)	Poissons, DORM 2 <sup>a</sup> , TORT 2 <sup>e</sup>	Kirby et Maher (2002)
LC SCX <sup>1</sup>	20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	2,4		AB (3,5); TMAO (4,9); AC (5,6); TMA <sup>+</sup> (6,8)		
PRP X100 <sup>2</sup>	10 mM PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	6,0	1,5	As(III) + AB (2,7); DMA (3,8); MA (5,3); As(V) (12,3)	Poulet, riz, poissons, NIST 1568a <sup>c</sup> , DORM 2 <sup>a</sup>	Pizarro <i>et al.</i> (2003 a et b)
PRP X200 <sup>2</sup>	4 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	2,8		As(III) (2,3); AB (3,3); DMA + MA + As(V) (5,3)		

<sup>1</sup> Supelcosil, <sup>2</sup> Hamilton, <sup>3</sup> Hellwett Packard, <sup>4</sup> Gelpack, <sup>5</sup> Int. Chromato., <sup>6</sup> Nucleosil, <sup>7</sup> Agilent, <sup>8</sup> Waters, <sup>9</sup> Dionex, <sup>10</sup> Micromass, <sup>11</sup> Asahipak, <sup>12</sup> Asahipak, <sup>13</sup> Shodex, <sup>a</sup> aiguillat, <sup>b</sup> urine, <sup>c</sup> farine de riz, <sup>d</sup> thon, <sup>e</sup> hépatopancreas d'homard, <sup>f</sup> algues

**Tableau V (suite)**

Colonne(s)	Phase mobile (composition)	pH	Débit (mL min <sup>-1</sup> )	Espèces séparées et temps de rétention (min)	Matrices analysées	Références
PRP X100 <sup>2</sup> PRP X200 <sup>2</sup>	10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	9,0	1,0	AB (5,0); As(III) (8,0); DMA (9,5); AC (12,0); MA (16,0); As(V) (20,5)	Nourriture	Milstein <i>et al.</i> (2003)
PRP X100 <sup>2</sup> LC SCX <sup>1</sup>	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	5,6 2,6	1,5	AB + AC + As(III) (2,0); DMA (2,3); MA (4,6); As(V) (9,8) AB; AC; As(III)	Plantes	Quaghebeur <i>et al.</i> (2003)
ION 120 <sup>5</sup> 5SA <sup>6</sup>	30 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> + 2% MeOH 30 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N + 2% MeOH	10,0 3,0	1,0	AB+DMA+As(III) (2,0); MA (7,8); As(V) (11,3) As(V) (2,5); DMA (3,5); AB (4,3); TMAO (6,5); AC (9,2)	DORM 2 <sup>a</sup>	Falk et Emons (2000)
PRP-X100 <sup>2</sup> Zorbax 300 <sup>7</sup>	20 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	5,6 2,3	1,5	As(III) (1,8); DMA (2,7); MA (4,7); As(V) (9,7) DMA (1,3), AB (1,8); TMAO (2,5); AC (3,3); TMA <sup>+</sup> (4,0)	Poissons d'eau douce	Zheng et Hintelmann (2004)
PRP-X100 <sup>2</sup> Zorbax 300 <sup>7</sup>	20 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	5,6 2,6	1,5	As(III) (1,8); DMA (2,2); MA (4,5); As(V) (8,5) AB (2,0); TMAO (2,9); AC (3,8); TMA <sup>+</sup> (4,4)	Eaux, algues, plantes, produits de la pêche	Schaeffer <i>et al.</i> (2006)
PRP X100 <sup>2</sup> LC SCX <sup>1</sup>	20 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	5,6 2,6	1,5	As(III) (2,0); DMA (2,8); MA (5,0); As(V) (9,8) AB (4,2); AB2 (7,8); AC (8,5); TMA <sup>+</sup> (10,5)	DORM 2 <sup>a</sup> , TORT 2 <sup>e</sup> , CRM 279 <sup>f</sup>	Foster <i>et al.</i> (2007)
PRP-X100 <sup>2</sup> Zorbax 300 <sup>7</sup>	20 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	6,0 2,6	1,5	As(III); DMA; MA; As(V) AB; TMAO; AC; TMA <sup>+</sup>	Plantes	Ruiz-Chancho <i>et al.</i> (2008)
PRP-X100 <sup>2</sup> Zorbax 300 <sup>7</sup>	20 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	6,0 2,3	1,5	As(III) (2,0); DMA (2,7); MA (3,5); As(V) (7,5) DMA (1,6); AB (2,0); TMAO (3,2); AC (4,9); TMA <sup>+</sup> (5,5)	Sauces de poissons	Rodriguez <i>et al.</i> (2008)
PRP X100 <sup>2</sup>	30 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	9,0	1,0	AB + AC (2,5); As(III) (3,0); DMA (4,0); MA (9,0); As(V) (17,0)	DORM 2 <sup>a</sup> , poissons	Ackley <i>et al.</i> (1999)
PRP X100 <sup>2</sup>	15 mM C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	2,9	1,5	AB (6,6); MA (7,0); DMA (8,3); As(III) (11,6); As(V) (19,7)	Urine, SRM 2670n <sup>b</sup>	Chen <i>et al.</i> (2002)
Pak A HR <sup>8</sup>	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (4/1)	6,0	0,5	AB (1,8); As(III) (2,3); DMA (3,3); MA (3,8); As(V) (11,5)	Plantes, graines	Van den Broeck <i>et al.</i> (1998)
Pak Anion HR <sup>9</sup>	10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10,0	1,0	AB (0,9); As(III) (1,4); DMA (2,3); MA (3,9); As(V) (5,0)	Carottes	Vela <i>et al.</i> (2001)
Ion-Exchange <sup>10</sup>	10 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	0,4	As(V) (7,1); MA (8,0); DMA (9,1); As(III) (10,8); AB (12,9)	Eaux	Xie <i>et al.</i> (2002)
PRP-X100 <sup>2</sup>	10 mM HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> / H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	8,5	1,5	AB (1,5); As(III) (1,9); DMA (2,6); MA (4,0); As(V) (10,5)	Riz; SRM 1568a <sup>c</sup> , poulet, poissons, CRM 627 <sup>d</sup>	Sanz <i>et al.</i> (2005a)
Pak Anion HR <sup>8</sup>	10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> pH	10,0	1,0	AB (3,0); DMA (4,8); As(III) (7,4); MA (12,0); As(V)(15,2)	Riz, SRM 1568a <sup>f</sup>	Heitkemper <i>et al.</i> (2001)
ES-502N 7C <sup>12</sup>	15 mM C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	2,0	1,0	AC (2,3); AB (2,7); DMA <sup>V</sup> (3,0); MA <sup>V</sup> (3,7); As(III) (4,0); DMA <sup>III</sup> (5,0); MA <sup>III</sup> (6,0); As(V) (8,2)	Urine; SRM 2670n <sup>b</sup> , cheveux, ongles	Mandal <i>et al.</i> (2001,2003,2004)
ES-502N 7C <sup>12</sup>	15 mM C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	2,0	1,0	AC (2,3); AB (2,7); DMA <sup>V</sup> (3,0); MA <sup>V</sup> (3,7); As(III) (4,0); DMA <sup>III</sup> (5,0); MA <sup>III</sup> (6,0); As(V) (8,2)	Fluides corporels	Suzuki <i>et al.</i> (2001, 2002)
RSpak NN-14 <sup>13</sup>	36 mM CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub>	2,8	0,8	As(V) (3,0); MA <sup>V</sup> (4,0); DMA <sup>III</sup> (4,5); As(III) (5,0); DMA <sup>V</sup> (6,0); AB (13,0)		

<sup>1</sup> Supelcosil, <sup>2</sup> Hamilton, <sup>3</sup> Hellwett Packard, <sup>4</sup> Gelpack, <sup>5</sup> Int. Chromato., <sup>6</sup> Nucleosil, <sup>7</sup> Agilent, <sup>8</sup> Waters, <sup>9</sup> Dionex, <sup>10</sup> Micromass, <sup>11</sup> Asahipak, <sup>12</sup> Asahipak, <sup>13</sup> Shodex, <sup>a</sup> aiguillat, <sup>b</sup> urine, <sup>c</sup> farine de riz, <sup>d</sup> thon, <sup>e</sup> hepatopancreas d'homard, <sup>f</sup> algues,

**Tableau VI : Séparation des espèces arséniées en mode gradient**

Colonne	Phase mobile (composition)	pH	Débit (mL min <sup>-1</sup> )	Espèces séparées et temps de rétention (min)	Matrices analysées	Références
PRP X100 <sup>1</sup>	Éluant A : 5 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + 5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Éluant B : 50 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + 5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	9,0	1,0	AB + AC (3,9); As(III) (5,8); DMA (7,9); MA (9,9); As(V) (11,1)	Poissons, DORM 2 <sup>a</sup>	McKiernan <i>et al.</i> (1999)
PRP X100 <sup>1</sup>	Éluant A: 12,5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Éluant B: 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	8,5	0,8	AB (1,8); AC (1,9); As(III) (3,0); DMA (5,5); MA (19,0); As(V) (26,0)	Pommes	B'Hymer et Caruso (2002)
PRP X100 <sup>1</sup>	Éluant A: 15 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Éluant B: 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	8,5	0,8	AB (1,8); AC (1,9); As(III) (3,0); DMA (5,5); MA (17,0); As(V) (26,0)	TORT 2 <sup>b</sup>	Brisbin <i>et al.</i> (2002)
PRP X100 <sup>1</sup>	Éluant A: 0,25 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2% MeOH Éluant B: 20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2% MeOH	9,0-8,8	1,0	AB (2,6); As(III) (4,1); DMA (8,3); MA (10,5); As(V) (13,7)	DORM 2 <sup>a</sup>	Falk et Emons (2000)
PRP X100 <sup>1</sup>	Éluant A: 15 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 2% MeOH Éluant B: 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 2% MeOH	9,0	1,0	AB (2,0); As(III) (3,3); DMA (4,3); MA (6,8); As(V) (8,0)	Urines, DORM 2 <sup>a</sup> , poissons	Wang <i>et al.</i> (2007)
PRP X100 <sup>1</sup>	Éluant A : H <sub>2</sub> O Éluant B: 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	7,0 9,5	1,1	AC (1,1); AB (1,5); As(III) (3,0); DMA (5,2); MA (10,5); As(V) (12,5)	Produits de la pêche, TORT 2 <sup>b</sup>	Cao <i>et al.</i> (2008)
ION 120 <sup>2</sup>	Éluant A : 5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Éluant B : 0,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10,3	1,0	AB (1,5); DMA (2,3); As(III) (3,1); MA (6,4); As(V) (7,1)	Urine	Ritsema <i>et al.</i> (1998)
ION 120 <sup>2</sup>	Éluant A : 5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 2% MeOH Éluant B : 50 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 2% MeOH	10,3	1,0	AB (1,5); DMA (2,5); As(III) (3,5); MA (5,8); As(V) (6,0)	DORM 2 <sup>a</sup>	Falk et Emons (2000)
ION 120 <sup>2</sup>	Éluant A: 40 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Éluant B: 70 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10,5	1,0 1,5	AB (1,7); DMA (2,4); As(III) (3,0); MA (5,6); As(V) (7,5)	Urine, SRM 2670 <sup>d</sup>	Wei <i>et al.</i> (2001)
AX10 <sup>3</sup>	Éluant A: 0,1 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Éluant B: 100 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,2	1,0	AB (2,7); DMA (3,7); MA (16,7); As(III) + As(V) (19,3)	Huîtres, TORT-2 <sup>b</sup>	Fitzpatrick <i>et al.</i> (2002)
Ionpac AS4A <sup>4</sup>	Éluant A: 0,4 mM HNO <sub>3</sub> Éluant B: 50 mM HNO <sub>3</sub>	3,4 1,3	1,2	As(III) (1,2); MA (1,9); DMA (4,4); As(V) (5,7); AB (8,0); TMAO (9,7); AC (10,3); TMA <sup>+</sup> (11,8)	DORM 2 <sup>a</sup> , produits de la pêche, algues	Karthikeyan (2004)
Ionpac AS4A <sup>4</sup>	Éluant A: 0,4 mM HNO <sub>3</sub> Éluant B: 50 mM HNO <sub>3</sub>	3,4 1,3	1,2	As(III) (1,2); MA (1,9); DMA (4,4); As(V) (5,7); AB (8,0); TMAO (9,7); AC (10,3); TMA <sup>+</sup> (11,8)	Algues, crevettes	Karthikeyan <i>et al.</i> (2003)
Ionpac AS 7 <sup>4</sup>	Éluant A : 0,5 mM HNO <sub>3</sub> Éluant B : 50 mM HNO <sub>3</sub>	3,3 1,3	1,0	As(III) (2,7); MA (4,4); DMA (6,0); As(V) (7,4), AB (10,0); AC (11,9)	DORM 2 <sup>a</sup> , eaux	Mattusch et Wennrich (1998)
Ionpac AS 7 <sup>4</sup>	Éluant A: 0,4 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA Éluant B: 50 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA	3,4 1,3	1,0	As(III) (2,0); MA (3,8); DMA (5,5); As(V) (7,0); AB (9,8); TMAO (11,8); AC (12,5); TMA <sup>+</sup> (13,7)	DORM 2 <sup>a</sup> , champignons	Londesborough <i>et al.</i> (1999)
Ionpac AS 7 <sup>4</sup>	Éluant A: 0,4 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA Éluant B: 50 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA	3,4 1,3	1,0	As(III) (2,0); MA (3,5); DMA (5,0); As(V) (7,0); AB (8,5); AC (10,2); TMAO (10,3); TMA <sup>+</sup> (11,3)	Plantes, BCR 402 <sup>e</sup> , BCR 279 <sup>f</sup>	Schmidt <i>et al.</i> (2000)

<sup>1</sup> Hamilton, <sup>2</sup> Int. Chromato., <sup>3</sup> Benson, <sup>4</sup> Dionex, <sup>a</sup> aiguillat, <sup>b</sup> hépatopancreas de homard, <sup>c</sup> thon, <sup>d</sup> urine, <sup>e</sup> trèfle blanc, <sup>f</sup> algues, <sup>g</sup> moules

**Tableau VI (suite)**

Colonne	Phase mobile (composition)	pH	Débit (mL min <sup>-1</sup> )	Espèces séparées et temps de rétention (min)	Matrices analysés	Références
Ionpac AS 7 <sup>4</sup>	Éluant A: 0,4 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA Éluant B: 50 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA	3,4 1,3	1,0	As(III) (2,0); MA (3,5); DMA (5,0); As(V) (6,8); AB (8,5); AC (10,5); TMAO (11,0); TMA <sup>+</sup> (11,3)	Plantes	Mattusch <i>et al.</i> (2000)
Ionpac AS 7 <sup>4</sup>	Éluant A: 0,5 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA + 0,5 % MeOH Éluant B: 50 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA + 0,5 % MeOH	3,3 1,3	1,0	As(III) (1,7); MA (3,2); DMA (5,0); As(V) (6,9); AB (9,8); TMAO (12,0); AC (13,0); TMA <sup>+</sup> (14,2)	DORM 2 <sup>a</sup> , BCR 477 <sup>g</sup> , Huîtres, Algues, Produits de la pêche, riz,	Kohlmeyer <i>et al.</i> (2002, 2003, 2005)
Ionpac AS 7 <sup>4</sup>	Éluant A: H <sub>2</sub> O Éluant B: 300 mM HNO <sub>3</sub>	7,0 0,5	1,0	As(III) (1,8); MA (1,9); As(V) (2,1); DMA (4,1); AB (7,0)	Poissons	Jackson <i>et al.</i> (2002)
Ionpac AS7 <sup>4</sup>	Éluant A: 0,5 mM CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> COONa Éluant B: 25 mM HNO <sub>3</sub>	4,8 1,6	0,5	As(III) (2,5); DMA (5,8); MA (7,5); As(V) (10,0); AB (12,5); TMAO (18,5); AC (21,0); TMA <sup>+</sup> (22,0)	Produits de la pêche DORM 2 <sup>a</sup>	Simon <i>et al.</i> (2004)
Ionpac AS7 <sup>4</sup>	Éluant A: 0,4 mM HNO <sub>3</sub> Éluant B: 50 mM HNO <sub>3</sub>	3,4 1,3	1,0	As(III) (1,5); DMA (3,7); As(V) (5,8); AB (6,8); TMAO (7,8)	Plantes	Daus <i>et al.</i> (2005)
Ionpac AS7 <sup>4</sup>	Éluant A: 2,5 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Éluant B: 50 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,6 1,3	1,0	AB (1,5); DMA (1,8); As(III) (3,0); MA (8,8); As(V) (14,8)	Eaux	Ronkart <i>et al.</i> (2007)
Ionpac AS 14 <sup>4</sup>	Éluant A: 2 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 2,2 mM C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> Éluant B: 2 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 45 mM C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	8,2	1,0	AB (2,3); As(III) (2,6); DMA (3,3); MA (4,5); As(V) (9,8)	Eaux, SRM 2670n <sup>d</sup> , DORM 2 <sup>a</sup>	Lindemann <i>et al.</i> (1999,2000)
Ionpac AS 14 <sup>4</sup>	Éluant A: 1,5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Éluant B: 12 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Éluant C: 20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	8,7	1,5	AB (2,0); As(III) (3,5); DMA (5,8); MA (16,7); As(V) (22)	Eaux	Duarte <i>et al.</i> (2007)

<sup>1</sup> Hamilton, <sup>2</sup> Int. Chromato., <sup>3</sup> Benson, <sup>4</sup> Dionex, <sup>a</sup> aiguillat, <sup>b</sup> hépatopancreas de homard, <sup>c</sup> thon, <sup>d</sup> urine, <sup>e</sup> trèfle blanc, <sup>f</sup> algues, <sup>g</sup> moules

### II. 2. 1. a. Séparation en mode isocratique

Généralement, les colonnes échangeuses d'anions (PRP-X100 ou LC SAX), associées à une phase mobile phosphatée ou carbonatée, sont utilisées pour la séparation des espèces inorganiques (As(III) et As(V)) et des espèces méthylées (MA et DMA) alors que la séparation par échanges cationiques (PRP-X 200, LC SCX, Zorbax 300 SCX ou IC-CS-10), avec un éluant constitué de pyridine (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N) ou d'acide formique (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), est utilisée pour les espèces organiques (AB, AC, TMAO, TMA<sup>+</sup>, etc.). (Guérin *et al.*, 1999 ; Gong *et al.*, 2002 ; Francesconi et Kuenelt, 2004 ; B'Hymer et Caruso, 2004) Une combinaison de ces deux méthodes est couramment utilisée pour séparer l'ensemble des espèces concernées mais engendre fatalement une augmentation significative du temps d'analyse (temps de séparation et temps de stabilisation des colonnes).

L'utilisation unique d'une colonne à échange d'anions en mode isocratique apparaît délicate dans la mesure où la résolution des pics AB et As(III) est généralement faible. (Ackley *et al.*, 1999 ; Van den Broeck *et al.*, 1998 ; Vela *et al.*, 2001 ; Xie *et al.*, 2002 ; Sanz *et al.*, 2005a) Toutefois, les travaux de Zheng *et al.* (1999) et Chen *et al.* (2002) ont démontré que l'acide tartrique (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>), utilisé comme éluant, forme un complexe anionique avec l'arsénite, permettant une séparation de 5 composés (As(III), As(V), MA, DMA et AB) en moins de 15 minutes. Une autre étude réalisée par Saverwyn *et al.* (1997) montre qu'il est possible de séparer ces 5 composés en optant pour une colonne LC SAX avec un éluant phosphaté. Néanmoins, ces travaux se sont limités à des matrices relativement peu complexes (eaux et urines). De même, Heitkemper *et al.* (2001) rapporte la séparation des 5 composés avec une colonne Pak Anion HR associée à une phase mobile carbonatée. D'autre part, la colonne ES 502N7C (Asahipak), associée à une phase mobile constituée d'acide citrique (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>), permettrait aussi une séparation satisfaisante des composés considérés en moins de 10 minutes. De plus, cette colonne offre la possibilité de distinguer les formes trivalentes MA(III) et DMA(III) des formes pentavalentes MA(V) et DMA(V). Cependant, ce type de colonne a exclusivement été utilisé pour l'analyse de fluides biologiques. (Mandal *et al.*, 2001, 2003 et 2004 ; Suzuki *et al.*, 2001 et 2002) Quelques travaux rapportent l'utilisation d'autres colonnes alternatives en mode isocratique telle que la colonne RSpak NN-14 (Shodex) (Suzuki *et al.*, 2001 et 2002) associée à une phase mobile spécifique. Néanmoins, ces travaux restent également limités à des matrices liquides (eaux ou fluides corporels).

En conclusion, la séparation simultanée des composés arséniés organiques et inorganiques, hormis quelques exemples, paraît délicate en mode isocratique.

### *II. 2. 1. b. Séparation en mode gradient*

Quelques travaux ont décrit la séparation en mode gradient des 5 composés considérés (As(III), As(V), MA, DMA, AB) avec une colonne à échange d'ions du type PRP-X100 (McKiernan *et al.*, 1999 ; B'Hymmer et Caruso, 2002 ; Brisbin *et al.*, 2002 ; Falk et Emons, 2000 ; Wang *et al.*, 2007 ; Cao *et al.*, 2008), ION 120 (Ritsema *et al.*, 1998 ; Wei *et al.*, 2001 ; Falk et Emons, 2000), AX10 (Fitzpatrick *et al.*, 2002).

Depuis une dizaine d'années, un nombre croissant de travaux rapportent l'utilisation des colonnes échangeuses d'anions du type Ionpac (*Dionex*) en mode gradient. Les travaux de Mattusch et Wennrich (1998) et Londesborough *et al.* (1999) ont été les premiers à rapporter l'utilisation de la colonne Ionpac AS 7 pour la séparation simultanée d'espèces As en mode gradient. Celle-ci, associée à un éluant composé d'acide nitrique (ou chlorhydrique) en présence (ou non) d'agents d'appariement d'ions (acide benzène 1,2-disulfonique, (BDSA)), permet la séparation satisfaisante de nombreux composés arséniés. Ainsi, une étude réalisée par Kolhmeyer *et al.* (2002) décrit la séparation de jusqu'à 17 espèces arséniées (incluant les espèces inorganiques, méthylées, organiques et organosucres) dans un échantillon d'huîtres, en moins de 20 minutes. D'autre part, notons que l'utilisation d'autres colonnes du type Ionpac a été rapportée telles que la colonne Ionpac AS4A (Karthikeyan et Iyer, 2004 ; Karthikeyan, 2004), AS9-HC (Koellensperger *et al.*, 2002), AS11 (Bissen et Frimmel, 2000 ; Vassileva *et al.*, 2001) ou AS14 (Lindemann *et al.*, 1999 et 2000 ; Duarte *et al.*, 2007). Les travaux de Jackson et Bertsch (2001) et Jackson *et al.* (2003) montrent que les espèces ROX et p-ASA peuvent aussi être séparées dans les volailles avec l'utilisation d'une colonne AS16 avec des temps de rétention inférieurs à 10 minutes. Certaines colonnes (AS11 ou AS14) ont été testées pour la séparation simultanée d'espèces arséniées et sélénées. (Vassileva *et al.*, 2001 ; Lindemann *et al.*, 1999 et 2000) L'avantage considérable de ce type de colonne réside dans l'utilisation unique de l'acide nitrique comme éluant, permettant de se soustraire des problèmes d'encrassement de l'ICP-MS susceptibles d'être rencontrés avec l'utilisation de solvants phosphatés ou carbonatés. D'autre part, cette colonne a fait l'objet d'études sur diverses matrices telles que des eaux (Mattusch et Wennrich, 1998 ; Lindemann *et al.*, 1999 et 2000 ; Duarte *et al.*, 2007 ; Ronkart *et al.*, 2007), des sols (Mattusch *et al.*, 2000;

Daus *et al.*, 2005 ; Koellensperger *et al.*, 2002 ; Vassileva *et al.*, 2001 ; Lindemann *et al.*, 1999 et 2000 ; Bissen *et al.*, 2000), des végétaux (Schmidt *et al.*, 2000 ; Mattusch *et al.*, 2000 ; Daus *et al.*, 2005 ; Londesborough *et al.*, 1999), du riz (Kohlmeyer *et al.*, 2003), des volailles (Jackson et Bertsch, 2001 ; Jackson *et al.*, 2003) et des produits de la pêche. (Simon *et al.*, 2004 ; Karthikeyan, 2004 ; Karthikeyan et Iyer, 2004 ; Mattusch et Wennrich, 1998 ; Londesborough *et al.*, 1999 ; Kohlmeyer *et al.*, 2002, 2003 et 2005 ; Jackson *et al.*, 2002 ; Lindemann *et al.*, 2000)

## II. 2. 2. Méthode de détection : ICP-MS

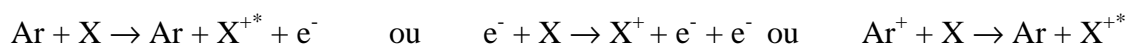
### II. 2. 2. a. Historique

Le premier couplage entre un plasma de gaz rares induits par haute fréquence (Inductively Coupled Plasma ou ICP), utilisé pour dissocier les molécules et ioniser les atomes et un spectromètre de masse, a été élaboré en 1980 et commercialisé pour la première fois en 1984. Ces systèmes ont commencé à se démocratiser dans les années 90 jusqu'à nos jours. Plusieurs revues récentes ont répertorié les études fondamentales et développements pour ce type d'appareils (Bacon *et al.*, 2007 et 2008 ; Beauchemin, 2008), ainsi que les travaux réalisés pour la détermination d'éléments d'intérêt et de leur spéciation dans diverses matrices biologiques ou alimentaires. (Lobinski *et al.*, 2006 ; Taylor *et al.*, 2006 et 2007 ; Capar *et al.*, 2007)

### II. 2. 2. b. Principe

Le plasma est obtenu en générant un champ magnétique par passage d'un courant électrique de haute fréquence à travers une bobine refroidie entourant la torche. Une étincelle est produite dans l'argon au sein de la torche, entraînant l'arrachement de certains électrons aux atomes de ce gaz rare. Ces électrons sont accélérés dans le champ magnétique où ils provoquent de nombreuses collisions avec de nouveaux atomes d'argon, engendrant de nouvelles ionisations. Par ces collisions en chaîne, l'argon est transformé en plasma (constitué d'atomes d'argon, d'électrons et d'ions d'argon), appelé plasma à couplage inductif (ICP).

L'ionisation de la plupart des éléments de l'échantillon dans le plasma peut se résumer par les équations chimiques suivantes :

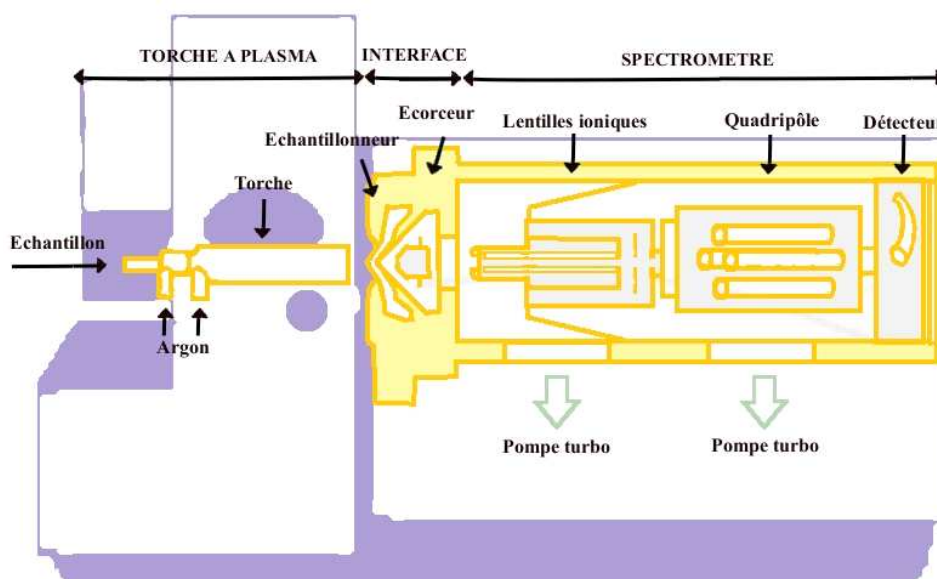


(avec : Ar : atome d'argon, X : atome d'analyte, \* : état excité, + : état ionisé, e<sup>-</sup> : électron)

Les ions sont extrêmement réactifs et peuvent se combiner avec d'autres ions pour former des espèces poly-atomiques, essentiellement à l'extrémité du plasma, générant ainsi un phénomène d'interférences. C'est le cas, par exemple, à la masse sur charge  $m/z = 75$  pour la quantification de l'arsenic en présence de chlore dans le milieu. En effet, les molécules de chlore s'associent à l'argon (Ar, gaz vecteur) pour former des ions poly-atomiques  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  qui interfèrent la quantification de l'As. Considérant que l'arsenic est monoisotopique, il existe diverses techniques pour minimiser ces interférences : corrections mathématiques, technique dite du « plasma froid » ou chambre de collisions / réactions. Ce système, utilisé pour la première fois dans les travaux de Rowan et Houk (1989), offre une nouvelle approche pour réduire ces interférences poly-atomiques. Il consiste en une enceinte dans laquelle circule un gaz ou un mélange de gaz et d'un multi-pôle. L'élimination des interférents se produit par collision ou réaction avec le ou les gaz présents dans la chambre. L'ensemble des aspects concernant l'utilisation de la chambre de collision (Collision cell technology, CCT) pour la détermination de l'As total, a fait l'objet d'un article présenté en annexe 2.

### II. 2. 2. c. Principaux sous-systèmes constitutifs de l'ICP-MS

La figure 1 présente le schéma simplifié des différents éléments constitutifs d'un ICP-MS.



**Figure 1 :** Schéma simplifié des différents éléments constitutifs d'un ICP-MS



### *II. 2. 2. c. i. La torche à plasma*

La torche à plasma sert à créer et à confiner la décharge à l'intérieur de l'inducteur (tout en isolant électriquement le plasma de l'inducteur) et doit assurer le transport et la pénétration de l'échantillon dans le plasma. Elle est généralement constituée de trois tubes concentriques en quartz.

### *II. 2. 2. c. ii. L'interface et les lentilles ioniques*

L'interface est constituée de deux cônes successifs, percés d'un orifice en leur centre, afin de permettre le passage d'une portion du plasma. Un premier cône, appelé échantillonneur (ou « sampler ») pénètre dans la décharge et permet d'extraire une portion du plasma. Derrière cette première ouverture, un vide de l'ordre de  $10^{-2}$  Pa est établi par une pompe primaire, produisant un jet supersonique qui refroidit rapidement le gaz suite à sa grande expansion. Un second cône, dit écorceur (ou « skimmer »), ayant un orifice de diamètre inférieur au précédent, prélève la partie centrale du jet supersonique.

L'optique ionique, qui est constituée d'une ou plusieurs lentilles électrostatiques, permet de re-focaliser le jet et de le rendre concentrique à l'axe du filtre quadripolaire.

### *II. 2. 2. c. iii. Le spectromètre de masse*

Le spectromètre de masse est un système séquentiel qui permet le passage des ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ), déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle. Chaque  $m/z$  sélectionné est séquentiellement envoyé vers le système de détection. Ce passage des masses les unes après les autres est tellement rapide que l'on parle de détection quasi simultanée des éléments étudiés.

### *II. 2. 2. c. iv. Le système de détection*

Lorsque les ions sont sélectionnés, ils doivent être détectés. Dans les systèmes multipolaires, des multiplicateurs d'électrons, qui consistent en un ensemble de plaques, sont utilisés. Lorsqu'un ion frappe la plaque d'entrée du détecteur, des électrons secondaires sont générés. Ces électrons frappent ensuite une autre plaque qui libèrera également des électrons, entraînant une réaction en cascade. L'intensité mesurée (en coups/seconde (cps)) correspond au plus au nombre d'ions frappant le détecteur, car chaque ion n'engendre pas nécessairement des électrons secondaires.

### II. 2. 3. Bilan de l'état de l'art

Cet état de l'art de la séparation des espèces arséniées a conduit à plusieurs observations :

- L'application de la méthode sur des matrices alimentaires réelles nécessite une séparation simple et rapide des espèces et l'utilisation d'un détecteur sensible et robuste. Le couplage entre la séparation par chromatographie liquide et la détection par ICP-MS semble répondre de la façon la plus pertinente à ces critères.
- Parmi le large choix de colonnes à échange d'ions (types de colonnes les plus utilisées pour la séparation des composés arséniés) testées dans la littérature, il apparaît que la colonne Ionpac AS7 (Dionex) semble potentiellement être le choix le plus adapté pour une séparation simple, rapide et simultanée des composés inorganiques et organiques contenus dans des matrices réelles. De plus, cette colonne nécessite un éluant (acide nitrique) qui s'avère être le plus compatible avec la détection par ICP-MS.

### II. 3. Conditions expérimentales

Les réactifs et matériels utilisés dans cette étude sont décrits dans l'article I.

#### II. 3. 1. Couplage HPLC/ICP-MS

L'ICP-MS utilisé pour cette partie de l'étude est un *PQ ExCell*, (*Thermo Scientific*). Les solutions sont drainées par une pompe péristaltique à partir des tubes disposés sur un échantillonneur automatique ASX 520 (*CETAC*). Le système chromatographique utilisé dans cette partie de l'étude consiste en une pompe binaire LC 200 (*Perkin Elmer*), une valve d'injection (*Rheodyne*) équipée d'une boucle d'injection de 100  $\mu\text{L}$  et d'un four à colonnes CTO-10AS (*Shimadzu*).

Ce système analytique est relié au nébuliseur de l'ICP-MS par un simple capillaire en PEEK de 50 cm de long et de 0,17 mm de diamètre interne. Ce capillaire doit être le plus court possible pour limiter le temps mort et l'élargissement des pics. Le système chromatographique et l'ICP-MS sont également reliés électroniquement par une carte dite « Trigger » permettant de synchroniser le temps mort avec l'injection de l'échantillon dans la colonne. L'acquisition des données a été réalisée en mode « temps résolu » (Time-Resolved-Analysis ou TRA) à la masse sur charge  $m/z = 75$ . Le logiciel chromatographique de l'ICP-MS (*Plasmalab*) a été utilisé pour la quantification par intégration des aires de pics.

### II. 3. 2. Séparation chromatographique par échange d'ions

Une colonne de garde Ionpac AG7 (4 x 50 mm, *Dionex*) a été insérée en amont de la colonne Ionpac AS 7 (4 x 250 mm, *Dionex*) sélectionnée. La phase stationnaire de ces colonnes est constituée de polymère sur lequel des groupements d'ammonium quaternaire d'alkyle sont greffés. Le diamètre des particules du support de la phase stationnaire est de 10 µm. Ce support est compatible avec une phase mobile dont le pH est compris entre 0 et 14. À noter que la colonne et la pré-colonne ont dû être régulièrement régénérées selon la procédure préconisée par le constructeur : rinçage de la colonne et de la pré-colonne pendant 5 minutes à l'eau *milliQ*, puis, au minimum 1 heure avec un mélange de 500 mM HNO<sub>3</sub> et 10 % MeOH, et enfin, 5 minutes à l'eau *milliQ*.

## II. 4. Optimisation par la méthode des plans d'expériences

### II. 4. 1. Principe

À l'inverse d'une acquisition classique des données, paramètre par paramètre, sans aucune planification des essais, la méthode des plans d'expériences permet d'organiser de manière optimale les essais en évaluant l'influence de variables (ou facteurs (X)) et de leurs interactions éventuelles sur une ou plusieurs grandeurs d'intérêt (ou réponses (Y)), en fournissant un maximum d'informations de qualité tout en diminuant considérablement le nombre d'essais. (Goupy, 1988 ; Sado et Sado, 1991) Une fois les essais réalisés, un modèle mathématique peut être déterminé et vérifié. Celui-ci décrit le comportement de la ou les réponse(s) en fonction des différents paramètres sélectionnés dans le domaine d'étude défini, et sera utilisé pour l'optimisation des conditions expérimentales.

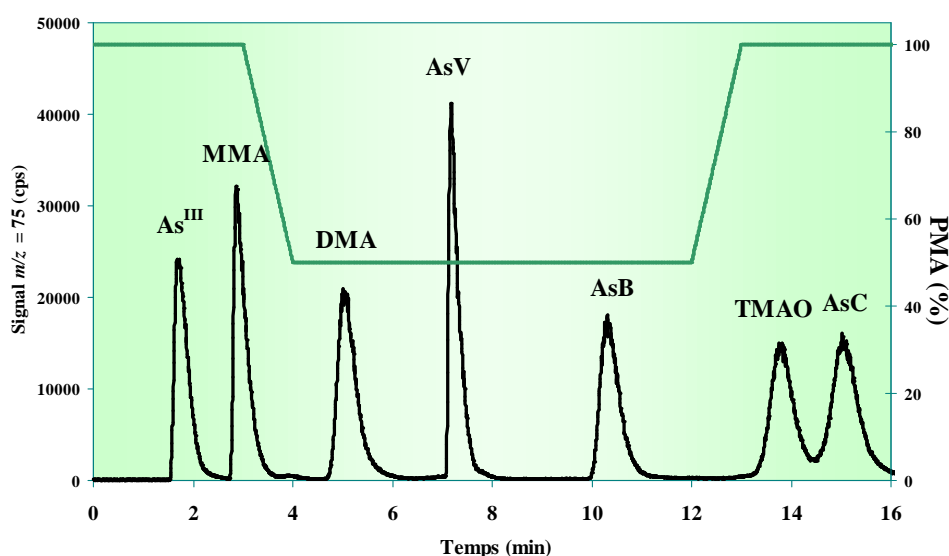
### II. 4. 2. Étude préliminaire

Les conditions de séparation chromatographiques initiales, présentées dans le tableau VII, sont basées sur celles rapportées précédemment par Kolhmeyer *et al.* (2002) qui s'intéressait à la séparation simultanée de 17 espèces arsénisées (inorganiques, organiques et organo-sucres) dans des produits de la pêche avec la colonne Ionpac AS7 (*Dionex*).

**Tableau VII :** Conditions chromatographiques initiales (d'après Kolhmeyer *et al.* (2002))

HPLC	LC 200 (Perkin Elmer)
Colonne chromatographique	Ionpac AG7 + Ionpac AS7 (Dionex)
Débit de la phase mobile	1 mL min <sup>-1</sup>
Température de la colonne	20 °C
Phase mobile A	0,5 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA + 0,5 % MeOH
Phase mobile B	50 mM HNO <sub>3</sub> + 0,05 mM BDSA + 0,5 % MeOH
Programme du gradient	100 % PMA (2,5min) ↓ (linéaire) 50 % PMA (1 min) ↓ 50 % PMA (9 min) ↓ (linéaire) 100 % PMA (1 min) ↓ 100 % PMA (3 min)

La figure 2 présente le chromatogramme obtenu pour une solution étalon des 7 espèces As (As(III), MA, DMA, As(V), AB, TMAO et AC) à 20 µg As L<sup>-1</sup> dans ces conditions initiales avec l'appareillage décrit en II.3..



**Figure 2 :** Chromatogramme pour une solution étalon des 7 espèces As à 20 As µg L<sup>-1</sup> dans les conditions chromatographiques initiales

Comme décrit par Kohlmeier *et al.* (2002), les 7 composés (As(III), MA, DMA, As(V), AB, TMAO et AC) sont séparés de façon satisfaisante en 16 minutes. Il peut être noté que le temps d'analyse observé avec notre appareillage est légèrement supérieur à celui rapporté par Kohlmeier *et al.* (2002) (13 minutes).

Le premier objectif de cette étude a été de déterminer les conditions optimales de séparation pour réduire le temps de séparation tout en conservant des résolutions satisfaisantes (ou en les améliorant) et en améliorant la sensibilité des pics, notamment des espèces inorganiques (As(III) et As(V)). D'autre part, l'utilisation des plans d'expériences permettra d'évaluer, en un minimum d'essais, l'influence des paramètres sélectionnés et de leurs interactions éventuelles sur la séparation chromatographique des 7 espèces As.

#### II. 4. 3. Construction du plan d'expériences

##### *II. 4. 3. a. Sélection des facteurs et des réponses à étudier*

La première étape de la construction d'un plan d'expériences consiste à sélectionner les différents paramètres et leur domaine de variation (niveaux notés +1 et -1, respectivement) afin de définir la nature et le nombre des essais. Une étude préliminaire est alors menée pour s'assurer que les intervalles choisis génèrent une variation significative de la ou des réponses et ainsi obtenir un modèle statistique pertinent. L'ensemble des domaines de variation des paramètres définit le «domaine d'étude expérimentale».

Après la série d'essais préliminaires, 7 paramètres ont été identifiés comme pertinents à étudier par la méthode des plans d'expériences : (1) la concentration en HNO<sub>3</sub> dans l'éluant, (2) la durée de chaque étape du programme gradient, (3) et (4) les concentrations en BDSA et en MeOH dans les phases mobiles A et B, (5) le débit des phases mobiles, (6) la température de la colonne et (7) la puissance du plasma de l'ICP-MS.

D'autre part, les résolutions chromatographiques entre 2 pics voisins ( $R_1$  à  $R_6$ ), le temps de séparation total (T) et la hauteur des pics des 2 espèces inorganiques les plus toxiques As(III) et As(V), ( $S_1$  et  $S_2$ , respectivement), ont été sélectionnés comme réponses à optimiser et telles que :

$$R_{ab} = 2 \times (tr_a - tr_b) / (\omega_a + \omega_b) \text{ avec } tr_a \text{ et } tr_b : \text{ temps de rétention des pics a et b}$$

$$\omega_a \text{ et } \omega_b : \text{ largeurs des pics a et b}$$

T = temps correspondant au retour à la ligne de base du dernier pic (AC)

$S_a$  = valeur de la sensibilité au sommet du pic a

Un facteur ou une interaction sera considéré comme significatif si son effet (en valeur absolue) sur une réponse est supérieur à 20 % de la moyenne des réponses du plan d'expériences.

La série d'essais préliminaires a également permis de définir, pour chaque paramètre étudié, les niveaux haut (+1), moyen (0) et bas (-1), utilisés pour élaborer le plan d'expériences. (Tableau VIII)

**Tableau VIII :** Niveaux des facteurs du plan d'expériences

Niveau	Étapes	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
-1	1	95	2	0	0	0,9	20	1250
	2	10	3	0	0	0,9	20	1250
	3	75	7	0	0	0,9	20	1250
0	1	100	3	0,05	0,5	1,2	30	1350
	2	30	5	0,05	0,5	1,2	30	1350
	3	85	9	0,05	0,5	1,2	30	1350
+1	1	97,5	2,5	0,1	1	1,5	40	1450
	2	20	4	0,1	1	1,5	40	1450
	3	80	8	0,1	1	1,5	40	1450

(1) Pourcentage de PMA (%), (2) Durée des étapes du programme gradient (min), (3) Concentration en BDSA (mM), (4) Concentration en MeOH (%), (5) Débit des phases mobiles (mL min<sup>-1</sup>), (6) Température de la colonne (°C), (7) Puissance du plasma (W)

#### II. 4. 3. b. Notion de plan factoriel, d'aliases et de contrastes

En se basant sur ces valeurs, une matrice expérimentale (notée « X ») peut être générée. Ensuite, une ou plusieurs réponse(s) sont choisie(s) comme représentative(s) du phénomène étudié. Les valeurs observées pour chaque essai et chaque réponse sont rassemblées dans une matrice (notée « Y »). Les coefficients (ou « effets ») des facteurs et de leurs interactions sont représentés dans une nouvelle matrice (notée « A ») calculée comme ci-dessous :

$$A = (X_t \cdot Y) / N_f \quad \text{avec } X_t : \text{la transposée de la matrice « X »}$$

$N_f$  : le nombre d'essais

Le nombre d'essais du plan correspond à  $2^k$ , avec k le nombre de paramètres étudiés. Ainsi, le nombre d'essais augmente très rapidement avec le nombre de facteurs. Afin de limiter ce nombre d'essais tout en conservant un nombre élevé de paramètres, il est possible de considérer uniquement une partie représentative du plan complet initial, appelée plan factoriel (et noté «  $2^{k-k'}$  » avec k' : nombre de facteurs « supplémentaires »).

Ce plan consiste à associer (ou « alier ») chaque effet de facteurs à une ou des interactions. Cette association de coefficients est appelée « contraste ». Néanmoins, cette approche peut aussi induire des incertitudes sur l'origine de certains effets. Il est alors nécessaire de « désalier » ces facteurs en réalisant un plan factoriel complémentaire qui permet de distinguer l'influence des facteurs par rapport à celles de leurs interactions associées.

L'exploitation commune des réponses du plan initial A et du plan complémentaire A' permet de distinguer le principal effet de facteur « désalié » ( $E_i$ ) et les interactions correspondantes ( $I_i$ ) comme suit :

$$E_i = (a_i + a'_i) / 2$$

$$I_i = (a_i - a'_i) / 2$$

#### II. 4. 3. c. Plan factoriel $2^{7-4}$

En considérant les 7 paramètres à étudier ( $N_f = 7$ ), un plan factoriel  $2^{7-4}$  a été sélectionné afin de minimiser le nombre d'essais à 8. D'autre part, un plan complémentaire (correspondant à 8 essais supplémentaires) a été ajouté afin de pouvoir désassocier les facteurs et les interactions aliés. (Tableau IX)

**Tableau IX :** Plan fractionnel et complémentaire  $2^{7-4}$  (séparation 7 espèces)

Plan fractionnel $2^{7-4}$							
	(1)	(2)	(3)	(4) = (123)	(5) = (12)	(6) = (23)	(7) = (13)
<b>1</b>	- 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1
<b>2</b>	+ 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1
<b>3</b>	- 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1
<b>4</b>	+ 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	- 1
<b>5</b>	- 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1
<b>6</b>	+ 1	- 1	+ 1	- 1	- 1	- 1	+ 1
<b>7</b>	- 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1	- 1
<b>8</b>	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1

Plan complémentaire $2^{7-4}$							
	(1)	(2)	(3)	(4) = (123)	(5) = (-12)	(6) = (-23)	(7) = (-13)
<b>9</b>	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1
<b>10</b>	+ 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1
<b>11</b>	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1
<b>12</b>	+ 1	+ 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1
<b>13</b>	- 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1
<b>14</b>	+ 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1
<b>15</b>	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1
<b>16</b>	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	- 1

### II. 4. 3. d. Détermination et vérification du modèle mathématique

Une série d'hypothèses est fixée afin d'exploiter les résultats du plan d'expériences et de distinguer les facteurs et interactions prépondérantes.

Hypothèse 1 : les interactions d'ordre 3 (interaction entre 3 facteurs) ou d'ordre plus élevé sont considérées comme négligeables. Un grand nombre d'inconnues est ainsi éliminé. Mais cette hypothèse peut parfois être mise en défaut.

Hypothèse 2 : si un contraste est nul, cela peut signifier :

- que les effets et les interactions aliasés sont tous nuls. C'est l'hypothèse la plus probable et qui sera retenue sous le nom d'hypothèse 2.
- que les effets et les interactions aliasés se compensent. Cette hypothèse est peu probable et n'est donc pas retenue.

Hypothèse 3 : si deux contrastes sont faibles, leur interaction l'est probablement aussi. Si un contraste est faible et l'autre fort, leur interaction sera supposée faible.

Hypothèse 4 : si deux contrastes sont forts, leur interaction pourrait l'être également.

Par la suite, un modèle de régression linéaire est considéré tel que :

$$Y = a_0 + a_i X_i + a_{ij} X_i X_j \text{ avec}$$

Y : la réponse considérée

$X_i$  et  $X_j$  : les facteurs influents i et j

$a_0$  : moyenne des réponses

$a_i$  : coefficient du facteur i

$a_{ij}$  : coefficient de l'interaction ij

Le modèle est considéré comme représentatif des variations de la (ou des) réponse(s) étudiée(s) si les valeurs expérimentales obtenues au niveau 0 (appelé « point au centre ») sont comparables à la moyenne des réponses  $a_0$ . Lorsque le modèle du premier degré ne peut être validé, il est nécessaire d'envisager un modèle mathématique du second degré qui demande une série d'essais supplémentaires. Un nouveau plan est donc envisagé incluant le centre du domaine d'étude (noté « 0 ») et des bornes élargies (notées « + $\alpha$  » et « - $\alpha$  ») tel que :  $\alpha = Nf^{1/4}$ . Dans le cas où ce modèle ne serait pas non plus validé, il est nécessaire de considérer des modèles mathématiques plus complexes (degré > 2, log, exp, etc.) nécessitant de nouveaux essais. Un organigramme des différentes étapes d'une modélisation est présenté en annexe 3.



## **II. 5. Résultats expérimentaux**

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article soumis dans « Journal of Analytical and Atomic Spectrometry » (Article I).

# Optimisation by experimental design of an IEC/ICP-MS speciation method for arsenic in seafood following microwave assisted extraction†‡

Vincent Dufailly,<sup>a</sup> Laurent Noël,<sup>a</sup> Jean-Marc Frémy,<sup>b</sup> Diane Beauchemin<sup>c</sup> and Thierry Guérin<sup>a\*</sup>

Received 17th April 2007, Accepted 19th June 2007

First published as an Advance Article on the web 6th July 2007

DOI: 10.1039/b705798a

An experimental design was used to optimise a speciation method involving ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry (IEC-ICP-MS) for the determination of arsenic species in fish samples following a microwave-assisted extraction (MAE). The effects of several factors (eluent composition and concentration, gradient program, mobile phase flow rate, column temperature and plasma power), and their possible interactions on the arsenic species separation and detection, were evaluated using an experimental design in order to establish the optimal conditions. Two mobile phases (A and B) composed of HNO<sub>3</sub> (0.5 and 50 mmol L<sup>-1</sup> respectively) and MeOH (1%) were used in a gradient consisting of 100% A for 2.5 min, 10% A for 3 min, and 80% A for 5 min, on a Dionex Ionpac AS 7 high-capacity anion-exchange column maintained at 20 °C, with a mobile phase flow rate of 1.35 mL min<sup>-1</sup> and a rf-power to the plasma of 1450 W. Under these optimised conditions, seven different arsenic species (As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid, arsenobetaine, arsenocholine, trimethylarsine oxide) could be separated within 11 min in a single chromatographic run. Limits of quantification ranged from 0.008 to 0.042 mg As kg<sup>-1</sup>, which were generally similar to those previously reported. Moreover, trueness was estimated on three different certified reference materials of fish after MAE with 10 mL of methanol–water mixture (8 + 2 v/v). In all cases the results were in good agreement with the certified values.

## Introduction

Arsenic is prevalent in the environment, as a result of both natural and anthropogenic sources.<sup>1</sup> Because its toxicological behaviour and biochemical activity depend on its chemical form,<sup>2</sup> a determination of the total concentration of arsenic in food does not provide information on their safety for human consumption. Seafood has been identified as the major source of exposure to arsenic through human consumption.<sup>3</sup> Various arsenic species could be detected in seafood such as: arsenite (As<sup>III</sup>) and arsenate (As<sup>V</sup>), considered to be the most toxic forms,<sup>4,5</sup> monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA), which are possible carcinogenic agents,<sup>6</sup> and some non-toxic organoarsenic compounds,<sup>7–10</sup> such as

arsenobetaine (AsB), arsenocholine (AsC) and trimethylarsine oxide (TMAO). Nonetheless, it remains of primary importance to develop robust arsenic speciation methods to precisely identify, quantify and thus evaluate risks for the consumer.

Numerous separation and detection techniques, which have been coupled to perform the speciation analysis of arsenic, have been recently reviewed.<sup>11–13</sup> The majority of these methods used high-performance liquid chromatography (HPLC) to perform the separation with detection by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).<sup>11–16</sup> This hyphenation combines a rapid, powerful and reproducible separation method with a very efficient detector, which is known for its high sensitivity and wide linear dynamic range.

Ion-exchange chromatography (IEC) is most extensively used,<sup>11–15</sup> because anion-exchange columns generally allow the separation of As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, MMA and DMA species,<sup>17–37</sup> whereas cation-exchange columns are used to separate AsB, AsC and TMAO among others.<sup>20–25</sup> In particular, some studies based on the work of Londesborough *et al.*<sup>26</sup> used a Dionex anion-exchange column with a nitric acid eluent in presence (or not) of ion-pairing reagents (benzene 1,2-disulfonate acid or BDSA) on various matrices such as water,<sup>28,35,39–41</sup> urine,<sup>39</sup> soils,<sup>34,38</sup> plants,<sup>31,34,38</sup> mushrooms,<sup>26</sup> rice,<sup>29</sup> poultry<sup>32,33</sup> and fish products.<sup>26–30,36,37</sup> An important advantage of this column is that a solely nitric acid eluent can be used, which eliminates potential clogging problems in ICP-MS from phosphate or carbonate solvents. This method allows a satisfactory separation of both inorganic and organic arsenic species in a single

<sup>a</sup>Unité des Contaminants Inorganiques et Minéraux de l'Environnement, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés agroalimentaires, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 23, Avenue du Général de Gaulle, F-94706 Maisons-Alfort Cedex, France. E-mail: t.guerin@afssa.fr

<sup>b</sup>Unité d'Évaluation des Risques Physico-Chimiques, Direction de l'Évaluation des Risques Nutritionnels et Sanitaires, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 27–31, Avenue du Général Leclerc, F-94701 Maisons-Alfort, France

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Queen's University, 90 Bader Lane, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6

† Presented at the 2007 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Taormina, Italy, February 18–23, 2007.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available: experimental design 2<sup>7–4</sup>, corresponding equations and 2<sup>3</sup> and 2<sup>2</sup> complete designs. See DOI: 10.1039/b705798a

chromatographic run. Kohlmeyer *et al.*<sup>27</sup> reported the separation of up to 17 arsenic species in an oyster tissue extract.

Prior to separation and detection, an extraction step must be considered. Indeed, it is of primary importance to use a method that does not induce losses or alterations of the species present in the matrix.<sup>11</sup> In recent years, microwave-assisted extraction (MAE) methods have been increasingly used for arsenic species extraction for various food matrices such as fish products<sup>18–20,36,37,42–48</sup> or plants.<sup>38,42,49</sup> These methods rely on the immersion of the sample in a solvent that is characterized by a smaller dielectric constant than the sample matrix and is relatively transparent to microwaves.<sup>50</sup> A low power is generally selected in order to keep intact the carbon–arsenic bonds.<sup>15</sup> Moreover, Brisbin *et al.*<sup>48</sup> studied a MAE method with various solvents (water, water–methanol mixture or nitric acid) and extraction times (2–6 min) on a certified reference material (CRM) of lobster (TORT-1). They showed that MAE was the simplest, fastest and most reproducible extraction method, which resulted in better or similar extraction rates than those observed with other extraction methods.

The aim of this work was to optimise, using an experimental design, an anion-exchange separation for the simultaneous determination of seven As species (As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, MMA, DMA, AsB, AsC, TMAO) in fish samples by coupling IEC and ICP-MS. The optimisation was performed in two steps: (1) the effect of several parameters and their possible interactions on the Dionex AS7 anion-exchange separation of arsenic species was assessed using an experimental design; (2) based on the results of this experimental design, the best operating conditions for the separation of the seven arsenic species in a single chromatographic run were determined. Thereafter, some analytical figures of merit such as linearity of the calibration, retention time stability, as well as limits of quantification (LOQ), were measured. Lastly, some CRMs were studied after MAE in order to evaluate the accuracy of the method for arsenic speciation in real fish samples.

## Experimental

### Instrumentation

A VG PlasmaQuad ExCell ICP-MS instrument (Thermo Electron, Courtaboeuf, France) was used for detection of the As species. The sample solutions were supplied using a peristaltic pump by a ASX 500 Model 510 autosampler (CETAC, Omaha, Nebraska, USA).

The chromatographic system consisted of an LC 200 binary pump (PerkinElmer, Courtaboeuf, France), an injection valve with a 100  $\mu$ L injection loop, an IonPac AG7 guard column, and an IonPac AS7 (250  $\times$  4 mm  $\varnothing$ , 10 mm particles) anion-exchange column (all Dionex, Voisins Le Bretonneux, France). The analytical column was connected to the nebuliser of the ICP-MS instrument using a 50 cm-long PEEK tubing (0.17 mm  $\varnothing$ ). Sample extraction was carried out using a Multiwave closed-vessel microwave digestion system (Anton Paar, Courtaboeuf, France) equipped with a rotor for 6 type X sample vessels (50 mL quartz tubes; operating pressure 75 bar). A Universal 32R centrifuge (Hettich, Tuttingen, Germany) operated at 3500 rpm for 5 min was used as needed

to separate the supernatant from undissolved material after extractions. Disposable 0.45  $\mu$ m nylon syringe filters (Nalgoc International Corporation, Rochester, NY, USA) were used for sample filtration.

### Reagents and standards

Multi-elemental standard solution (10 mg L<sup>-1</sup>) (PerkinElmer and 6% (v/v) nitric acid (HNO<sub>3</sub>, Suprapur, 65%, Merck Darmstadt, Germany) were used to prepare tuning solutions along with purified water (18 M $\Omega$  cm) from a Milli-Q™ PLUS system coupled to an Elix pre-system (Millipore S.A., Saint Quentin Yvelines, France). Some 1000 mg As L<sup>-1</sup> standard stock solutions were prepared from the following reagents: sodium (meta)arsenite ( $\geq 99.0\%$ ), sodium arsenate dibasic heptahydrate ( $\geq 98.5\%$ ), disodium methyl arsenate ( $\geq 98.4\%$ ), cacodylic acid ( $\geq 99.0\%$ ) (all Sigma–Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) and arsenobetaine, arsenocholine and trimethylarsine oxide (all Argus Chemicals Vernio, Italy).

Methanol (HPLC gradient grade, Sigma–Aldrich), benzene 1,2-disulfonic acid dipotassium salt (BDSA, Sigma–Aldrich) and nitric acid (Suprapur, 65%, Merck) were used as the eluents. Stock solutions of each As compound were stored at 4 °C in the dark. The stability of these standards in terms of total arsenic content and purity of the species was checked by ICP-MS. Each stock solution was further diluted to 1 mg As L<sup>-1</sup>, out of which multi-compound calibration standards were prepared daily. CRM 422 (Lyophilised Cod Muscle), CRM 627 (Tuna Fish) and DORM-2 (Dogfish Muscle) were purchased from Promochem (Molsheim, France). All samples were used as provided without further grinding.

### Microwave assisted extraction procedure

The extraction procedure tested in this study was as described by Brisbin *et al.*<sup>48</sup> Samples of 0.150 g were accurately weighed into a 50 mL quartz vessel and 10 mL of solvent (80% methanol, 20% Milli-Q water) was added. The quartz vessels (6 at a time) were then assembled and placed into the microwave system. The samples were heated and maintained at 75 °C for 4 min, cooled to 30 °C before opening the extractor vessels, and then removed, centrifuged and filtered with a disposable 0.45  $\mu$ m nylon syringe filter before analysis.

### Arsenic species determination procedure

A nitric acid gradient (pH 3.4–1.8), with BDSA as ion-pairing reagent and methanol in the mobile phase, was first used to separate the 7 arsenic species. Different gradients were investigated in order to optimise the chromatographic separation. In each case, the column was conditioned by passing at least 60 mL of mobile phase through it prior to injection of As standards and samples.

The torch position and ion lenses of the ICP-MS system were optimised daily by performing short-term stability tests in the standard mode with a 1  $\mu$ g L<sup>-1</sup> tuning solution (containing especially As, Ba and In) to maximize the As signal and stability while minimising oxide levels (BaO<sup>+</sup>/Ba<sup>+</sup> < 2%). The signals were monitored in the time-resolved-analysis (TRA) mode. For quantification using peak area, the

Table 1 Initial and optimised instrumental settings and separation conditions

ICP-MS	
Plasma gas flow	Ar, 14.9 L min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas flow	Ar, 0.8 L min <sup>-1</sup>
Aerosol carrier	Ar, 0.9 L min <sup>-1</sup>
Plasma power	1350 W (1450 W in optimised conditions)
Sampling/skimmer cone	Ni (1.0 mm/0.75 mm)
Monitored signals	<sup>75</sup> As, 500 ms
LC 200 with standard gradient pump	
Columns	IonPac AG7 + IonPac AS7
Column temperature	20 °C
Initial conditions	
Mobile phase flow rate	1 mL min <sup>-1</sup>
Mobile phase A (MPA)	0.5 mmol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> , 0.05 mmol L <sup>-1</sup> BDSA, 0.5% MeOH
Mobile phase B (MPB)	50 mmol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> , 0.05 mmol L <sup>-1</sup> BDSA, 0.5% MeOH
Optimised conditions	
Mobile phase flow rate	1.35 mL min <sup>-1</sup>
Mobile phase A (MPA)	0.5 mmol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> , 1% MeOH
Mobile phase B (MPB)	50 mmol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> , 1% MeOH
Gradient program	100% MPA: 2.5 min 10% MPA: 3 min 80% MPA: 5 min

chromatographic software (PlasmaLab) of the ICP-MS instrument was used. A 5-point external calibration with the respective standard compounds was carried out. Unknown peaks were quantified using the calibration curve of the nearest eluting standard compound. Initial separation conditions and instrument settings are summarized in Table 1. The experiments were performed with standard solutions containing 20 µg As L<sup>-1</sup> each of seven arsenic species, *i.e.*, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, MMA, DMA, AsB, AsC and TMAO.

### Experimental design

The experimental design used in this work was based on the concepts described by Goupy<sup>51</sup> as well as Sado and Sado.<sup>52</sup> Seven factors were identified using preliminary experiments: (1) HNO<sub>3</sub> concentration in the eluent, (2) gradient time, (3) BDSA concentration, (4) MeOH concentration in mobile phases A and B, (5) mobile phase flow rate, (6) column

temperature and (7) the rf-power to the plasma. Chromatographic resolution between adjacent peaks ( $R_1$  to  $R_6$ ), total separation time ( $T$ ) and peak heights of the most toxic species, As<sup>III</sup> and As<sup>V</sup> ( $S_1$  and  $S_2$ ), were selected as the responses to optimise. A fractional design 2<sup>7-4</sup> (8 experiments) and complementary fractional design (8 experiments) were selected to minimise the number of experiments while avoiding aliases between factors and interactions. They are summarised, along with the experimental responses obtained, in ESI Table S1†.

## Results and discussion

### Effect of the factors and interactions

The effects of each of the factors and their interactions on the 9 responses were calculated as described previously<sup>51,52</sup> and are presented in Table 2. First, the HNO<sub>3</sub> concentration (1) generally had the most effect on the 6 studied resolutions,

Table 2 Principal effect of factors and their corresponding interactions of the second order

	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	$R_6$	$T$	$S_1$	$S_2$
Factors <sup>a</sup>									
1	<b>0.42</b>	-0.39	<b>0.37</b>	-0.28	<b>0.31</b>	<b>0.11</b>	158	-1177	10352
2	-0.04	0.11	<b>0.24</b>	0.29	-0.19	-0.11	-74	-2271	-5451
3	-0.14	-0.04	0.14	-0.05	0.01	-0.06	-26	-2647	-9687
4	0.01	0.08	-0.03	-0.13	0.08	0.05	51	5915	13070
5	0.11	-0.13	0.11	-0.02	-0.07	-0.10	-161	1183	-134
6	-0.06	-0.02	<b>0.25</b>	-0.19	0.00	-0.08	-57	-1452	-8247
7	0.05	0.04	0.02	0.07	0.08	0.00	18	10047	16841
Interactions <sup>ab</sup>									
25 + 37 + 46	0.00	-0.04	0.06	0.03	0.10	0.02	27	538	-1504
15 + 36 + 47	0.11	-0.05	0.06	-0.08	-0.03	0.01	-48	2141	<b>9501</b>
17 + 26 + 45	0.04	-0.02	-0.02	-0.06	0.08	0.00	23	4021	3096
16 + 27 + 35	-0.09	0.03	0.08	0.18	0.00	-0.02	-60	-494	-4638
12 + 34 + 67	-0.01	-0.08	<b>0.31</b>	-0.18	-0.26	-0.05	-92	-1661	-11996
14 + 23 + 57	-0.01	-0.03	-0.01	0.11	0.12	0.04	35	995	3085
13 + 24 + 56	-0.17	0.02	0.15	-0.11	-0.14	-0.01	-26	1782	-2638

<sup>a</sup> Coefficients in bold are considered as significant. <sup>b</sup> Combination of the interactions are calculated as reported by Goupy *et al.*<sup>51</sup> (1) Mobile phase A (%), (2) gradient time (min), (3) BDSA concentration (mM), (4) MeOH concentration (%), (5) mobile phase flow rate (mL min<sup>-1</sup>), (6) column temperature (°C), (7) plasma power (W),  $R_1$  resolution As<sup>III</sup>/MMA,  $R_2$  resolution MMA/DMA,  $R_3$  resolution DMA/As<sup>V</sup>,  $R_4$  resolution As<sup>V</sup>/AsB,  $R_5$  resolution AsB/TMAO,  $R_6$  resolution TMAO/AsC,  $T$  separation time (s),  $S_1$  intensity of As<sup>III</sup> (cps),  $S_2$  intensity of As<sup>V</sup> (cps).

which is in agreement with previous works.<sup>26,27</sup> Other factors had an effect, such as gradient time (2) on  $R_3$  and  $R_6$ , mobile phase flow rate (5) on  $R_6$  and column temperature (6) on  $R_3$  and  $R_6$ . This was to be expected since when the column temperature increases, the viscosity of the mobile phase decreases and diffusion rates increase, resulting in an enhancement of the mass transfer rate between the mobile phase and the stationary phase and a modification of some retention times.<sup>26</sup> On the other hand, MeOH concentration (4) did not appear to have any effect on resolution. Moreover, while the BDSA concentration (3) is supposed to affect resolution,<sup>26,27</sup> no effect was in fact observed, as reported earlier.<sup>35</sup> Interactions between two factors could also be significant, such as coefficient  $12 + 34 + 67(0.31)$  on  $R_3$ . It could be attributed to interaction (12) since these 2 factors (*i.e.*,  $\text{HNO}_3$  concentration (1) and gradient time (2)) were significant for this response. The results also show that the total separation time depends on  $\text{HNO}_3$  concentration (1) and mobile phase flow rate (5), which was to be expected since, for instance, a higher flow rate will result in peaks being detected earlier and so will reduce the total separation time.

In any case, signal intensities ( $S_1$  and  $S_2$ ) were clearly affected by the MeOH concentration (4) and plasma power (7), as expected (improvement of ionisation).<sup>27,53</sup> However,  $\text{HNO}_3$  (1) and BDSA (3) concentrations also had an effect on  $S_2$ . These results show that adding MeOH in combination with high plasma power increased the signal intensity (positive interaction) whereas addition of BDSA to the mobile phase was not suitable (negative interaction observed between MeOH and BDSA). Finally, the mobile phase flow rate had no significant effect on intensities, even when it was higher than the sample uptake rate of the nebuliser ( $0.9 \text{ mL min}^{-1}$ ).

#### Use of mathematical models to optimise IEC/ICP-MS conditions

In general, linear models were found, through a comparison of the experimental values at the central point with the means of the responses, to be representative of the variation of responses over the entire experimental field, as summarised in ESI Table S2†.

Only in the case of the resolution between  $\text{DMA}/\text{As}^{\text{V}}$  ( $R_3$ ) and separation time ( $T$ ) were second order models required, which were established using the  $2^3$  and  $2^2$  complete designs that are summarised in ESI Table S3† with the experimental responses obtained.

It could be noted that a negative interaction between  $\text{HNO}_3$  concentration (1), gradient time (2) and column temperature

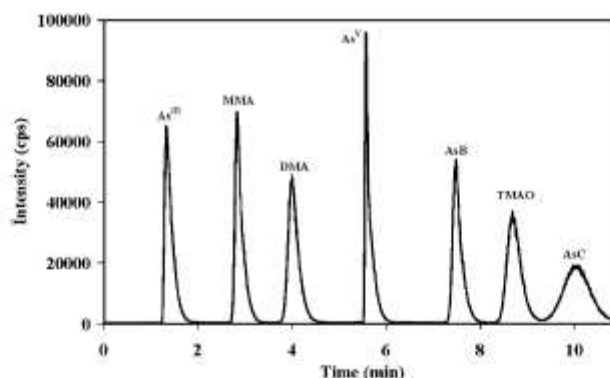


Fig. 1 Chromatogram of arsenic species ( $20 \mu\text{g As L}^{-1}$  each) from a standard solution with optimised IEC-ICP-MS conditions.

(6) on  $R_3$  was observed. Moreover, a positive interaction between  $\text{HNO}_3$  concentration (1) and mobile phase flow rate (5) on separation time ( $T$ ) had also been established.

All the validated models were then used to mathematically determine the optimal conditions of all factors in order to increase resolutions, minimise separation time and maximise signal intensities of  $\text{As}^{\text{III}}$  and  $\text{As}^{\text{V}}$ . These optimised IEC/ICP-MS conditions are summarised in Table 1.

#### Analytical figures of merit and applications

The separation of the 7 arsenic species (Fig. 1), taking less than 15 min (including a stabilisation of 4 min between 2 injections), was satisfactory, as the resolutions ranged between 1.1 and 2.5, and the separations were faster than those reported earlier on the same column.<sup>26,27,29–31,35,38</sup>

The figures of merit are presented in Table 3. The linearity of the calibration curves obtained with 0, 2, 5, 10 and  $20 \mu\text{g As L}^{-1}$  standard solutions of each species was considered satisfactory with a correlation coefficient  $r^2 > 0.995$ .

The LOD and LOQ were estimated as, respectively, 3 and 6 times the standard deviation of the average signal from the blank samples ( $n = 7$ ) after corrections for sample weight and dilution. The values obtained were, in general, slightly better than or similar to most of those previously reported.<sup>27,37,43,48</sup>

The relative standard deviations (RSD) of retention times, peak heights and peak areas were at the most 2.4, 4.3 and 4.3% ( $n = 5$ ), respectively, for each compound ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

In order to assess trueness, 3 different CRMs of fish products were analysed by the optimised IEC-ICP-MS method (Table 4). To directly compare the observed results with the

Table 3 Figures of merit of the optimised separation conditions

	$\text{As}^{\text{III}}$	MMA	DMA	$\text{As}^{\text{V}}$	AsB	TMAO	AsC
Concentration range/ $\mu\text{g L}^{-1}$	0–20	0–20	0–20	0–20	0–20	0–20	0–20
$r^2$	0.9986	0.9978	0.9979	0.9990	0.9981	0.9983	0.9968
LOQ <sup>a</sup> / $\text{mg As kg}^{-1}$	0.008	0.016	0.016	0.024	0.033	0.014	0.042
Retention time <sup>b</sup> /min	1.3 (1.3)	2.8 (2.4)	4.0 (0.7)	5.5 (1.8)	7.5 (0.9)	8.8 (1.4)	10.1 (1.4)
Peak area <sup>b</sup> ( $10^6$ cps)	1.03 (3.4)	1.16 (3.2)	1.15 (3.2)	1.14 (4.0)	1.03 (4.1)	1.03 (3.9)	1.06 (4.3)
Peak height <sup>b</sup> ( $10^4$ cps)	6.64 (1.5)	7.01 (2.6)	4.81 (1.6)	10.00 (1.0)	5.81 (1.5)	3.83 (3.5)	1.85 (4.3)

<sup>a</sup>  $n = 7$  with sample weight of 0.15 g and volume dilution of 30 mL. <sup>b</sup> RSD (%) of 5 analyses performed on 5 different days (in parentheses).

Table 4 Results of arsenic species contents obtained in CRMs by optimised IEC-ICP-MS (mg As kg<sup>-1</sup>; n = 2) and previous studies

CRM	As <sup>III</sup>	MMA	DMA	As <sup>V</sup>	AsB	TMAO	AsC	Total As	Ref.
CRM 627	0.076	< LOQ	0.157	< LOQ	4.12	0.037	< LOQ	4.36	This work
			0.15		3.9			4.80	Certified
	0.140	—	0.140	—	3.70	0.010	0.012	4.10	54
DORM-2	—		0.140	0.010	3.60	—	—	—	55
	0.075	< LOQ	0.281	0.024	18.3	0.152	< LOQ	18.8	This work
					16.4			18.0	Certified
	—	—	0.280	—	16.8	< 0.003	0.023	—	18
	—	—	0.280	—	16.8	—	0.023	—	20
	—	—	0.660	—	15.8	—	—	—	24
	—	—	—	—	16.1	< 0.050	< 0.050	—	25
	0.100	—	0.300	0.400	13.5	0.400	0.02	14.8	26
	0.050	0.140	0.490	0.050	16.1	0.300	—	17.4	27
	0.080	—	0.280	0.400	13.5	0.400	0.02	—	28
	0.110	0.310	0.160	—	16.9	0.340	—	18.2	37
	0.110	—	0.300	—	16.9	0.021	0.010	17.8	54
	—	0.070	0.320	0.020	17.1	—	—	—	42
	—	0.050	0.340	0.020	16.2	—	0.010	—	42
	—	—	0.160	1.90	16.5	—	—	18.9	43
—	—	0.250	0.360	16.0	—	—	—	44	
CRM 422	0.109	< LOQ	0.066	< LOQ	24.1	0.101	< LOQ	24.4	This work
								21.1	Certified

certified value, Z-scores were calculated according to the most suitable procedure for the short-term evaluation of the CRMs, with the relative standard deviation corresponding to intermediate precision under reproducibility conditions arbitrarily fixed at 10% ( $k = 2$ ;  $p = 95\%$ ).<sup>56</sup>

All Z-scores involving the certified values were smaller than |2|, as well for total As (-0.6; 0.4; 1.1 for CRM 627, DORM-2 and CRM 422, respectively) as for As species (0.3 for DMA in CRM 627; 0.4 and 1.0 for AsB in CRM 627 and DORM-2, respectively), which indicates good agreement. Similarly, the concentrations for all 7 species correlated with the findings of others.

In the future, the MAE method for arsenic compounds in real samples will be optimised with the assistance of experimental design, to gain a better understanding of mechanisms and influence of parameters. This will enable validation of this speciation method, which may then be used as a reference method for the determination of arsenic compounds in seafood. This method can also be used to evaluate the exposure of the French population within the framework of the second French Total Diet Study (FTDS 2). Finally, it will be combined with a fast continuously leaching method to allow the determination of bio-accessible arsenic species.<sup>57</sup>

## References

- 1 P. Thomas, J. K. Finnie and J. G. Williams, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, 12, 1367.
- 2 B. K. Mandal and K. T. Suzuki, *Talanta*, 2002, 58, 201.
- 3 U. Ballin, R. Kruse and H. S. Russel, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1994, 350, 54.
- 4 W. P. Tseng, H. M. Chu, S. W. How, J. M. Fong, C. S. S. Lin and S. Yen, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, 40, 453.
- 5 M. O. Andrae, *Organometallic Compounds in the Environment. Principles and Reactions*, ed. P. J. Craig, Longman, London, 1986.
- 6 J. Brown and K. Kitchin, *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 1997, 17, 71.
- 7 Y. Oya-Ohta, T. Kaise and T. Ochi, *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.*, 1996, 357, 123.
- 8 T. Kaise, Y. Horiguchi, S. Fukui, K. Shiomi, M. Chino and T. Kikuchi, *Appl. Organomet. Chem.*, 1992, 6, 369.
- 9 J. M. Neff, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, 16, 917.
- 10 WHO (World Health Organization), Arsenic and arsenic compounds, Environmental Health Criteria 224, 2nd edn, Geneva, 2001. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>.
- 11 Z. Gong, X. Lu, M. Ma, C. Watt and X. C. Le, *Talanta*, 2002, 58, 77.
- 12 K. A. Francesconi and D. Kuehnelt, *Analyst*, 2004, 129, 373.
- 13 M. Leermakers, W. Baeyens, M. De Gietera, B. Smedts, C. Meert, H. C. De Bisschop, R. Morabito and P. Quevauviller, *Trends Anal. Chem.*, 2006, 25(1), 1.
- 14 T. Guérin, A. Astruc and M. Astruc, *Talanta*, 1999, 50, 1.
- 15 C. B'Hymer and J. A. Caruso, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1045(1–2), 1.
- 16 D. Beauchemin, *Anal. Chem.*, 2006, 78(12), 4111.
- 17 D. T. Heitkemper, N. P. Vela, K. R. Stewart and C. S. Westphal, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 299.
- 18 J. Kirby and W. Maher, *Appl. Organomet. Chem.*, 2002, 16(2), 108.
- 19 R. Tukai, W. A. Maher, I. J. McNaught and M. J. Ellwood, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 457(2), 173.
- 20 J. Kirby and W. Maher, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17(8), 838.
- 21 R. Schaeffer, K. A. Francesconi, N. Kienzl, C. Soeroes, P. Fodor, L. Varadi, R. Raml, W. Goessler and D. Kuehnelt, *Talanta*, 2006, 69(4), 856.
- 22 J. Zheng and H. Hintelmann, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19(1), 1991.
- 23 W. Li, C. Wei, C. Zhang, M. Van Hulle, R. Cornelis and X. Zhang, *Food Chem. Toxicol.*, 2003, 41(8), 1103.
- 24 I. Pizarro, M. Gómez, C. Cámara and M. A. Palacios, *Anal. Chim. Acta*, 2003, 495(1–2), 85.
- 25 D. Kuehnelt, K. J. Irgolic and W. Goessler, *Appl. Organomet. Chem.*, 2001, 15(6), 445.
- 26 S. Londesborough, J. Mattusch and R. Wennrich, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1999, 363, 577.
- 27 U. Kohlmeier, J. Kuballa and E. Jantzen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, 16, 965.
- 28 J. Mattusch and R. Wennrich, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 3649.
- 29 U. Kohlmeier, E. Jantzen, J. Kuballa and S. Jakubik, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 377, 6.
- 30 U. Kohlmeier, S. Jakubik, J. Kuballa and E. Jantzen, *Mikrochim. Acta*, 2005, 151(3–4), 249.
- 31 A. C. Schmidt, W. Reisser, J. Mattusch, P. Popp and R. Wennrich, *J. Chromatogr. A*, 2000, 889(1–2), 83.
- 32 B. P. Jackson Bertsch, M. L. Cabrera, J. J. Camberato, J. C. Seaman and C. W. Wood, *J. Environ. Qual.*, 2003, 32, 535.
- 33 B. P. Jackson and P. Bertsch, *Environ. Sci. Technol.*, 2001, 35(24), 4868.
- 34 B. Daus, R. Wennrich, P. Morgenstern, H. Wei, E. H. L. Palmieri, H. A. Nalini, L. V. Leonel, R. P. G. Monteiro and R. M. Moreira, *Mikrochim. Acta*, 2005, 151(3–4), 175.

- 35 S. Simon, H. Tran, F. Pannier and M. Potin-Gautier, *J. Chromatogr., A*, 2004, 1024, 105.
- 36 S. H. Karthikeyan, K. Honda, O. Shikino and S. Hirata, *At. Spectrosc.*, 2003, 24(3), 79.
- 37 S. H. Karthikeyan, *Appl. Organomet. Chem.*, 2004, 18, 323.
- 38 J. Mattusch, R. Wennrich, A. C. Schmidt and W. Reisser, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2000, 366, 200.
- 39 S. H. Nam, J. J. Kim and S. S. Han, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, 24(12), 1805.
- 40 B. Daus, H. Weiss, J. Mattusch and R. Wennrich, *Talanta*, 2006, 69, 430.
- 41 S. N. Ronkart, V. Laurent, P. Carbonnelle, N. Mabon, A. Copin and J. P. Barthelemy, *Chemosphere*, 2007, 66, 738.
- 42 S. Foster, W. Maher, F. Krikowa and S. Apte, *Talanta*, 2007, 71(2), 537.
- 43 S. Hirata and H. Toshimitsu, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 383(3), 454.
- 44 S. H. Karthikeyan, S. Hirata and C. S. P. Iyer, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2004, 84(8), 573.
- 45 K. L. Ackley, C. B'Hymer, K. L. Sutton and J. A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 845.
- 46 E. H. Larsen, J. Engman, J. J. Sloth, M. Hansen and L. Jorhem, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381(2), 339.
- 47 J. A. Brisbin and J. A. Caruso, *Analyst*, 2002, 127, 921.
- 48 J. A. Brisbin, C. B'Hymer and J. A. Caruso, *Talanta*, 2002, 58(1), 133.
- 49 M. Quaghebeur and Z. Rengel, *Plant Physiol.*, 2003, 132, 1600.
- 50 J. R. J. Paré, J. M. R. Bélanger and S. S. Stafford, *Trends Anal. Chem.*, 1994, 13(4), 176.
- 51 J. Goupy, *La méthode des plans d'expériences*, ed., Dunod Bordas, Paris, 1988.
- 52 G. Sado and M. C. Sado, *Les plans d'expériences*, Afnor Technique, Paris, 1991.
- 53 D. Beauchemin, K. W. M. Siu, J. W. McLaren and S. S. Berman, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1989, 4, 285.
- 54 J. J. Sloth, E. H. Larsen and K. Julshamn, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18(5), 452.
- 55 E. Sanz, R. Munoz-Olivas and C. Camara, *J. Chromatogr., A*, 2005, 1097, 1.
- 56 L. Jorhem, J. Engman and T. Schroder, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2001, 370, 178.
- 57 M. Chu and D. Beauchemin, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 1213.

Les tableaux ESI S1, S2 et S3 sont des données supplémentaires de l'Article I uniquement disponibles sur le site de l'éditeur du journal « Journal of Analytical and Atomic Spectrometry ». <http://www.rsc.org/suppdata/JA/b7/b705798a/index.sht>

ESI Table S1 Experimental design matrix corresponding to the fractional factorial design 2<sup>7-4</sup>

	1	2	3	4	5	6	7	8		9	10	11	12	13	14	15	16	Means
(1)	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	(1)	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1
(2)	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	(2)	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
(3)	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	(3)	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1
(4)=(123)	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	(4)=(123)	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
(5)=(12)	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	(5)=(-12)	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
(6)=(23)	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	(6)=(-23)	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1
(7)=(13)	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	(7)=(-13)	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1
R <sub>1</sub>	0.49	1.22	0.43	1.84	0.53	1.08	0.49	1.10	R <sub>1</sub>	0.43	2.18	0.48	1.33	0.63	1.04	0.47	0.84	0.91
R <sub>2</sub>	2.05	1.69	2.88	1.27	2.10	1.55	2.32	1.40	R <sub>2</sub>	2.13	1.47	2.45	1.82	2.25	1.32	2.36	1.80	1.93
R <sub>3</sub>	1.15	0.71	0.35	1.36	0.47	0.92	0.40	2.74	R <sub>3</sub>	0.62	0.18	0.72	1.48	0.78	1.68	0.25	1.50	0.96
R <sub>4</sub>	1.83	1.91	2.89	1.99	1.92	1.67	2.50	1.64	R <sub>4</sub>	2.54	1.99	2.37	2.42	1.69	1.67	4.00	2.05	2.19
R <sub>5</sub>	1.09	2.82	1.23	1.33	1.28	2.47	1.58	1.80	R <sub>5</sub>	1.13	2.52	1.12	1.43	1.36	1.55	1.49	1.25	1.59
R <sub>6</sub>	0.37	1.02	0.61	0.55	0.45	0.90	0.38	0.41	R <sub>6</sub>	0.81	1.04	0.37	0.52	0.60	0.53	0.37	0.77	0.61
T	483	1357	771	670	518	1398	754	585	T	764	1199	613	876	793	608	563	1099	816
S <sub>1</sub>	44669	31529	57118	20386	35510	48007	24452	56720	S <sub>1</sub>	31720	63326	36506	31101	42838	15747	31777	18948	36897
S <sub>2</sub>	32832	63245	92380	40548	18434	71930	23606	62311	S <sub>2</sub>	25352	147164	31925	35454	51495	24559	32564	29012	48926

Level Step	-1			0			+1		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
(1)	95	10	75	97.5	20	80	100	30	85
(2)	2	3	7	2.5	4	8	3	5	9
(3)	0				0.05			0.1	
(4)	0				0.1			1	
(5)	0.9				1.2			1.5	
(6)	20				30			40	
(7)	1250				1350			1450	

- (1) Mobile phase A (%)  
 (2) Gradient time (min)  
 (3) BDSA concentration (mM)  
 (4) MeOH concentration (%)  
 (5) Mobile phase flow rate (mL min<sup>-1</sup>)  
 (6) Column temperature (°C)  
 (7) Plasma power (W)
- R<sub>1</sub> Resolution As<sup>III</sup>/MMA  
 R<sub>2</sub> Resolution MMA/DMA  
 R<sub>3</sub> Resolution DMA/As<sup>V</sup>  
 R<sub>4</sub> Resolution As<sup>V</sup>/AsB  
 R<sub>5</sub> Resolution AsB/TMAO  
 R<sub>6</sub> Resolution TMAO/AsC  
 T Separation time (s)  
 S<sub>1</sub> Intensity of As<sup>III</sup> (cps)  
 S<sub>2</sub> Intensity of As<sup>V</sup> (cps)

ESI Table S2 Verification of models by central point method

	Theoretical model	Central point	
		Theoretical value	Observed value <sup>a</sup>
R <sub>1</sub>	$y = 0.91 + 0.42 \cdot x_1$	0.91 ± 0.18	0.77
R <sub>2</sub>	$y = 1.93 - 0.39 \cdot x_1$	1.93 ± 0.39	2.00
R <sub>3</sub>	$y = 0.96 + 0.37 \cdot x_1 + 0.24 \cdot x_2 + 0.25 \cdot x_6 + 0.31 \cdot x_1 \cdot x_2$	0.96 ± 0.19	2.01
R <sub>4</sub>	$y = 2.19$	2.19 ± 0.44	2.10
R <sub>5</sub>	$y = 1.59 + 0.31 \cdot x_1$	1.59 ± 0.32	1.47
R <sub>6</sub>	$y = 0.61 + 0.11 \cdot x_1 - 0.11 \cdot x_2 - 0.10 \cdot x_5 - 0.08 \cdot x_6$	0.61 ± 0.12	0.51
T	$y = 816 + 158 \cdot x_1 - 160 \cdot x_5$	816 ± 163	637
S <sub>1</sub>	$y = 36897 + 5915 \cdot x_4 + 10047 \cdot x_7$	36897 ± 7379	29650
S <sub>2</sub>	$y = 48926 + 10352 \cdot x_1 - 9687 \cdot x_3 + 13070 \cdot x_4 + 16841 \cdot x_7$ $+ 9501 \cdot x_4 \cdot x_7 - 11996 \cdot x_3 \cdot x_4$	48926 ± 9785	46250

<sup>a</sup> Means of 4 central point responses  
 Same legend as Table 2



ESI Table S3 Second order experimental design for resolution DMA/As<sup>V</sup> (R<sub>3</sub>) and separation time (T)

Resolution DMA/As <sup>V</sup> (R <sub>3</sub> )																		
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'	14'	15'	16'	17'	18'
(1)	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0	0	-α	+α	0	0	0	0	0	0
(2)	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	0	0	0	0	-α	+α	0	0	0	0
(6)	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	0	0	0	0	0	0	-α	+α	0	0
R <sub>3</sub>	1.62	1.40	0.74	2.38	0.78	1.63	0.75	2.08	1.94	1.98	0.65	2.24	1.58	1.60	2.02	1.95	2.05	2.05

Level Step	-α			-1			0			+1			+α		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
(1)	95	10	65	96	14	69	97.5	20	75	99	26	81	100	30	85
(2)	2	3	7	2.2	3.4	7.4	2.5	4	8	2.8	4.6	8.6	3	5	9
(6)		20			34			30			36			40	

## Separation time (T)

	1''	2''	3''	4''	5''	6''	7''	8''	9''	10''	11''	12''
(1)	-1	+1	-1	+1	0	0	-α	+α	0	0	0	0
(5)	-1	-1	+1	+1	0	0	0	0	-α	+α	0	0
T	702	828	558	600	648	654	606	678	810	558	624	618

Level Step	-α			-1			0			+1			+α		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
(1)	95	10	65	95.7	12.9	67.9	97.5	20	75	99.3	27.1	82.1	100	30	85
(5)		0.9			1.0			1.2			1.4			1.5	

## Models proposed and validated

$$y_{R_3} = 2.02 + 0.46.x'_1 + 0.04.x'_2 - 0.07.x'_6 + 0.29.x'_1.x'_2 + 0.09.x'_1.x'_6 + 0.04.x'_2.x'_6 - 0.17.x'_1.x'_2.x'_6 - 0.25.x'_1{}^2 - 0.20.x'_2{}^2 - 0.06.x'_6{}^2$$

$$y_T = 638 + 34.x''_1 - 92.x''_5 - 20.x''_1.x''_5 + 3.x''_1{}^2 + 25.x''_5{}^2$$

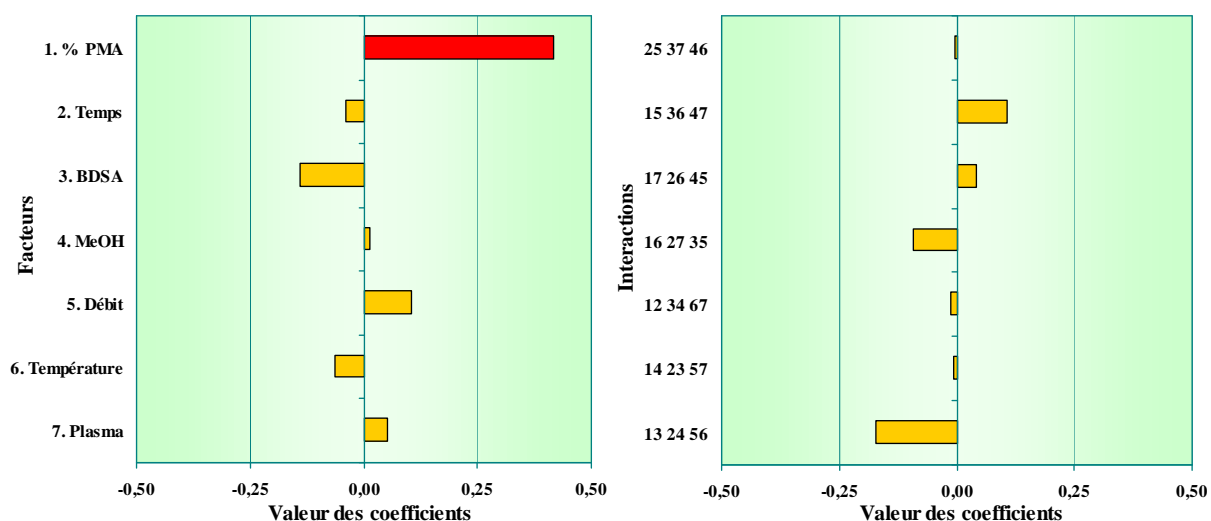
## II. 6. Résultats complémentaires et discussion

### II. 6. 1. Estimation de l'influence des paramètres sur la séparation des 7 espèces As

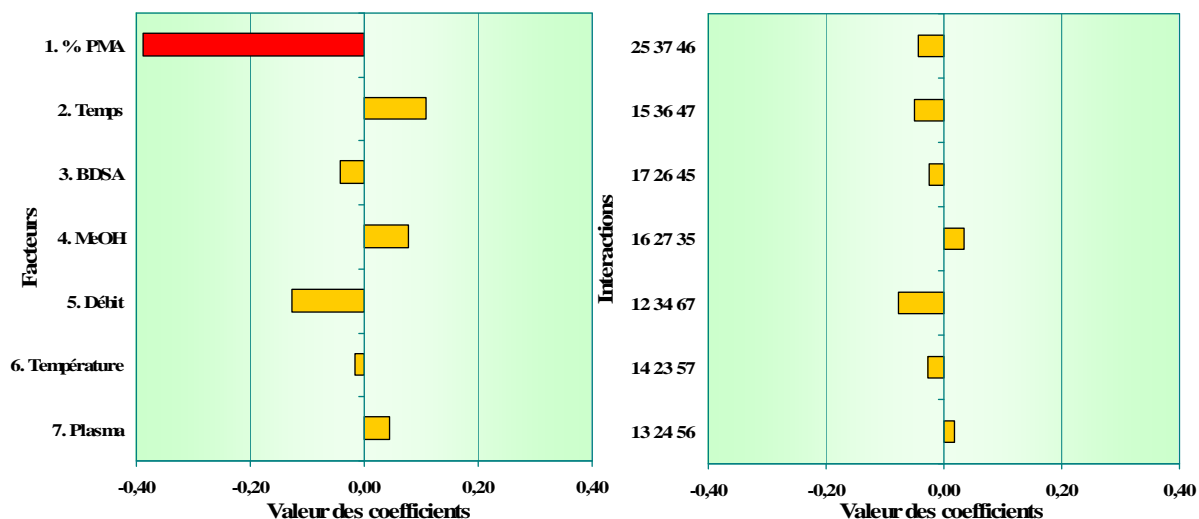
Comme indiqué dans l'article I, les effets de chacun des facteurs et de leurs interactions sur les 9 réponses étudiées ont été calculés comme décrit par Goupy (1989) et Sado et Sado (1991). Les figures 3 à 11 présentent l'ensemble des résultats de ce plan d'expériences. Les facteurs et leurs interactions considérés comme ayant un effet significatif sur la réponse étudiée sont représentés par un histogramme rouge.

#### II. 6. 1. a. Influence sur les résolutions

Les figures 3 à 8 présentent l'ensemble des résultats du plan d'expériences pour les résolutions.



**Figure 3 :** Résultats du plan d'expériences pour la résolution  $As(III)/MA (R_1)$



**Figure 4 :** Résultats du plan d'expériences pour la résolution  $MA/DMA (R_2)$

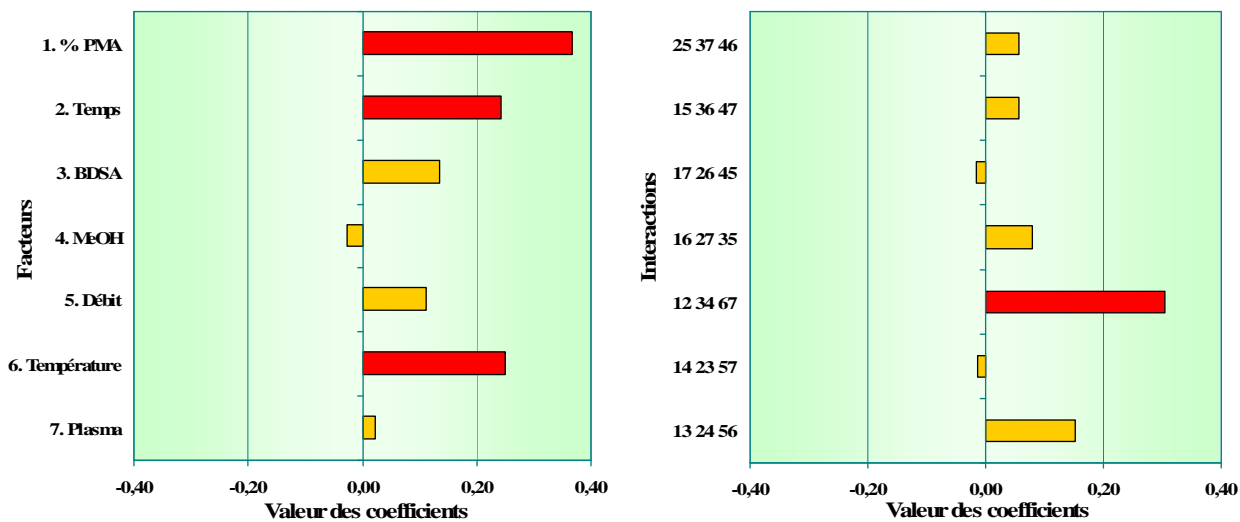


Figure 5 : Résultats du plan d'expériences pour la résolution DMA/As(V) ( $R_3$ )

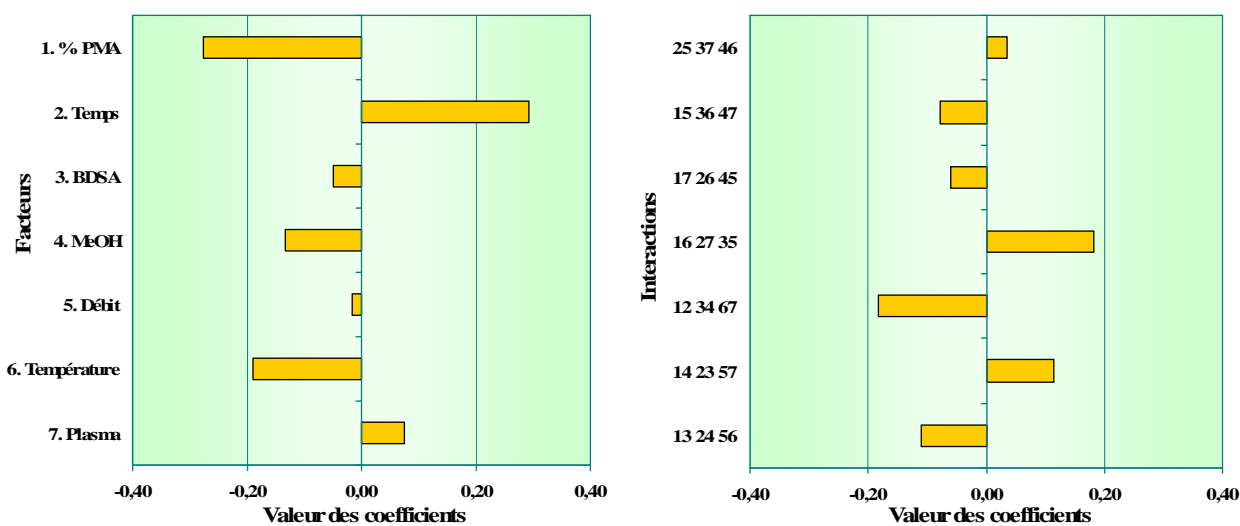


Figure 6 : Résultats du plan d'expériences pour la résolution As(V)/AB ( $R_4$ )

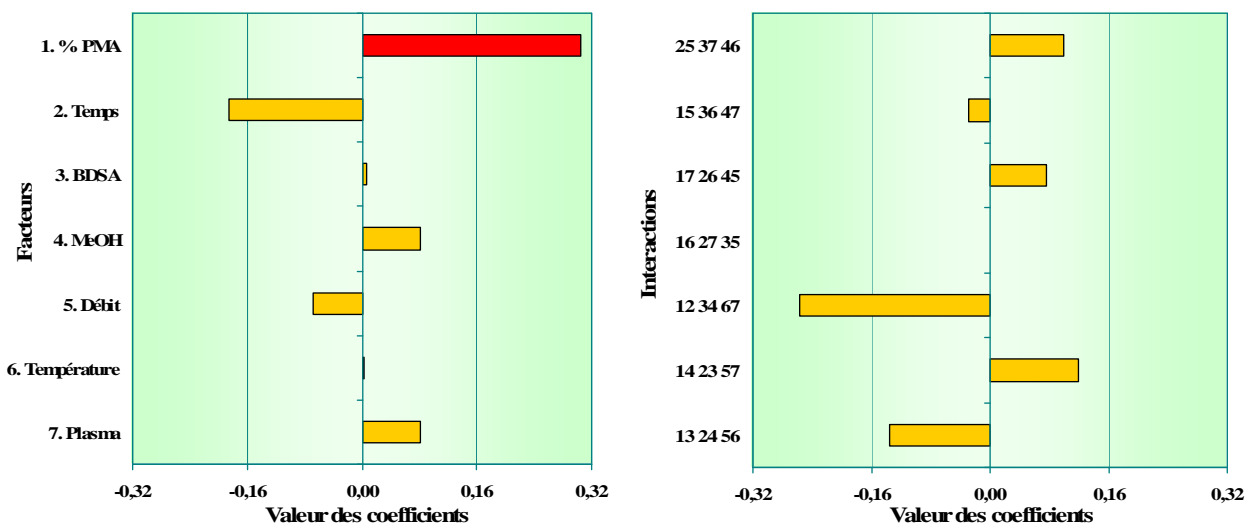
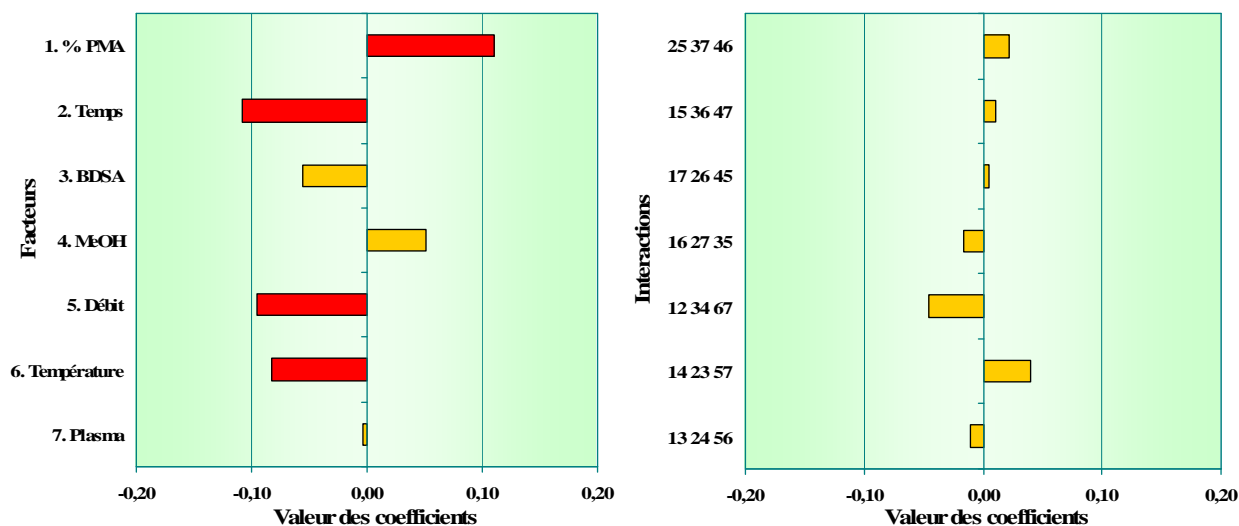


Figure 7 : Résultats du plan d'expériences pour la résolution AB/TMAO ( $R_5$ )



**Figure 8 :** Résultats du plan d'expériences pour la résolution TMAO/AC (R<sub>6</sub>)

Tout d'abord, la concentration en HNO<sub>3</sub> dans les phases mobiles représente généralement le paramètre le plus influent sur la résolution des pics des 7 espèces étudiées (Figures 3-5, 7 et 8), confirmant ainsi les travaux précédents. (Londesborough *et al.*, 1999 ; Kolhmeyer *et al.*, 2002) Seule la résolution As(V) / AB (R<sub>4</sub>) ne semble pas influencée significativement par chacun des facteurs étudiés. (Figure 6)

D'après le tableau II, dans la gamme de pH des phases mobiles utilisées (1,3 - 3,3), As(III) est neutre alors que As(V) peut être présent sous une forme neutre ou anionique. De même, MA peut être neutre (Me-AsO(OH)<sub>2</sub>) ou anionique (Me-AsO<sub>2</sub>(OH)<sup>-</sup>) et DMA et TMAO peuvent être cationiques ou neutres. AB peut être à la fois cationique ou zwitterionique.

Enfin, AC reste uniquement cationique. Ainsi, la modification de la forme des espèces selon le pH conduit à des temps de rétention différents. Ceci explique la prépondérance du pH des phases mobiles sur les résolutions des espèces As considérées.

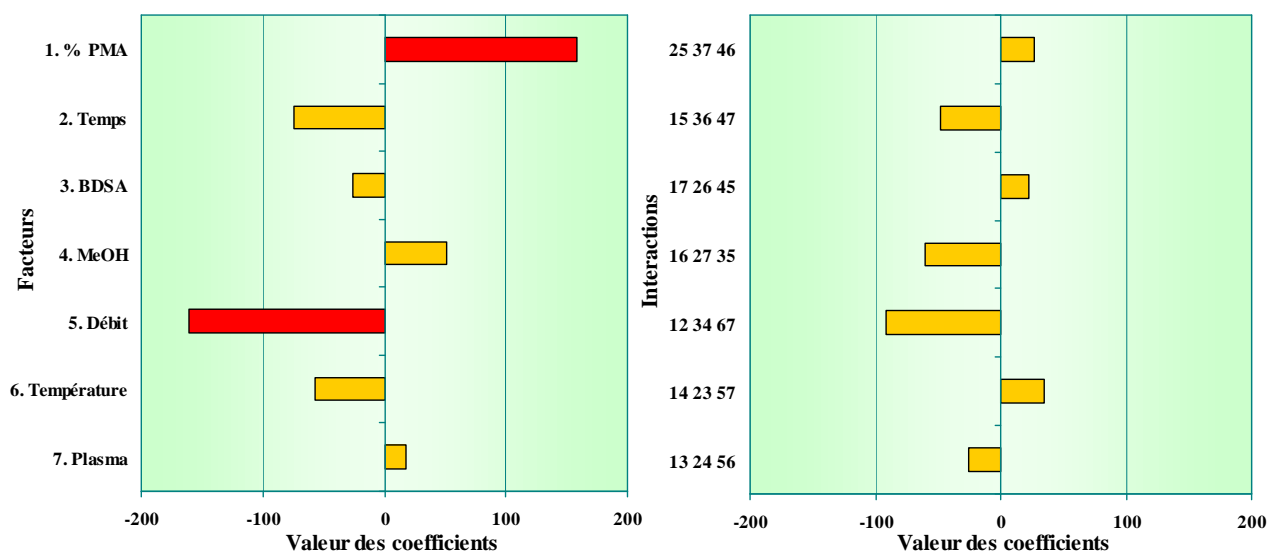
D'autres paramètres montrent un effet significatif comme le débit de la phase mobile (5) sur R<sub>6</sub> (Figure 8), la durée de chaque étape du mode gradient (2) et la température de la colonne (6) sur R<sub>3</sub> et R<sub>6</sub> (Figures 5 et 8). Pour ce dernier paramètre, cet effet semblait prévisible dans la mesure où il résulte d'une augmentation de la température de la colonne, une diminution de la viscosité de la phase mobile et une augmentation de sa capacité de diffusion, impliquant finalement une réduction des temps de rétention des espèces au sein de la colonne. (Londesborough *et al.*, 1999) À l'inverse, la concentration en MeOH (4) ne semble pas avoir d'influence sur la résolution.

D'autre part, la concentration en BDSA, qui était censée favoriser la séparation des espèces, (Londesborough *et al.*, 1999) ne montre aucune influence significative sur les résolutions, comme observé précédemment par Simon *et al.* (2004).

Une interaction significative sur  $R_3$  a également été constatée, qui pourrait correspondre à l'interaction entre les facteurs 12, 34 ou 67 (coefficient  $12 + 34 + 67 = 0,31$ ) (Figure 5). Pour déterminer à quelle interaction de facteurs ce coefficient correspond, les hypothèses 3 et 4 du plan d'expériences doivent être considérées. D'après ces hypothèses, ce coefficient ne peut être attribué ni à l'interaction (34) entre la concentration en BDSA et MeOH, ni à l'interaction (67) entre la température de la colonne et la puissance du plasma, dans la mesure où aucun des facteurs n'a une influence significative. À l'inverse, ce coefficient peut être attribué à l'interaction (12) entre la concentration en  $\text{HNO}_3$  et la durée du gradient, car ces deux paramètres ont une influence significative sur la réponse  $R_3$ .

### II. 6. 1. b. Influence sur le temps d'analyse

La figure 9 présente les résultats du plan d'expériences pour le temps d'analyse (T).

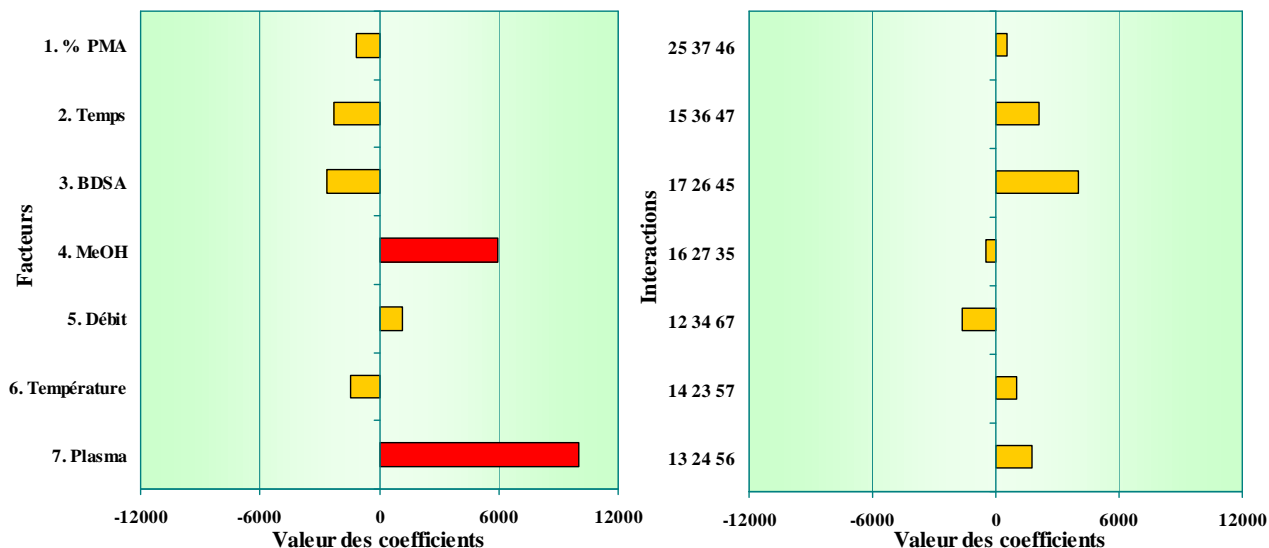


**Figure 9 :** Résultats du plan d'expériences pour le temps d'analyse (T)

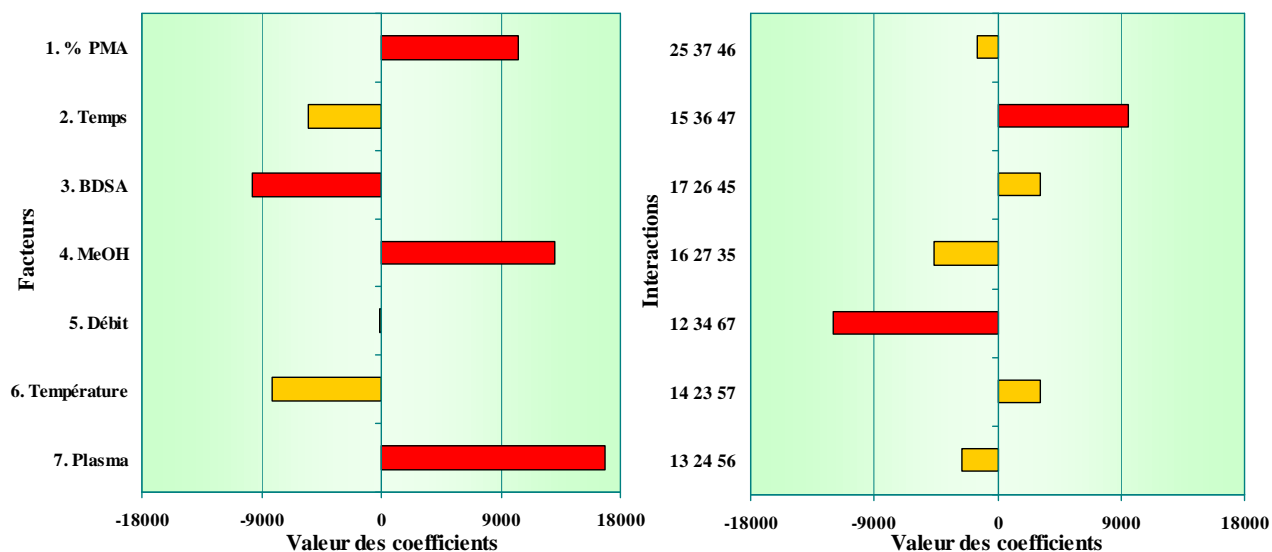
Le temps d'analyse (T) semble être influencé principalement par la concentration en acide nitrique (1) et le débit de la phase mobile (5) (Figure 9). Ainsi, plus la phase mobile sera concentrée en acide et/ou plus son débit sera important, plus les temps de rétention (et donc le temps d'analyse) seront faibles.

### II. 6. 1. c. Influence sur les sensibilités des espèces inorganiques

Les figures 10 et 11 présentent les résultats du plan d'expériences pour les sensibilités des espèces inorganiques ( $S_1$  et  $S_2$ ).



**Figure 10 :** Résultats du plan d'expériences pour la sensibilité de l'espèce As(III) ( $S_1$ )



**Figure 11 :** Résultats du plan d'expériences pour la sensibilité de l'espèce As(V) ( $S_2$ )

Les sensibilités des espèces inorganiques ( $S_1$  et  $S_2$ ) sont clairement influencées par la concentration en MeOH (4) et la puissance du plasma (7) (Figures 10 et 11). En effet, l'augmentation de ces deux paramètres améliore l'ionisation de l'As dans le plasma. (Beauchemin *et al.*, 1989) Néanmoins, les concentrations en acide nitrique et en BDSA ont aussi une influence sur la sensibilité de As(V) ( $S_2$ ) (Figure 11).

Ces résultats semblent montrer que l'ajout de MeOH combiné à une puissance du plasma élevée engendre une augmentation du signal alors que la présence de BDSA dans la phase mobile entraîne une interaction négative entre MeOH et BDSA. Enfin, le débit de la phase mobile ne semble pas avoir d'influence sur la sensibilité, même si celui-ci est plus important que le débit d'argon du nébuliseur de l'ICP-MS ( $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ ).

Le récapitulatif des facteurs et interactions considérés comme significativement influents est présenté dans le tableau X.

**Tableau X :** Récapitulatif des facteurs et interactions influents (7 espèces)

Réponses	Facteurs influents	Interactions influentes
<b>(R1) Résolution As(III)/MA</b>	(1) Concentration $\text{HNO}_3$	
<b>(R2) Résolution MA/DMA</b>	(1) Concentration $\text{HNO}_3$	
<b>(R3) Résolution DMA/As(V)</b>	(1) Concentration $\text{HNO}_3$ (2) Durée gradient (6) Température de la colonne	(12) Concentration $\text{HNO}_3$ / Durée gradient
<b>(R4) Résolution As(V)/AB</b>		
<b>(R5) Résolution AB/TMAO</b>	(1) Concentration $\text{HNO}_3$	
<b>(R6) Résolution TMAO/AC</b>	(1) Concentration $\text{HNO}_3$ (2) Durée gradient (5) Débit de PM (6) Température de la colonne	
<b>(T) Temp d'analyse</b>	(1) Concentration $\text{HNO}_3$ (5) Débit de PM	
<b>(S1) Sensibilité As(III)</b>	(4) Concentration MeOH (7) Puissance plasma	
<b>(S2) Sensibilité As(V)</b>	(1) Concentration $\text{HNO}_3$ (3) Concentration BDSA (4) Concentration MeOH (7) Puissance plasma	(47) Concentration MeOH / Puissance plasma (34) Concentrations BDSA / MeOH

## II. 6. 2. Vérification des modèles mathématiques pour la séparation des 7 espèces

De manière générale, la comparaison des valeurs expérimentales mesurées « au point au centre » avec les moyennes des réponses, montre que le modèle linéaire peut être appliqué à la variation des réponses sur l'ensemble du domaine d'étude comme présenté dans le tableau ESI S2-Article I. Seuls la résolution entre DMA et As(V) ( $R_3$ ) et le temps d'analyse ont nécessité d'établir des plans supplémentaires  $2^3$  et  $2^2$  afin de tester un modèle du second ordre. (Tableau ESI S3-Article I).

Notons qu'une interaction négative significative a pu être observée entre la concentration  $\text{HNO}_3$  (1), la durée de gradient (2) et la température de la colonne (6) sur la résolution entre DMA et As(V) ( $R_3$ ). Les temps de rétention de ces deux composés correspondent à la fin de la première étape et au début de la deuxième étape du programme gradient. Ces trois paramètres et leur interaction semble donc être particulièrement important lors du changement de phase mobile. De plus, une interaction positive entre la concentration en  $\text{HNO}_3$  (1) et le débit de la phase mobile (5) sur le temps d'analyse (T) a aussi été mise en évidence.

### II. 6. 3. Détermination des conditions chromatographiques optimales (7 espèces)

Par la suite, ces modèles mathématiques ont été utilisés pour établir les conditions analytiques optimales de l'ensemble des paramètres afin de maximiser les sensibilités des espèces As(III) et As(V), minimiser le temps d'analyse, tout en conservant des résolutions satisfaisantes. Ces conditions de séparation optimales sont présentées dans le tableau XI.

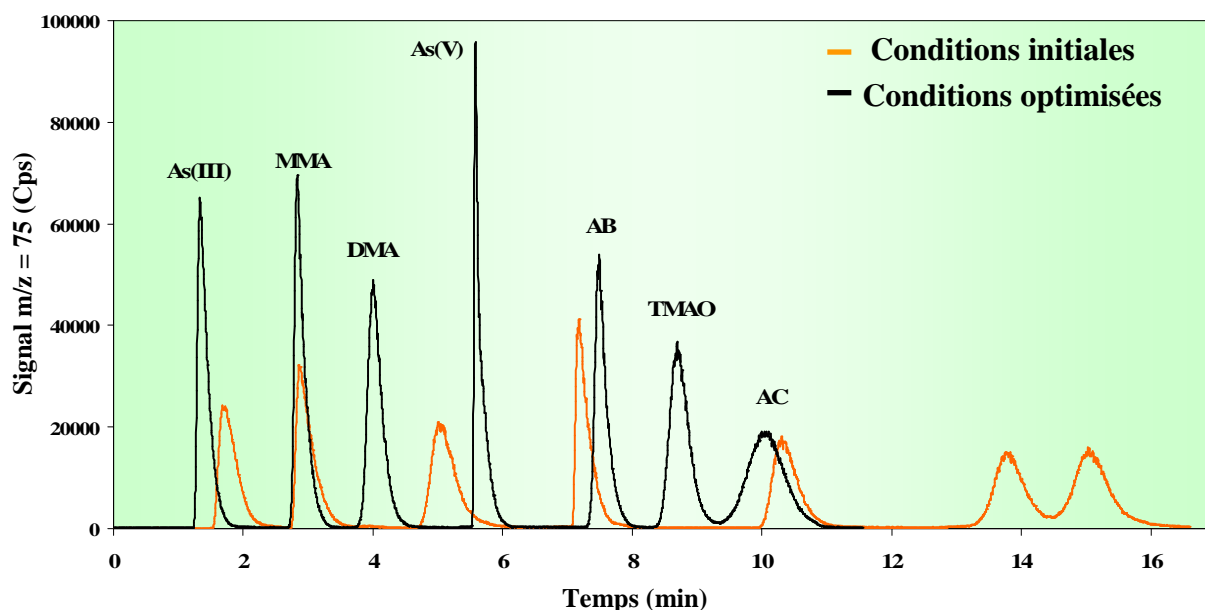
**Tableau XI :** Conditions chromatographiques optimales (7 espèces)

<b>Colonne chromatographique</b>	Ionpac AG7 + Ionpac AS7 (Dionex)
<b>Débit de la phase mobile</b>	1,35 mL min <sup>-1</sup>
<b>Puissance du plasma</b>	1450 W
<b>Température de la colonne</b>	20 °C
<b>Phase mobile A</b>	0,5 mM $\text{HNO}_3$ + 1 % MeOH
<b>Phase mobile B</b>	50 mM $\text{HNO}_3$ + 1 % MeOH
<b>Programme du gradient</b>	Stabilisation avant injection : 100 % PMA (4 min) 100 % PMA (2,5min) ↓ 10 % PMA (3 min) ↓ 80 % PMA (5 min)

Dans ces conditions, les 7 espèces arséniées (Figure 12) sont séparées, de façon satisfaisante (résolutions comprises entre 1,1 et 2,5), avec des sensibilités améliorées par rapport aux conditions initiales, et ce en moins de 15 minutes (incluant 4 minutes de stabilisation de la colonne entre deux analyses), c'est-à-dire, plus rapidement que les travaux rapportés précédemment utilisant la même colonne chromatographique. (Londesborough *et al.*, 1999 ; Mattusch et Wennrich, 1998 ; Kohlmeyer *et al.*, 2002, 2003 et 2005 ; Schmidt *et al.*, 2000 ; Simon *et al.*, 2004 ; Daus *et al.*, 2005)



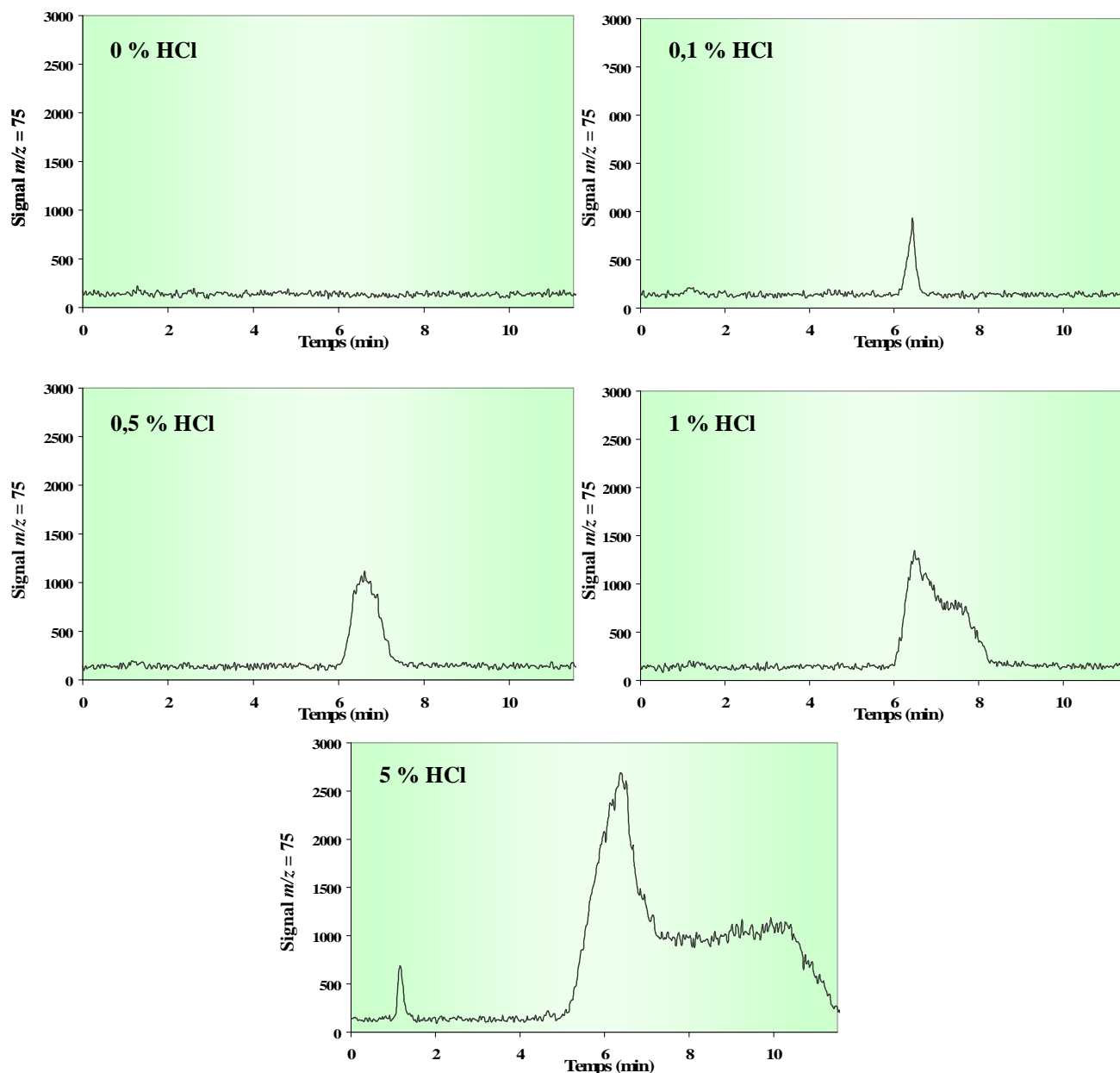
Ces conditions optimisées par les plans d'expériences ont donc permis une nette amélioration des résolutions et des sensibilités des 7 espèces As tout en réduisant le temps d'analyse.



**Figure 12 :** Chromatogrammes observés dans les conditions initiales et optimales pour une solution étalon des 7 espèces As à  $20 \mu\text{g As L}^{-1}$

#### II. 6. 4. Influence de l'interférence $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ sur la séparation

Comme décrit en II. 2. 2. b, le rapport masse sur charge  $m/z = 75$  peut être interféré par les ions poly-atomiques  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  en présence de chlore (Cl) dans le milieu. Il est donc important de s'assurer que les molécules de chlore éventuellement présentes dans les matrices à analyser (produits de la pêche) ne perturbent pas la séparation des différentes espèces As dans les conditions optimales. La figure 13 présente les chromatogrammes observés à  $m/z = 75$  pour des solutions à 0; 0,1; 0,5; 1 et 5 % HCl (Suprapur, 30 %, Merck) dans les conditions optimales de séparation.



**Figure 13 :** Chromatogramme observé dans les conditions optimales pour les solutions à 0; 0,1; 0,5; 1; 5 % HCl à  $m/z = 75$

Dès 0,1 % de Cl dans le milieu, un léger pic apparaît au niveau du temps de rétention de AB dû à l'interférence  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ . D'autre part, ce pic est proportionnel à la quantité de HCl présent dans la solution. Pour 5 % de HCl, l'aspect du chromatogramme est modifié avec l'apparition d'un nouveau pic au temps mort et la déformation de la ligne de base après le deuxième pic. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par le pH de la solution (très faible à cette concentration) qui doit perturber fortement le comportement de la colonne chromatographique.

Compte tenu que AB est l'espèce majoritairement présente dans les matrices susceptibles d'être analysées dans cette étude (produits de la pêche), le pic correspondant à l'interférence  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  ne semble pas perturber de manière significative sa quantification (hauteur du pic inférieure à 1500 cps pour 1 % de HCl). Néanmoins, il pourrait s'avérer intéressant à l'avenir d'optimiser les conditions du mode CCT (cf. II. 2. 2. b.) de l'ICP-MS afin de réduire l'effet de l'interférence  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  sur la ligne de base des chromatogrammes dans certaines matrices chargées en Cl.

## II. 6. 5. Optimisation des conditions pour la séparation de 9 composés arséniés

L'optimisation des conditions de séparation de 9 composés arséniés (i.e. les 7 composés étudiés précédemment et 2 anti-coccidiens susceptibles d'être retrouvés dans les volailles d'importation : ROX et p-ASA) a également été réalisée à l'aide d'un autre plan d'expériences basé sur celui décrit en II. 4. 3. (plan factoriel  $2^{7-4}$ ). Les influences des 7 mêmes paramètres ont été étudiés sur les 11 réponses sélectionnées suivantes : les résolutions chromatographiques entre chaque pic voisin ( $R'_1$  à  $R'_8$ ), le temps de séparation total (T) et la hauteur des pics des 2 espèces inorganiques les plus toxiques, As(III) et As(V), ( $S'_1$  et  $S'_2$ ). L'ensemble des résultats est présenté en annexe 1. Le récapitulatif des facteurs et interactions considérés comme significativement influents sont présentés dans le tableau XII.

**Tableau XII** : Récapitulatif des facteurs et interactions influentes (9 espèces)

Réponses	Facteurs influents	Interactions influentes
( $R'_1$ ) Résolution As(III)/MA	(1) Pourcentage PMA	
( $R'_2$ ) Résolution MA/DMA	(1) Pourcentage PMA	
( $R'_3$ ) Résolution DMA/As(V)	(1) Pourcentage PMA	
( $R'_4$ ) Résolution As(V)/ROX		
( $R'_5$ ) Résolution ROX/AB	(1) Pourcentage PMA (6) Température de la colonne	
( $R'_6$ ) Résolution AB/p-ASA	(6) Température de la colonne	
( $R'_7$ ) Résolution p-ASA/TMAO		Impossible d'attribuer les contrastes à une interaction spécifique
( $R'_8$ ) Résolution TMAO/AC	(1) Pourcentage PMA (2) Durée gradient (3) Concentration BDSA	
(T') Temps d'analyse	(1) Pourcentage PMA (2) Durée gradient (5) Débit de PM	(12) Pourcentage PMA / Durée gradient
( $S'_1$ ) Sensibilité As(III)	(4) Concentration MeOH (7) Puissance plasma	(47) Concentration MeOH / Puissance
( $S'_2$ ) Sensibilité As(V)	(4) Concentration MeOH (7) Puissance plasma	(47) Concentration MeOH / Puissance

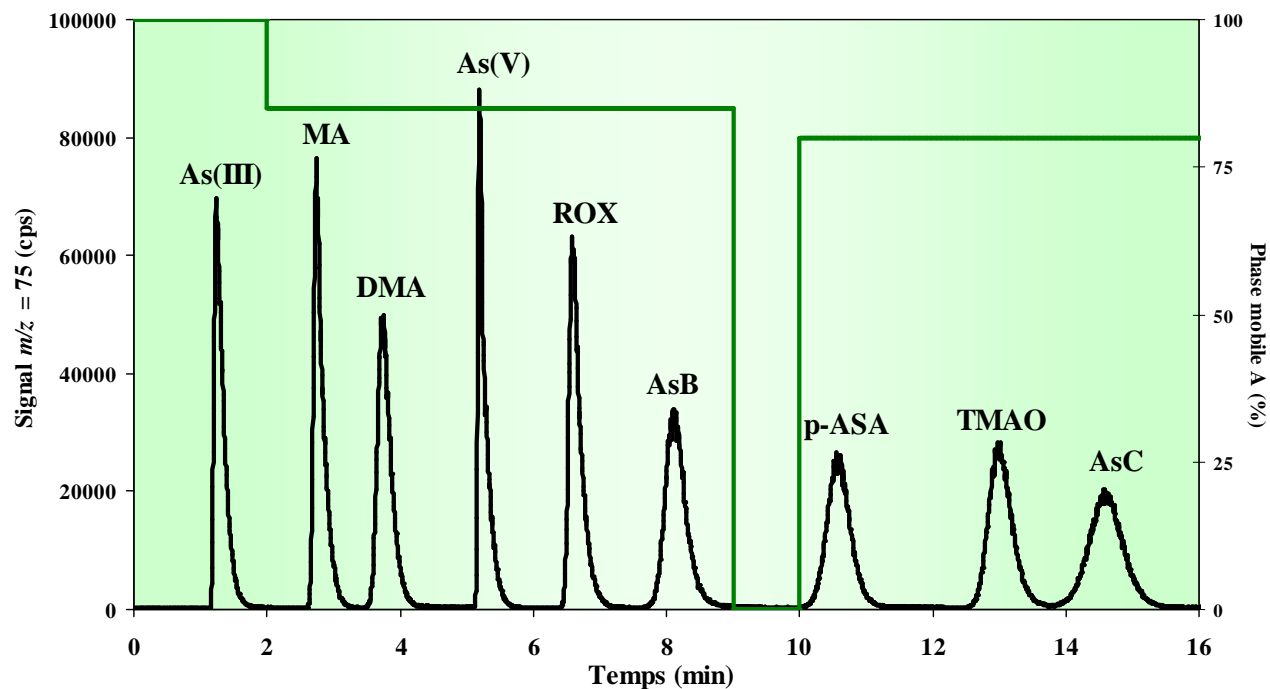
Comme rapporté en II. 6. 1. a, la concentration en acide nitrique dans les phases mobiles est le paramètre le plus influent sur les résolutions ( $R'_1$ ,  $R'_2$ ,  $R'_3$ ,  $R'_5$  et  $R'_8$ ). La température de la colonne (6) a aussi une influence sur les résolutions  $R'_5$  et  $R'_6$ . Les 2 composés anti-coccidiens semblent donc être plus sensibles aux variations de température que les autres composés. Notons que la concentration en BDSA (3) a une influence sur  $R'_8$ . Plusieurs contrastes apparaissent comme significatifs pour  $R'_7$  mais les hypothèses initiales ne permettent pas d'attribuer à chacun une interaction spécifique.

Trois facteurs (la concentration en  $\text{HNO}_3$  (1), la durée du programme gradient (2) et le débit de la phase mobile (3)) et l'interaction entre la concentration en  $\text{HNO}_3$  et la durée du programme gradient (12) ont une influence significative sur le temps d'analyse ( $T'$ ). Enfin, comme précédemment (cf. II. 6. 1. c), les sensibilités des espèces inorganiques ( $S'_1$  et  $S'_2$ ) dépendent principalement de la concentration en MeOH (4), de la puissance du plasma (7) et de l'interaction entre ces deux paramètres (47). Par la suite, ces données ont été utilisées pour établir les conditions analytiques optimales comme décrit en II. 6. 3.. Ces conditions optimales sont présentées dans le Tableau XIII.

**Tableau XIII :** Conditions chromatographiques optimales (9 espèces)

<b>Colonne chromatographique</b>	Ionpac AG7 + Ionpac AS7 (Dionex)
<b>Débit de la phase mobile</b>	1,35 mL min <sup>-1</sup>
<b>Puissance du plasma</b>	1450 W
<b>Température de la colonne</b>	20 °C
<b>Phase mobile A</b>	0,5 mM $\text{HNO}_3$ + 1 % MeOH
<b>Phase mobile B</b>	50 mM $\text{HNO}_3$ + 1 % MeOH
<b>Programme du gradient</b>	Stabilisation avant injection : 100 % PMA (4 min)
	100 % PMA (2 min)
	↓
	85 % PMA (7 min)
	↓
	0 % PMA (1 min)
	↓
	80 % PMA (6 min)

Dans ces conditions, les 9 espèces arséniées (Figure 14) sont séparées, de façon satisfaisante (résolutions comprises entre 0,63 et 1,36), en moins de 16 minutes.



**Figure 14 :** Chromatogramme observé dans les conditions optimales pour une solution étalon des 9 espèces As à  $20 \mu\text{g As L}^{-1}$

## CONCLUSIONS DE LA PARTIE II

Suite à la synthèse bibliographique, le couplage entre la séparation par chromatographie à échange d'ions (IEC) et la détection par ICP-MS est apparu comme le plus pertinent pour la séparation et la quantification des espèces As dans les produits de la pêche.

Le choix de la colonne chromatographique s'est porté sur une colonne à échange d'anions (Ionpac AS7) en raison de ses capacités de séparation simultanée des espèces inorganiques et organiques, en un temps relativement court. De plus, la phase mobile couramment utilisée avec cette colonne ( $\text{HNO}_3$ ) apparaît comme l'une des plus compatibles avec l'utilisation d'un système ICP-MS.

Enfin, l'optimisation des conditions de séparation chromatographique par la méthode des plans d'expériences a permis en un minimum d'essais planifiés :

- L'évaluation de l'influence de différents facteurs et de leurs interactions sur la séparation de 7 (ou 9) composés arséniés.
- La détermination des conditions analytiques optimales pour la séparation de 7 (ou 9) espèces As tout en diminuant de manière significative le temps d'analyse, en conservant des résolutions satisfaisantes et en améliorant les sensibilités pour l'ensemble des espèces.

## **PARTIE III.**

### **MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DIGESTION DOUCE : MINÉRALISATION ASSISTÉE PAR MICRO-ONDES**

### **III. 1. Introduction**

Cette partie est consacrée au développement d'une méthode pour la mise en solution des différentes espèces arséniées dans les produits de la pêche par extraction assistée par micro-ondes (MAE) à partir d'un article soumis en novembre 2008 à « *Analytica Chimica Acta* » (Article III, Annexe 4). Après avoir justifié le choix de la méthode d'extraction retenue en détaillant les différentes méthodes rapportées dans la littérature, nous présenterons l'optimisation des paramètres analytiques pour la mise en solution douce des composés arséniés d'intérêt dans les produits de la pêche. Puis, nous exposerons l'évaluation des différents critères analytiques lors de la validation de la méthode. Enfin, nous découvrirons les premières applications de cette méthode réalisées sur des eaux minérales et sur un matériau de foie d'aiguillat analysé lors d'une participation à une certification organisé par le NRC (Canada).

### **III. 2. Extraction des composés arséniés : état de l'art**

En amont de la séparation et de la détection des espèces arséniées examinées dans la partie II, une étape d'extraction pour la spéciation de matrices biologiques est cruciale. En effet, il est primordial de mettre au point une méthode de digestion douce n'impliquant pas de modifications ou de pertes des espèces initialement présentes dans l'échantillon. (Gong *et al.*, 2002)

Différentes méthodes d'extraction ont été envisagées dans la littérature pour la mise en solution des espèces arséniées provenant de matrices biologiques. Le tableau XIV présente l'ensemble de ces études publiées depuis 1998 en distinguant principalement 4 méthodes (extraction solide-liquide (Liq/Sol) avec ou sans sonification (ou Ultra-sonification), extraction enzymatique, extraction assistée par micro-ondes (MAE) et autres méthodes alternatives) et en détaillant les réactifs utilisés et les matrices étudiées.



Tableau XIV : Récapitulatif des méthodes d'extraction dans la littérature

Technique	Solvant (Composition, volume)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Références
Liq/Sol	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (9/1)	100	DORM 1 <sup>a</sup> , DORM 2 <sup>a</sup>	Goessler <i>et al.</i> (1998)
Liq/Sol	10 mL H <sub>2</sub> O	200	DORM 2 <sup>a</sup>	Mattusch et Wennrich (1998)
Liq/Sol	MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	500-5000	Fucus, SRM 1566a <sup>b</sup>	Lai <i>et al.</i> (1998)
Liq/Sol	5 mL H <sub>2</sub> O	200-500	DORM 2 <sup>a</sup> , Champignons	Londesborough <i>et al.</i> (1999)
Liq/Sol	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (2/1/4)	500	Requins	Hanaoka <i>et al.</i> (1999)
Liq/Sol	10 mL H <sub>2</sub> O	3000	Haricots	Van den Broeck <i>et al.</i> (1999)
Liq/Sol	H <sub>2</sub> O ou MeOH/H <sub>2</sub> O ou MeOH/H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> Cl ou HCl/HCl/CH <sub>3</sub> Cl	500	DORM 1 <sup>a</sup> , DORM 2 <sup>a</sup> CRM 278 <sup>c</sup> , SRM 166a <sup>b</sup> , TORT 2 <sup>d</sup>	Munoz <i>et al.</i> (1999)
Liq/Sol	3,5 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	1000	DORM 2 <sup>a</sup>	Lindemann <i>et al.</i> (2000)
Liq/Sol	H <sub>2</sub> O/MeOH	500	Algues	Wangkarn <i>et al.</i> (2000)
Liq/Sol	30 mL H <sub>2</sub> O ou 30 mL MeOH/ H <sub>2</sub> O (1/1)	1000-5000	Plantes	Schmidt <i>et al.</i> (2000)
Liq/Sol	H <sub>2</sub> O	-	Plantes	Mattusch <i>et al.</i> (2000)
Liq/Sol	150 mL MeOH ou 150 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	1000-5000	Huître; coques, Moules, algue, BCR 627 <sup>c</sup> , TORT-1 <sup>d</sup>	Gomez-Ariza <i>et al.</i> (2000)
Liq/Sol	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (9/1)	200	DORM 2 <sup>a</sup>	Falk et Emons (2000)
Liq/Sol	H <sub>2</sub> O/CHCl <sub>3</sub>	-	Méduses	Hanaoka <i>et al.</i> (2001b)
Liq/Sol	10 mL H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1,5 M) ou 10 mL H <sub>2</sub> O ou 10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (9/1)	100-500	DORM 2 <sup>a</sup> , Algues	Kuehnelt <i>et al.</i> (2001)
Liq/Sol	4 mL MeOH	2100	Algues	Madsen <i>et al.</i> (2000)
Liq/Sol	6 mL H <sub>2</sub> O/MeOH (1/1)	100-200	Algues	Van Hulle <i>et al.</i> (2002)
Liq/Sol	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (3/1) + 10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	200	DORM 2 <sup>a</sup> , BCR 477 <sup>c</sup> , huître, algues	Kohlmeyer <i>et al.</i> (2002)
Liq/Sol	20 mL MeOH/ CHCl <sub>3</sub> (1/1)	500	DORM 1 <sup>a</sup> , DORM 2 <sup>a</sup> , saumon, poissons, requins	Wrobel <i>et al.</i> (2002)
Liq/Sol	MeOH/H <sub>2</sub> O (9/1)	100	phoques	Ebisuda <i>et al.</i> (2002)
Liq/Sol	MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	300	Algues	Lai <i>et al.</i> (2002)
Liq/Sol	10 mL (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O	200-250	AGAL-2 <sup>f</sup> , DOLT-1 <sup>g</sup> , DORM-2 <sup>a</sup> , TORT-2 <sup>d</sup> , CRM 278 R <sup>e</sup> , SRM 1566a <sup>b</sup>	Kirby et Maher (2002)
Liq/Sol	MeOH/H <sub>2</sub> O (9/1)	100	Foies d'animaux marins, DORM 2 <sup>a</sup>	Kubota <i>et al.</i> (2002)
Liq/Sol	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (8/2)	100-500	Plantes	Tlustos <i>et al.</i> (2002)
Liq/Sol	1 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)		Vers de terre	Langdon <i>et al.</i> (2002)
Liq/Sol	10 mL (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O	200-300	Poissons	Kirby <i>et al.</i> (2002)
Liq/Sol	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1)	200-300	Poissons	Hanaoka <i>et al.</i> (2001c)
Liq/Sol	25 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (9/1)	500	Plantes	Zheng <i>et al.</i> (2003)
Liq/Sol	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	1000	Poulet, riz, poisson, NIST 1568a <sup>h</sup> , DORM 2 <sup>a</sup>	Pizarro <i>et al.</i> (2003 a,b)
Liq/Sol	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	250	DORM 2 <sup>a</sup> , BCR 627 <sup>c</sup>	Sloth <i>et al.</i> (2003)
Liq/Sol	MeOH/H <sub>2</sub> O (3/1)	500	Produits de la pêche	Kohlmeyer <i>et al.</i> (2003)
Liq/Sol	10 mL MeOH	200	Moules, DOLT 2 <sup>g</sup>	Soeroes <i>et al.</i> (2005)
Liq/Sol	10 mL H <sub>2</sub> O	1000	Volaille	Jackson <i>et al.</i> (2003)
Liq/Sol	10 mL MeOH	500	Produits de la pêche, DORM 2 <sup>a</sup>	Simon <i>et al.</i> (2004)
Liq/Sol	5 mL H <sub>2</sub> O	100	Algues	Schmeisser <i>et al.</i> (2005)
Liq/Sol	10 ml H <sub>2</sub> O	500	Plantes	Daus <i>et al.</i> (2005)
Liq/Sol	10 mL H <sub>2</sub> O ou MeOH/H <sub>2</sub> O (1/9) ou (1/1)	100	Plantes	Ruiz-Chancho <i>et al.</i> (2008)
Sonification	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	10000	Thon, moules	Le <i>et al.</i> (1998)
Sonification	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	500	Poissons, DORM 2 <sup>a</sup>	McKiernan <i>et al.</i> (1999)
Sonification	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	1000	Algues	Feldmann <i>et al.</i> (2000)
Sonification	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1) + 10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (9/1)	1000	Algues	McSheehy et Szpunar (2000)
Sonification	1 mL H <sub>2</sub> O/MeOH (1/1)	100	Algues	Raber <i>et al.</i> (2000)

a aiguillat, b huître, c thon, d hépatopancreas de homard, e moule, f requin, g foie d'aiguillat, h riz

Tableau XIV (suite)

Technique	Solvant (Composition, volume)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Références
Sonification	5 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	250-500	Mollusques	Lai <i>et al.</i> (2001)
Sonification	5 ou 15 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	200-250	Algues, Huîtres	McSheehy <i>et al.</i> (2001 a,b)
Sonification	5 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	50-100	Éponge marine	Yamaoka <i>et al.</i> (2001)
Sonification	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	500	Riz, SRM 1568a <sup>h</sup>	Heitkemper <i>et al.</i> (2001)
Sonification	10-20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	500-1000	Pommes	Caruso <i>et al.</i> (2001)
Sonification	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	1000	DORM 2 <sup>a</sup> , TORT 2 <sup>d</sup> , CRM 627 <sup>c</sup>	Suner <i>et al.</i> (2001)
Sonification	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	1000	Algues	McSheehy <i>et al.</i> (2002)
Sonification	5-10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	500-1000	NIST 1566a <sup>b</sup> , poissons	Devesa <i>et al.</i> (2002)
Sonification	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	1000	Pommes	B'Hymer et Caruso (2002)
Sonification	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	500-5000	Produits de la pêche	Li <i>et al.</i> (2003)
Sonification	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	2000	Nourriture	Milstein <i>et al.</i> (2003)
Sonification	12 mL CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1) + 8 mL H <sub>2</sub> O + 1 mL H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (25 mM)	2000	Noix, algues	Kannamkumarath <i>et al.</i> (2004)
Sonification	MeOH/H <sub>2</sub> O	(1/10 w/v)	Poissons d'eau douce	Zheng <i>et al.</i> (2004)
Sonification	10 mL MeOH/ H <sub>2</sub> O (1/1)	100	Algues, DORM 2 <sup>a</sup>	Karthikeyan (2004)
Sonification	10 mL H <sub>2</sub> O ou 10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	100	Algues	Karthikeyan <i>et al.</i> (2003)
Sonification	10 mL H <sub>2</sub> O	100	Algues	Hirata et Toshimitsu (2005)
Sonification	5 mL H <sub>2</sub> O	200-2000	TORT 2 <sup>d</sup>	Kahn <i>et al.</i> (2005)
Sonification	7 mL H <sub>2</sub> O	200	algues, plantes, éponge, moules, grenouilles, poissons	Schaeffer <i>et al.</i> (2006)
Sonification	5 ml H <sub>2</sub> O	100	Poissons, CRM 627 <sup>c</sup>	Sanz <i>et al.</i> (2005a)
Sonification	4 mL CHCl <sub>3</sub>	200	Produits de la pêche, TORT 2 <sup>d</sup>	Cao <i>et al.</i> (2008)
Enzymatique + Sonification	Enz : 30 mg α-amylase + 10 mL (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Son : 20 mL C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N/H <sub>2</sub> O (2/3)	500-1000	Pommes	Caruso <i>et al.</i> (2001)
Enzymatique	100 mg trypsine + 5 mL NaHCO <sub>3</sub> (0,1 M)	500	nourritures pour bébé	Pardo-Martinez <i>et al.</i> (2001)
Enzymatique	0,1 g α-amylase + 10 mL NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> + 10 mL MeOH	500	Riz, SRM 1568a <sup>h</sup>	Heitkemper <i>et al.</i> (2001)
Enzymatique	0,1 g trypsine + 10 mL NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	250	Huîtres, TORT-2 <sup>d</sup>	Fitzpatrick <i>et al.</i> (2002)
Enzymatique + Sonification	Enz : 30 mg α-amylase + 10 mL (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Son : 8 mL C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N + 2 mL H <sub>2</sub> O	500	Pommes	B'Hymer et Caruso (2002)
Enzymatique	20 mL H <sub>2</sub> O + 60-80 mg α-amylase	500	Riz	Kohlmeyer <i>et al.</i> (2003)
Enzymatique	0,1 trypsine + 10 mL NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	250	DORM 1 <sup>a</sup> , TORT 1 <sup>d</sup> , Crustacées	Rattanachongkiat <i>et al.</i> (2004)
Enzymatique	0,1 g trypsine + 10 mL NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	10000	Pieuvres	Seixas <i>et al.</i> (2005)
Enzymatique	3 ml H <sub>2</sub> O + 10 mg α-amylase + 30 mg protéase ou 3 mL H <sub>2</sub> O + 15 mg protéase	150-300	Riz, SRM 1568a <sup>h</sup> , Poulet	Sanz <i>et al.</i> (2005 a,b)
TFA extraction	3 mL TFA (2 M)	250-120	Riz, SRM 1568a <sup>h</sup>	Heitkemper <i>et al.</i> (2001)
TFA extraction	2 mL TFA (2 M)	250	Riz	Williams <i>et al.</i> (2005)
ASE	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	500	Poissons, DORM 2 <sup>a</sup>	McKiernan <i>et al.</i> (1999)
ASE	MeOH/H <sub>2</sub> O (3/1; 1/1; 0/1)	500-2000	Riz, SRM 1568a <sup>h</sup>	Heitkemper <i>et al.</i> (2001)
ASE	-	1000	Carottes	Vela <i>et al.</i> (2001)
ASE	MeOH/H <sub>2</sub> O (3/7)	500	Algue, DORM 2 <sup>a</sup>	Gallagher <i>et al.</i> (2001 et 2002)
ASE	MeOH/acide acétique (1/1)	250-270	DORM 2 <sup>a</sup> , DOLT-2 <sup>g</sup> , TORT-2 <sup>d</sup>	Wahlen <i>et al.</i> (2004)
ASE	H <sub>2</sub> O ou MeOH/ H <sub>2</sub> O (1/1)	100	Plantes, BCR 402 <sup>i</sup> , BCR 279 <sup>j</sup>	Schmidt <i>et al.</i> (2000)
ASE	MeOH/ H <sub>2</sub> O (3/1)	100	GBW-08751 <sup>e</sup> , BCR-278R <sup>e</sup> , DORM 2 <sup>a</sup>	Mato Fernandez (2007)

a aiguillat, b huître, c thon, d hépatopancreas de homard, e moule, f requin, g foie d'aiguillat, h riz, i trèfle blanc, j algues

Tableau XIV (suite)

Technique	Solvant (Composition, volume)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Références
MAE	5 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/9)	100	Champignons	Larsen <i>et al.</i> (1998)
MAE	20 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/4-4/1)	500	Moules	Dagnac <i>et al.</i> (1998)
MAE	9,84 g H <sub>2</sub> O	655	BCR 627 <sup>c</sup>	Nakazato <i>et al.</i> (2000)
MAE	MeOH or MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	1000-5000	Huître; coques, Moules, algue, BCR 627 <sup>c</sup> , TORT 1 <sup>d</sup>	Gomez-Ariza <i>et al.</i> (2000)
MAE	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (8/2)	150	TORT 2 <sup>d</sup>	Brisbin et Caruso (2002)
MAE	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (8/2)	150	TORT 2 <sup>d</sup>	Brisbin et al (2002)
MAE	10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	100-150	AGAL-2 <sup>k</sup> , DOLT-1 <sup>g</sup> , DORM-2 <sup>a</sup> , TORT-2 <sup>d</sup> , CRM 278 R <sup>e</sup> , SRM 1566a <sup>b</sup>	Kirby et Maher (2002)
MAE	10 mL MeOH/ H <sub>2</sub> O (1/1)	70-100	Algues	Tukai <i>et al.</i> (2002)
MAE	10 mL TMAH ou 10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1) ou (8/2)	100-130	DORM 2 <sup>a</sup> , poissons	Ackley <i>et al.</i> (1999)
MAE	TMAH ou protéines modifiées	150	Plantes	Quaghebeur <i>et al.</i> (2003)
MAE	10 mL H <sub>2</sub> O	100	TORT 2 <sup>d</sup> , DORM 2 <sup>a</sup> , crevettes, huître, poissons	Karthikeyan et Iyer (2004)
MAE	10 mL MeOH/ H <sub>2</sub> O (1/1)	100	DORM 2 <sup>a</sup> , crevettes, huître, poissons	Karthikeyan (2004)
MAE	10 mL H <sub>2</sub> O ou 10 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)		Crevettes	Karthikeyan <i>et al.</i> (2003)
MAE	10 mL H <sub>2</sub> O	100	DORM 2 <sup>a</sup> , Huîtres, poissons, crevettes, coquillages	Hirata <i>et al.</i> (2005,2006)
MAE	10 mL alcool alcalin	1000	Poissons, TORT 2 <sup>a</sup>	Larsen <i>et al.</i> (2005)
MAE	10 mL alcool alcalin	1000	Poissons, TORT 2 <sup>a</sup> , DORM 2 <sup>a</sup>	Sloth <i>et al.</i> (2005)
MAE	5 mL HNO <sub>3</sub> (2%) ou 10 mL H <sub>2</sub> O/MeOH (1/1)	100	DORM 2 <sup>a</sup> , TORT 2 <sup>a</sup> , CRM 279 <sup>j</sup>	Foster <i>et al.</i> (2007)
MAE	5 mL H <sub>2</sub> O/MeOH (2/8)	200	DORM 2 <sup>a</sup> , poissons	Wang <i>et al.</i> (2007)
MAE	Protéines modifiées	150	Plantes	Chen <i>et al.</i> (2007)
MAE	10 mL H <sub>2</sub> O	1000	Riz, SRM 1568a <sup>h</sup>	Narukawa <i>et al.</i> (2008)

a aiguillat, b huître, c thon, d hépatopancreas de homard, e moule, f requin, g foie d'aiguillat, h riz, i trèfle blanc, j algues, k requin

### III. 2. 1. Méthode par extraction liquide-solide « classique » avec ou sans sonification

Un grand nombre des travaux effectués depuis 1998 utilisent la méthode d'extraction « classique » liquide-solide (Liq-Sol) assistée d'une agitation physique ou par ultra-sons (sonification). Toutefois, les taux de récupération en As total pour différentes compositions de solvants (H<sub>2</sub>O, MeOH, mélange H<sub>2</sub>O/MeOH) observés après sonification dans le TORT 2 semblent similaires à ceux obtenus après une agitation physique. (Brisbin *et al.*, 2002)

La majorité de ces travaux opte pour un solvant composé d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH ou H<sub>2</sub>O seul pour extraire les différents composés arséniés. L'utilisation de MeOH seul, (Gomez-Ariza *et al.*, 2000 ; Madsen *et al.*, 2000 ; Soeroes *et al.*, 2005) d'acétone ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O), (Kirby et Maher, 2002 ; Kirby *et al.*, 2002) d'acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (Kuehnelt *et al.*, 2001 ; Kannamkumarath *et al.*, 2004) ou de mélanges H<sub>2</sub>O/MeOH/CH<sub>3</sub>Cl (Hanaoka *et al.*, 1999 et 2001b,c ; Wrobel *et al.*, 2002 ; Kannamkumarath *et al.*, 2004) a aussi été rapportée occasionnellement.

Même si ce type de méthodes a montré sa relative efficacité pour l'extraction d'espèces arséniées de matrices biologiques, elles restent longues à mettre en œuvre et peuvent demander une importante consommation de solvants organiques. (Brisbin et Caruso, 2002) De plus, Amran *et al.* (1997) a montré que ces méthodes pouvaient être moins efficaces pour certaines matrices telles que les bivalves. Enfin, Munoz *et al.* (1999) explique que les faibles taux de récupération obtenus dans son étude après extraction avec différents solvants (H<sub>2</sub>O, MeOH, CH<sub>3</sub>Cl) sans chauffage pour As (III) dans des produits de la pêche sont dus à l'incapacité des solvants utilisés à casser les liaisons entre cette espèce et les groupes thiols au sein des protéines.

### III. 2. 2. L'extraction enzymatique

L'utilisation de l'extraction enzymatique a parfois été évoquée dans la littérature comme une alternative à l'extraction Liq-Sol. Celle-ci consiste à traiter les échantillons biologiques avec une enzyme afin de favoriser la mise en solution des espèces arséniées. Ainsi, plusieurs travaux, notamment sur des échantillons de pommes ou de riz traités avec l'enzyme  $\alpha$ -amylase, ont permis une amélioration des taux de récupération obtenus par extraction Liq-Sol. (Caruso *et al.*, 2001 ; Heitkemper *et al.*, 2001 ; B'Hymer et Caruso, 2002 ; Kohlmeyer *et al.*, 2003 ; Sanz *et al.*, 2005ab) Néanmoins, l'utilisation de l'enzyme  $\alpha$ -amylase est spécifique aux matrices végétales (fruits, riz) et n'a donc pas été testée dans les produits de la pêche. En revanche, quelques études rapportent l'utilisation de la trypsine pour l'extraction enzymatique de l'As dans les produits de la pêche. (Pardo-Martinez *et al.*, 2001 ; Fitzpatrick *et al.*, 2002 ; Rattanachongkiat *et al.*, 2004) Les travaux de Pardo-Martinez *et al.* (2001) et Fitzpatrick *et al.* (2002) ont rapporté des taux de récupération en As total satisfaisants après un traitement à la trypsine de DORM 2 (106 %) et TORT 2 (105 %), respectivement. Pardo-Martinez *et al.* (2001) a aussi observé des extractions d'As total satisfaisantes (88-122 %) pour plusieurs aliments pour bébé (produits de la pêche). Cependant, ces études se sont focalisées sur la détermination de AB et DMA et n'ont pas conclu quant à l'efficacité de la méthode d'extraction sur les autres espèces arséniées. Des taux de récupération acceptables après traitement avec de la trypsine, dans DORM 1 (96 %), TORT 1 (108 %) et divers autres produits de la pêche (82-102 %) ont aussi été observés par Rattamachangkiat *et al.* (2004).

Néanmoins, même si le traitement avec de la trypsine des produits de la pêche semble améliorer l'extraction de l'As, le temps d'extraction très élevé nécessaire à cette méthode (de 8 à 12 heures) reste un inconvénient majeur dans l'optique d'une méthode de spéciation de routine.

### III. 2. 3. Techniques d'extraction alternatives

#### *III. 2. 3. a. Extraction accélérée par solvant (ASE)*

D'autres techniques d'extraction des composés arséniés, bien que moins répandues, ont été rapportées dans la littérature. L'extraction accélérée par solvant (« Accelerated solvent extraction » ou ASE), appelée aussi parfois extraction liquide pressurisée (« Pressurized liquid extraction » ou PLE) a été testée à plusieurs reprises pour l'extraction de l'As dans les produits de la pêche. (Mc Kiernan *et al.*, 1999 ; Wahlen *et al.*, 2004 ; Mato-Fernandez *et al.*, 2007) Les travaux de McKiernan *et al.* (1999) ont rapporté des taux de récupération de l'As total satisfaisants par la procédure ASE dans le DORM 2 et un échantillon de poisson (92 et 99 % respectivement) alors que les résultats dans des échantillons de requin, saumon et thon (82, 77 et 74 %, respectivement) étaient inférieurs à ceux obtenus par une extraction Liq/Sol classique (90, 91 et 86 % respectivement). L'étude réalisée par Walhen *et al.* (2004) a montré que l'utilisation de l'ASE permettait d'obtenir un taux de récupération de l'As total satisfaisant pour DORM 2 (96 %) mais faible pour DOLT 2 et TORT 2 (41 et 75 %, respectivement). De plus, cette étude n'a pas permis de conclure sur l'efficacité d'extraction par la méthode ASE de l'ensemble des espèces As présentes dans la mesure où seules les teneurs en DMA et AB ont été quantifiées. Récemment, les travaux de Mato-Fernandez *et al.* (2007) ont permis d'obtenir des taux de récupération d'As total satisfaisants sur 3 MRC : GBW-08751, BCR-278R et DORM-2 (93, 96 et 95 %, respectivement). Cependant, les formes arséniées As(III), As(V), MA et DMA seraient retenues (de 10 à 90 % dans certains cas) par certains réactifs utilisés comme milieux de dispersion nécessaires à cette méthode. (Gallagher *et al.*, 2002) Enfin, d'après Francesconi *et al.* (2004), la méthode ASE présente peu d'avantages par rapport aux extractions classiques et nécessite un appareillage spécifique et ne semble donc pas adaptée à une méthode de spéciation de routine.

### III. 2. 3. b. Traitement par l'acide trifluoroacétique (TFA)

Le traitement par l'acide trifluoroacétique (TFA) consiste à chauffer (avec un bloc chauffant) pendant 6 heures à environ 100 °C l'échantillon dans une solution de TFA. Cette technique a été testée pour l'extraction de l'As dans le riz. (Heitkemper *et al.*, 2001 ; Williams *et al.*, 2005) Heitkemper *et al.* (2001) a rapporté une comparaison entre les méthodes d'extraction enzymatique, ASE et de traitement par TFA pour l'extraction des espèces As dans le riz. D'après cette étude, la méthode de traitement par TFA permettrait d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction en As total. Néanmoins, un des principaux inconvénients de cette méthode reste son temps d'extraction très important (environ 6 h). D'autre part, ce type de méthode n'a jamais été testé dans les produits de la pêche.

### III. 2. 4. Extraction assistée par micro-ondes

Depuis quelques années, l'utilisation de l'extraction assistée par micro-ondes (« microwave-assisted extraction » ou MAE) ne cesse de s'amplifier pour la spéciation de l'arsenic dans des matrices biologiques telles que les produits de la pêche, les plantes, le riz ou les champignons. La méthode MAE consiste à utiliser les propriétés de certains composés (solvants caractérisés par une constante diélectrique plus faible que la matrice considérée et relativement transparent aux micro-ondes) capables de transformer l'énergie électromagnétique (captée sous forme de radiation de longueur d'onde entre 1 cm et 1 m) en chaleur. En effet, les molécules dipolaires et les ions vont aligner leur moment dipolaire avec le champ électrique des micro-ondes. Ce champ étant en perpétuel mouvement, les molécules tournent dans tous les sens et provoquent ainsi des collisions avec les molécules voisines. Ces agitations créent un dégagement d'énergie, donc une augmentation de la température et de la pression dans les récipients de digestion. Les composés d'intérêt vont alors être dissous dans le solvant en un minimum de temps. (Paré et Bélanger, 1994 ; Bélanger et Paré, 2006)

Généralement, un solvant composé d'un mélange eau/méthanol ou uniquement d'eau est utilisé. Dans de rares cas, d'autres solvants ont été testés tels que l'hydroxyde de tétraméthylammonium TMAH, (Ackley *et al.*, 2002 ; Quaghebeur *et al.*, 2003) l'alcool alcalin pour l'extraction des espèces inorganiques, (Sloth *et al.*, 2005 ; Larsen *et al.*, 2005) l'acide nitrique (Brisbin et Caruso, 2002 ; Foster *et al.*, 2007) ou des protéines modifiées (Quaghebeur *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2007).

Une température modérée (30-90 °C) et un temps de chauffage limité (2-10 min) sont généralement sélectionnés afin de conserver les liaisons carbone-arsenic des espèces intactes. (B'Hymer et Caruso, 2004) Les travaux de Kirby *et al.* (2002) ont ainsi montré que les taux de récupération pouvaient être améliorés si la température de chauffage était proche de la température d'ébullition du solvant.

Une étude comparative sur plusieurs méthodes d'extraction réalisée sur un matériau de référence certifié d'hépatopancréas de homard (TORT-2), a confirmé que la méthode MAE apparaissait comme la méthode d'extraction la plus simple, rapide et reproductible parmi les méthodes étudiées tout en obtenant des taux de récupération en As total sensiblement identiques, voire meilleurs, aux autres méthodes d'extraction. (Brisbin et Caruso, 2002) Dans le cas de la méthode MAE, plusieurs solvants (eau, mélange eau-méthanol, acide nitrique) et temps d'extraction (2 à 6 minutes) avaient été testés. Une étude complémentaire est venue confirmer que ces conditions étaient également adaptées à la spéciation des différentes espèces arséniées (Brisbin *et al.*, 2002).

Les travaux de Foster *et al.* (2007) ont démontré que l'utilisation de 2 % de HNO<sub>3</sub> comme solvant (ou un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O suivi de 2 % de HNO<sub>3</sub>) permettait une amélioration de l'extraction dans les matrices où l'arsenic est difficile à extraire (plantes et organes digestifs d'organismes marins). Cependant, les taux de récupération observés avec HNO<sub>3</sub> dans les DORM 2 et TORT 2 (102 % pour les 2 MRC) sont similaires à ceux obtenus avec un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH (1/1 v/v) (98 et 88 %, respectivement). De plus, le pH faible dû à l'utilisation d'HNO<sub>3</sub> risque de perturber la séparation chromatographique des composés arséniés (optimisée dans la partie II) dans les échantillons extraits.

Ackley *et al.* (1999) a montré que l'utilisation de TMAH semble permettre une extraction satisfaisante de l'As total (95 %) dans le DORM 2. Cependant, les travaux de Quaghebeur *et al.* (2003) ont démontré que ce réactif provoquait l'oxydation d'As(III) en As(V) durant le processus d'extraction par MAE. Ces mêmes travaux et ceux de Chen *et al.* (2007) ont rapporté des taux de récupération satisfaisants (sans que les formes inorganiques soient modifiées) dans des végétaux en utilisant un mélange de protéines modifiées comme solvant (contenant 0,33 M de sucrose, 50 mM de MES (acide 2-(N-morpho- lino)éthane sulfonique), 5mM d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) et 5mM de L-ascorbate). Mais, à notre connaissance, ce réactif n'a pas été utilisé pour l'extraction des formes arséniées dans les produits de la pêche.

Les études réalisées par Sloth *et al.* (2005) et Larsen *et al.* (2005) rapportent une procédure MAE utilisant un solvant composé d'hydroxyde de sodium dans de l'éthanol pour une extraction spécifique des formes inorganiques dans les produits de la pêche. Cependant, cette méthode ne permet pas une quantification individuelle de chaque forme inorganique dans la mesure où le solvant provoque l'oxydation de l'As(III) en As(V).

La méthode MAE a été aussi testée avec succès (taux de récupération supérieurs à 85 %) pour l'extraction d'espèces d'arsenic d'intérêt dans des échantillons de poissons en utilisant une puissance de 50 à 75 W pendant 5 à 10 minutes avec un mélange eau-méthanol (1/1, v/v). (Ackley *et al.*, 1999) L'étude réalisée par Kirby *et al.* (2002) a permis d'obtenir une extraction d'As total satisfaisante avec le même mélange eau-méthanol (1/1, v/v) pour le DORM-2 (103 %) et le TORT-2 (92 %), mais des taux plus faibles ont été observés pour d'autres échantillons de produits de la pêche (58-80 %). Nakazato *et al.* (2000) rapporte un taux de récupération de 88 % dans un échantillon de thon (CRM-627) en utilisant seulement un solvant aqueux. Les taux de récupération observés par Hirata *et al.* (2006) et Karthikeyan *et al.* (2004) dans des produits de la pêche après extraction avec 100 % d'eau sont compris entre 53-112 et 85-105 % respectivement. Tandis que les valeurs publiées par Karthikeyan (2004) obtenues après extraction dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1 v/v) sont de 48-105 %.

### III. 2. 5. Bilan de l'état de l'art

L'étape de mise en solution des espèces As est fondamentale. La méthode utilisée, tout en étant rapide, pratique et robuste, ne doit pas engendrer de modifications des espèces initialement présentes pour permettre une spéciation quantitative satisfaisante.

L'étude bibliographique des principales techniques d'extraction des espèces arsénées dans les matrices biologiques utilisées au cours de cette décennie laisse envisager que la méthode d'extraction assistée par micro-ondes (MAE) apparaît comme une alternative pertinente en raison de :

- sa rapidité et sa simplicité de mise en œuvre ;
- son absence de perte d'éléments volatils et de contamination par les particules atmosphériques (système fermé) ;
- l'utilisation de volumes de solvant plus faibles impliquant moins de déchets et de risques de contamination.



Ces 3 avantages de la méthode MAE par rapport aux autres techniques d'extraction testées dans la littérature sont des atouts précieux pour de futures applications en analyse de routine.

Un solvant composé soit d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH soit d'H<sub>2</sub>O uniquement est le plus utilisé dans la littérature et semble le plus adapté à la mise en solution des formes arséniées par MAE dans les produits de la pêche. D'autres paramètres tels que la quantité d'échantillons extraits, le volume de solvant, la température et le temps de chauffage par micro-ondes sont également susceptibles de jouer un rôle dans le processus d'extraction. La suite de cette étude s'est donc intéressée à déterminer l'influence de ces différents paramètres de la méthode MAE sur les taux de récupération en arsenic total et en spéciation sur différents échantillons de produits de la pêche.

### III. 3. Conditions expérimentales

Les réactifs et matériels utilisés dans cette étude sont décrits en annexe 4.

#### III. 3. 1. Extraction assistée par micro-ondes

##### *III. 3. 1. a. Instrumentations*

Le système micro-onde fermé utilisé dans cette étude est le système Multiwave fabriqué et commercialisé par la société *Anton Paar* (Courtaboeuf, France). Ce système est équipé d'un rotor à six récipients de digestion en quartz de 50 mL.

Une centrifugeuse Universal 320 fabriquée et commercialisée par la société *Hettich* (Tuttlingen, Germany) a été utilisée pour la séparation du surnageant du résidu après extraction.

##### *III. 3. 1. b. Échantillons et matériaux de référence certifiés*

Les Matériaux de Référence Certifiés (MRC) utilisés dans cette étude, TORT 2 (Hépatopancréas de homard), DORM 2 (muscle d'aiguillat), DOLT 3 (foie d'aiguillat), DORM 3 (protéine de poisson) et CRM 627 (Thon), sont commercialisés par la société *Promochem* (Molsheim, France). Divers produits de la pêche lyophilisés (moules, dorade, bigorneau, maquereau frais et en conserve) ont également été analysés pour l'étude de la répétabilité de la méthode.

### III. 3. 1. c. Préparation des échantillons avant analyse

#### III. 3. 1. c. i. Préparation physique des échantillons

Pendant toutes les étapes de préparation des échantillons pour analyse, les consignes pour éviter une éventuelle contamination ont été respectées. Le matériel utilisé a été nettoyé suivant la procédure de nettoyage de la vaisselle de laboratoire en vigueur dans l'unité CIME : rinçage à l'eau MilliQ, décontamination dans un bac d'acide HNO<sub>3</sub> à 10 % pendant 6 h minimum, rinçage à l'eau MilliQ et séchage en étuve à 50 °C.

#### III. 3. 1. c. ii. Préparation chimique des échantillons

Les conditions d'extraction initiales utilisées pour l'optimisation sont basées sur les travaux de Brisbin et Caruso (2002). Une prise d'essai de 0,15 g est introduite dans les récipients en quartz. Un volume (10 mL) d'eau, de méthanol ou d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH y est ajouté. Le rotor peut contenir au maximum 6 matras. En pratique, chaque série comprend 5 échantillons et un blanc d'extraction (pour lequel seul le volume de solvant est présent).

Un programme de chauffage déterminant la puissance du micro-onde en fonction du temps a été défini (Tableau XV). Il est constitué de trois étapes : une montée progressive en température et en pression afin de limiter les risques d'emballement thermique pouvant entraîner des surpressions, une étape de chauffage à température constante suivie d'une étape de refroidissement. Le système est muni d'un détecteur mesurant la température et la pression de chacun des matras afin de contrôler ces deux paramètres pendant le chauffage.

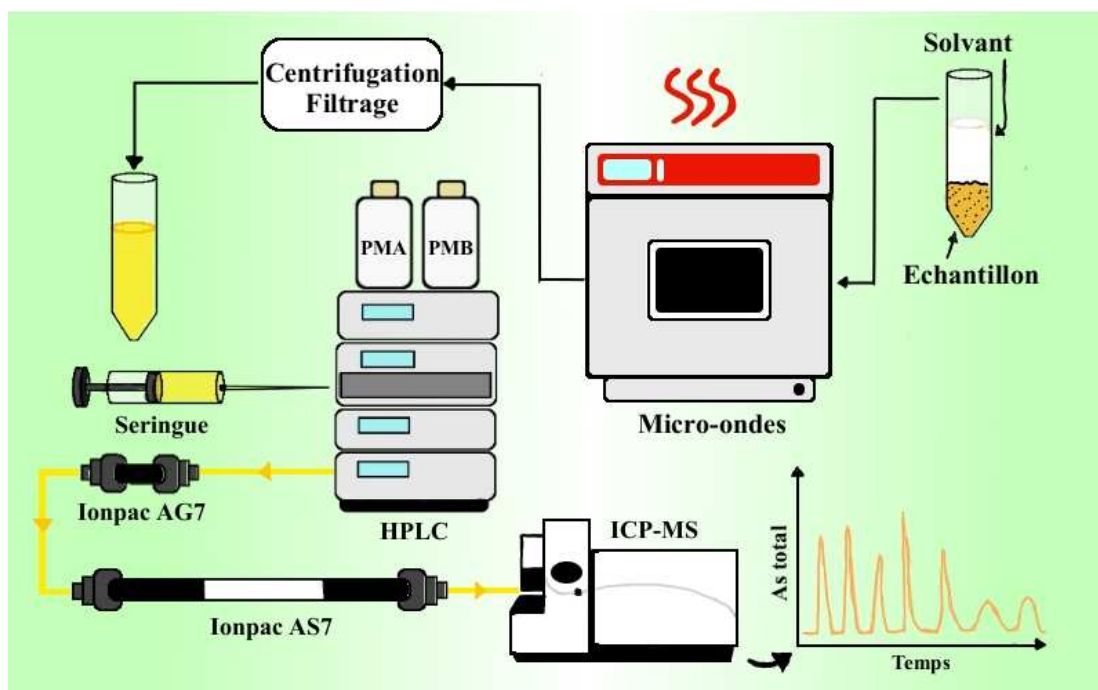
**Tableau XV** : Programme d'extraction MAE

Étapes	Température initiale (°C)	Durée (min)	Température finale (°C)	Puissance (W)	Vitesse de refroidissement*
1	20	2,6	80	800	1
2	80	2 ; 4 ou 6	80	800	1
3	80	20	20	-	3

\* Unité arbitraire

À la suite du programme d'extraction, les échantillons sont refroidis à la température ambiante puis repris à l'eau Milli-Q (*MilliPore SA.*, St Quentin en Yvelines, France) dans des tubes de polyéthylène de 50 mL. Ils sont ensuite centrifugés à 3500 tours par minute et à température ambiante pendant 5 min. Enfin, la partie surnageant les échantillons est filtrée sur des filtres nylon 0,45 µm (*Fisher Scientific Bioblock*, France) avant d'être analysée.

La figure 15 présente le schéma général de la procédure d'extraction assistée par micro-onde.



**Figure 15** : Schéma général de la procédure MAE

### III. 3. 2. Quantification des espèces arsénées

L'ICP-MS utilisé pour cette partie de l'étude est un X-Series<sup>II</sup> (*Thermo Scientific*). Le système chromatographique utilisé dans cette partie de l'étude consiste en une chaîne chromatographique Ultimate 3000 (*Dionex*), une valve d'injection (*Rheodyne*) équipée d'une boucle d'injection de 100  $\mu\text{L}$ . Les connexions entre l'ICP-MS et le système chromatographique ainsi que le mode d'acquisition sont identiques à celles décrites dans le paragraphe II. 3. 1.

La colonne chromatographique utilisée est identique à celle décrite en II. 3. 2. Les conditions chromatographiques déterminées dans la partie II ont légèrement été modifiées : 99 % PMA (3min)  $\Rightarrow$  10 % PMA (2 min)  $\Rightarrow$  80 % PMA (6,5 min) en raison d'une adaptation nécessaire liée au changement de système chromatographique.

Pour l'étalonnage de l'instrument, cinq solutions d'étalonnage de 0, 2, 5, 10 et 20  $\mu\text{g As L}^{-1}$  des 8 espèces arsénées considérées (As(III), MA, DMA, As(V), AB, TMAO, AC et TMA<sup>+</sup>) sont préparées dans les mêmes conditions que les échantillons extraits.

Le composé TMA<sup>+</sup>, qui ne faisait pas partie des espèces étudiées dans la partie II, élue juste après AC ( $t_R = 12$  minutes). Les résultats pour TMAO sont présentés comme la somme de teneurs en TMAO et AB2. En effet, l'analyse d'une solution étalon de AB2 a montré que le pic de cette espèce co-élueait avec celui de TMAO dans les conditions de séparation utilisées.

Entre chaque solution analysée, un rinçage de la seringue et de la boucle d'injection est effectué avec de l'eau *MilliQ*. La colonne et la colonne de garde sont régulièrement régénérées en injectant un mélange préconisé par le constructeur (500 mM HNO<sub>3</sub> + 10 % MeOH) pendant au minimum 1 heure (en prenant soin de positionner la colonne de garde après la colonne, pour éviter la pollution de cette dernière).

La réduction de As(V) en As(III) au cours du temps est observée dans les vials en PTFE (Dionex, 10 mL) utilisés pour l'autosamplieur de la chaîne chromatographique alors que ce phénomène n'est pas observé dans les tubes en PTFE utilisés pour la dilution des échantillons extraits. La composition de ces vials semblent donc entraîner une réaction d'oxydo-réduction impliquant les formes arséniées inorganiques. Les échantillons sont donc introduits le plus tard possible dans ces vials afin d'éviter cette réduction de As(V) en As(III). Cependant, l'utilisation de vials en quartz ou une diminution de la température dans l'autosamplieur pourront être envisagées afin de réduire ce phénomène.

Un phénomène, à la fois de dédoublement du pic MA et de résolution faible entre ce dernier et le pic As(III), a parfois été rencontré dans certaines matrices complexes, comme observé précédemment par Londesborough *et al.* (1999) et Simon *et al.* (2004). Une solution tampon d'acétate (0,5 mmol L<sup>-1</sup>, pKa = 4,8), utilisée en début de séparation dans les travaux de Simon *et al.* (2004), semble permettre de se soustraire au problème de dédoublement du pic MA. Néanmoins, l'utilisation de ce tampon entraîne nécessairement des modifications des conditions optimales de séparation. Dans ces travaux de thèse, l'addition des deux pics MA permettant une quantification satisfaisante de cette espèce, l'utilisation d'une solution tampon n'a pas été testée. Ce phénomène sera exposé plus précisément dans la partie IV.

### III. 3. 3. Quantification de l'As total

La quantification de l'As total est basée sur la méthode interne accréditée COFRAC de l'unité CIME d'«analyse multi-élémentaire (As, Cd, Hg et Pb) dans les denrées alimentaires

d'origine animale par ICP-MS après minéralisation par micro-ondes en système fermé». (Noël *et al.*, 2005) Le même ICP-MS que décrit en III. 3. 1. est utilisé (X-Series<sup>II</sup>, *Thermo Fisher*). Les solutions sont drainées par une pompe péristaltique à partir des tubes disposés sur un échantillonneur automatique ASX 520 fabriqué et commercialisé par la société *CETAC* (Nebraska, USA).

Le rapport  $m/z = 75$  étant susceptible d'être interféré par l'ion poly-atomique  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ , le signal de l'As mesuré est corrigé selon l'équation suivante :

$$I(^{75}\text{As}) = I(^{75}\text{mass}) - 3,127 \times [I(^{77}\text{mass}) - 0,826 \times I(^{82}\text{Se})]$$

Avec  $3,127 = \text{Abondance } ^{75}\text{ArCl} / \text{Abondance } ^{77}\text{ArCl}$  et  $0,826 = \text{Abondance } ^{77}\text{Se} / \text{Abondance } ^{82}\text{Se}$

L'acquisition des données a donc été réalisée en mode continu aux masses sur charges  $m/z = 75(\text{As}), 77(\text{ArCl}), 82(\text{Se})$ .

L'utilisation du mode standard et d'une correction mathématique pour palier l'interférence  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  se justifie pour deux raisons. D'une part, nos travaux sur l'utilisation du mode CCT (sur un ICP-MS PQ ExCell, *Thermo Scientific*) pour la détermination de l'As total dans les denrées d'origine animale ont montré que même si l'interférence  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  était sensiblement diminuée par cette technique, de nouvelles interférences pouvaient être générées au sein de la cellule de collision / réaction. (Dufailly *et al.*, 2008, Annexe 2) D'autre part, la méthode de détermination de l'As total dans les denrées alimentaires par ICP-MS sans CCT (avec application de la correction mathématique) a été validée en mode standard (Noël *et al.*, 2005) et fait l'objet de nombreux essais interlaboratoires (EIL) dont les résultats sont satisfaisants. Le dernier résultat en As total (Z-score et zeta score tous deux égaux à -0,1) est reporté dans le rapport du quatrième EIL (pour les métaux lourds dans les denrées alimentaires) organisé par le laboratoire de référence de la communauté européenne (Community Reference Laboratory for Heavy Metals in Feed and Food ou CRL-HM, IRMM, Geel, Belgique). (De la Calle *et al.*, 2008) Néanmoins, une autre étude en cours (Gherbi L., Master 2 recherche) teste et optimise le mode CCT sur une cellule de collision de 3<sup>ème</sup> génération sur un ICPMS Thermo X Series<sup>II</sup>, afin d'estimer si ce système récent permettra d'obtenir cette fois une meilleure justesse pour la détermination en As total dans des matrices de produits de la pêche chargées en chlorures. (Gherbi, 2008)

Pour l'étalonnage de l'instrument, 6 solutions d'étalonnage de 0, 2, 5, 10, 20 et 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'As total sont préparées dans les mêmes conditions que les échantillons extraits. Entre chaque solution analysée, un rinçage est effectué avec une solution diluée d' $\text{HNO}_3$  à 2 %.

### III. 4. Résultats et discussions

#### III. 4. 1. Optimisation des conditions d'extraction de la procédure MAE

##### III. 4. 1. a. Étude préliminaire

L'objectif de cette étude préliminaire a été de déterminer les facteurs susceptibles d'avoir une influence sur les taux de récupération en As total dans deux matériaux de référence certifiés (MRC) : DORM 2 et CRM 627 (18,0 et 4,8 mg As  $\text{kg}^{-1}$ , respectivement).

Cinq paramètres ont été sélectionnés : (1) la prise d'essai (0,05-0,20 g par pas de 0,05 g), (2) le temps de chauffage (2, 4 et 6 min), (3) la concentration en MeOH dans le solvant d'extraction (0, 20, 50, 80, 100 %), (4) le volume de solvant (10, 15 et 20 mL) et (5) la température de chauffage (80, 100 et 120 °C). Lorsqu'un paramètre était étudié, les autres étaient fixés selon les conditions de Brisbin et Caruso (2002).

Les taux de récupération de l'As total dans les DORM-2 et CRM 627 ont été calculés tels que :  $R = \left( \frac{X_f}{X_c} \right) \times 100$ , (avec  $X_f$  et  $X_c$  définis comme les valeurs en As total observée et certifiée, respectivement).

Les résultats de cette étude préliminaire sont présentés dans le tableau XVI.

**Tableau XVI :** Résultats de l'étude préliminaire

Paramètres		Taux de récupération (%)	
		DORM 2	CRM 627
Prise d'essai (g)	0,05	74	65
	0,10	96	82
	0,15	103	89
	0,20	87	79
Temps de chauffage (min)	2	94	85
	4	101	92
	6	96	89
Concentration en MeOH (%)	0	95	88
	20	60	66
	50	78	82
	80	98	90
	100	75	81
Volume de solvant (mL)	10	102	89
	15	107	97
	20	105	90
Température de chauffage (°C)	80	99	93
	100	96	95
	120	88	85

Les résultats indiquent que la concentration en MeOH dans le solvant semble être le paramètre ayant le plus d'influence sur l'extraction de l'As total dans les 2 échantillons considérés. En effet, les taux de récupération de l'As total dans un solvant composé de 80 % de MeOH s'élèvent à 98 et 90 % alors que ceux dans 20 % de MeOH ne sont que de 60 et 66 %, pour le DORM 2 et le CRM 627, respectivement.

Les meilleurs taux de récupération sont observés pour les extractions dans 100 % H<sub>2</sub>O (95-88 %) et dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v) (98-90 %). Ces observations sont en accord avec les résultats de Brisbin et Caruso (2002) et Ackley *et al.* (1999) qui ont rapporté les meilleurs taux de récupération en l'As total avec un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v) dans le TORT 2 (95-106 %) et le DORM 2 (104-114 %), respectivement. De plus, les taux de récupération obtenus après une extraction 100 % H<sub>2</sub>O dans le TORT 2 par Brisbin et Caruso (2002) (89-93 %) s'avèrent aussi satisfaisants, tout comme ceux obtenus par Narukawa *et al.* (2008) dans des échantillons de riz (97-106 %). Enfin, même si Hirata *et al.* (2006) a rapporté des taux de récupération en As total légèrement meilleurs dans le DORM 2 après une extraction dans 50 % de MeOH, les autres matrices ont été extraites uniquement avec un solvant aqueux. Dans une moindre mesure, la prise d'essai semble avoir un effet significatif sur les taux de récupération en As total. Les meilleurs taux ont été obtenus pour une prise d'essai de 0,15 g (103-89 %) correspondant à la prise d'essai utilisée par Brisbin et Caruso (2002). Cette valeur

a donc été sélectionnée pour la suite de l'étude. Les variations des résultats pour le temps de chauffage, le volume de solvant et la température de chauffage sont inférieures à 6 %. Ces 3 paramètres ne semblent donc pas influents. Pour la suite de l'étude, nous avons décidé de fixer ces paramètres non influents aux valeurs rapportées dans les travaux de Brisbin et Caruso (2002) (temps de chauffage de 4 minutes, volume de solvant de 10 mL et température de chauffage de 80 °C) afin de comparer uniquement les deux modes d'extraction les plus prometteurs (100 % H<sub>2</sub>O et H<sub>2</sub>O / MeOH (1/4 v/v)). Plusieurs MRC de produits de la pêche différents ont été sélectionnés pour lesquels à la fois l'As total et les différents composés arséniés ont été analysés.

#### III. 4. 1. b. Comparaison des conditions d'extraction 100 % H<sub>2</sub>O et 80 % MeOH

Le tableau XVII présente, pour les 2 conditions d'extraction testées, les taux de récupération (%) observés en As total dans 5 MRC ainsi que ceux obtenus sur des espèces certifiées dans le DORM 2 (16,4 et 0,250 mg As kg<sup>-1</sup>, pour AB et TMA<sup>+</sup>, respectivement) et dans le MRC 627 (0,150 et 3,9 mg As kg<sup>-1</sup>, pour DMA et AB, respectivement) (n = 5).

**Tableau XVII :** Taux de récupération (%) d'As total et des espèces As certifiées pour 5 MRC

MRC		As total	AB	DMA	TMA <sup>+</sup>
TORT 2	A	95 ± 3*	-	-	-
	B	103 ± 6	-	-	-
DORM 2	A	99 ± 5	102 ± 4		107 ± 2
	B	109 ± 2	112 ± 4		101 ± 6
DOLT 3	A	98 ± 3	-	-	-
	B	94 ± 11	-	-	-
DORM 3	A	84 ± 6	-	-	-
	B	103 ± 6	-	-	-
CRM 627	A	108 ± 10	125 ± 8	103 ± 7	-
	B	92 ± 6	97 ± 10	105 ± 13	-

A : extraction 100% H<sub>2</sub>O, B : extraction MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v),  
Valeur moyenne ± écart-type (n = 5)

En considérant un intervalle de confiance de 10 % (k = 2), toutes les valeurs en As total et en espèces As sont en accord avec les valeurs de référence et sont comparables pour les 2 conditions d'extraction testées, sauf le taux pour AB dans le CRM 627 après extraction 100 % H<sub>2</sub>O qui semble légèrement surestimé (125 %). Les taux de récupération en As total observés dans le TORT 2 (95-103 %) sont proches de ceux rapportés par Brisbin et Caruso (2002) (90-



99 %) et Karthikeyan (2004) (92 %). D'autre part, le taux de récupération en As total pour le DORM 2 après une extraction H<sub>2</sub>O / MeOH (1/4 v/v) (109 %) est similaire aux résultats de Ackley *et al.* (1999) (108 %) et Wang *et al.* (2004) (99 %) alors que celui après une extraction 100 % H<sub>2</sub>O (99 %) est similaire à celui de Karthikeyan (2004) (101 %) et légèrement supérieur à ceux obtenus par Ackley *et al.* (1999) (77 %) et Hirata *et al.* (2006) (86 %).

Le tableau XVIII présente les teneurs (mg kg<sup>-1</sup>) de l'ensemble des espèces As dans les 5 MRC observées pour les 2 conditions d'extraction (n = 5).

**Tableau XVIII :** Teneurs des espèces As pour les 2 conditions d'extraction dans 5 MRC(mg kg<sup>-1</sup>)

MRC		As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2	AC	TMA <sup>+</sup>	Σ****	Teneur As total Certifiée
TORT 2	A	0,408 ± 0,095*	0,460 ± 0,060	1,27 ± 0,14	0,725 ± 0,017	13,0 ± 1,8	1,41 ± 0,11	< 0,070**	< 0,070	17,3 ± 2,2	<b>21,6</b> <b>± 1,8</b>
	B	0,588 ± 0,113	0,364 ± 0,150	0,711 ± 0,150	0,645 ± 0,099	12,2 ± 0,6	1,25 ± 0,18	< 0,070	< 0,070	15,8 ± 1,3	
DORM 2	A	0,031 ± 0,014	0,061 ± 0,008	0,359 ± 0,032	0,029 ± 0,018	16,7 ± 0,6	0,201 ± 0,016	< 0,070	0,265 ± 0,005	17,6 ± 0,7	<b>18,0</b> <b>± 1,1</b>
	B	0,064 ± 0,011	0,033 ± 0,024	0,314 ± 0,029	0,026 ± 0,002	18,3 ± 0,7	0,200 ± 0,041	< 0,070	0,251 ± 0,016	19,2 ± 0,8	
DOLT 3	A	0,074 ± 0,011	0,047 ± 0,008	0,480 ± 0,032	0,073 ± 0,007	8,11 ± 0,65	0,357 ± 0,093	< 0,070	< 0,070	9,1 ± 0,8	<b>10,2</b> <b>± 0,5</b>
	B	0,136 ± 0,004	< 0,015	0,417 ± 0,024	< 0,015	7,56 ± 0,20	0,452 ± 0,048	0,081 ± 0,022	< 0,070	8,6 ± 0,3	
DORM 3	A	0,085 ± 0,014	0,091 ± 0,028	0,459 ± 0,007	0,243 ± 0,023	4,69 ± 0,16	0,221 ± 0,028	< 0,070	< 0,070	5,8 ± 0,3	<b>6,9</b> <b>± 0,3</b>
	B	0,129 ± 0,018	0,066 ± 0,024	0,495 ± 0,054	0,276 ± 0,036	5,24 ± 0,26	0,188 ± 0,064	< 0,070	< 0,070	6,4 ± 0,5	
CRM 627	A	0,054 ± 0,014	0,063 ± 0,010	0,154 ± 0,011	< 0,015	4,86 ± 0,3	0,051 ± 0,010	< 0,070	< 0,07	5,2 ± 0,3	<b>4,8</b> <b>± 0,3</b>
	B	0,172 ± 0,071	< 0,015	0,158 ± 0,019	< 0,015	3,82 ± 0,4	0,099 ± 0,044	< 0,070	< 0,070	4,2 ± 0,5	

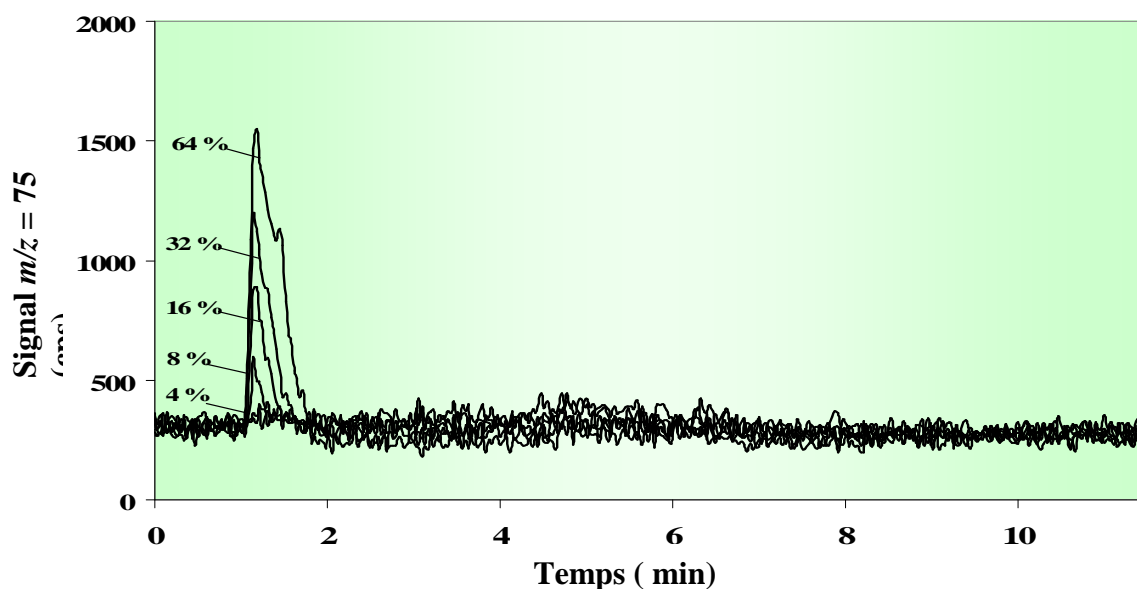
A : extraction 100% H<sub>2</sub>O, B : extraction MeOH/H<sub>2</sub>O, \* Valeur moyenne ± écart-type (n = 5), \*\* LQ (cf. Tableau XXII), \*\*\* somme des espèces As

La somme des teneurs des espèces As est généralement en accord avec la teneur certifiée en As total pour les deux conditions d'extraction (sauf pour TORT 2) et est légèrement meilleure pour une extraction 100 % H<sub>2</sub>O. Les différences observées pour TORT 2 pourraient s'expliquer par plusieurs pics inconnus (identifiés comme des organosucres par Foster *et al.* (2007)) qui n'ont pas été quantifiés dans cette étude.

Les teneurs observées pour As(V), AB, TMAO+AB2, AC, DMA (sauf dans le TORT 2) et TMA<sup>+</sup> après extraction 100 % H<sub>2</sub>O sont généralement similaires à celles observées après

extraction H<sub>2</sub>O / MeOH (1/4 v/v) dans l'ensemble des MRC considérés. À l'inverse, les teneurs observées pour As(III) sont systématiquement plus importantes en utilisant un solvant composé de MeOH.

La figure 16 présente les chromatogrammes observés à  $m/z = 75$  pour des solutions à 4, 8, 16, 32 et 64 % de MeOH.



**Figure 16 :** Chromatogramme à  $m/z = 75$  pour des solutions de 4, 8, 16, 32 et 64 % de MeOH

Comme rapporté par Kohlmeier *et al.* (2002), le méthanol a tendance à éluer au niveau du temps mort du chromatogramme en même temps que le pic As(III), avec le système chromatographique utilisé. Ce phénomène conduit à une augmentation du signal de l'espèce inorganique expliquant la surestimation observée, qui est difficilement contrôlable et sujette à variations. Même si les résultats obtenus dans les 5 MRC étudiés tendent à montrer que les 2 conditions d'extraction testées (100 % H<sub>2</sub>O et 80 % MeOH) donnent généralement des teneurs en As total et spéciation similaires et en accord avec les valeurs de référence existantes, la présence de MeOH peut induire une surestimation des teneurs en As(III). En conséquence, les conditions d'extraction dans 100 % H<sub>2</sub>O ont été préférées pour la suite de l'étude afin de se soustraire à l'éventuelle surestimation de As(III), mais aussi dans un souci de simplification de la procédure d'extraction. De plus, ces conditions s'avèrent les plus compatibles avec l'utilisation et la stabilité à long terme du système ICP-MS qui a tendance à s'encrasser en présence de fortes quantités de carbone.

## III. 4. 1. c. Comparaison des résultats avec la littérature

Le tableau XIX compare les teneurs des espèces As et de l'As total obtenus au cours de ces travaux pour les MRC DORM 2, TORT 2 et CRM 627 avec celles rapportées dans la littérature depuis 1998. À notre connaissance, aucun résultat en spéciation n'a été rapporté sur les DORM 3 et DOLT 3.

**Tableau XIX :** Teneurs observées dans la littérature sur 3 CRM (mg kg<sup>-1</sup>)

MRC	As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2	AC	TMA <sup>+</sup>	As Total	Référence
<b>DORM 2</b>	<i>0,031</i>	<i>0,061</i>	<i>0,359</i>	<i>0,029</i>	<i>16,7</i>	<i>0,201</i>	<i>&lt; 0,070*</i>	<i>0,265</i>	<i>17,9</i>	<i>Cette étude<sup>a</sup></i>
					<b>16,4</b>			<b>0,250</b>	<b>18,0</b>	<b>Certifiée</b>
	0,075	nd	0,281	0,024	18,3	0,152	nd		18,8	Article 1 <sup>a</sup>
					24,6				19,4	Ackley <i>et al.</i> (1999) <sup>a</sup>
	nd	nd	0,280	nd	16,8	0,170	0,023	0,240	18,5	Kirby et Maher (2002) <sup>a</sup>
			0,250	0,360	16,0					Karthikeyan et Iyer (2004) <sup>a</sup>
	0,110	0,310	0,160	nd	16,9	0,340	nd	0,360	18,2	Karthikeyan (2004) <sup>a</sup>
		nd	0,160	1,90	16,5	nd	nd	0,360	18,9	Hirata <i>et al.</i> (2005) <sup>a</sup>
		0,200	0,410	0,650	13,2	0,010	nd	0,430	15,0	Hirata <i>et al.</i> (2006) <sup>a</sup>
	nd	0,070	0,320	0,020	17,1	0,160	nd	0,270	18,4	Foster <i>et al.</i> (2007) <sup>a</sup>
	nd	0,050	0,340	0,020	16,2	0,160	0,010	0,250	17,4	Foster <i>et al.</i> (2007) <sup>a</sup>
	nd	0,019	0,320	0,004	17,5				17,8	Wang <i>et al.</i> (2007) <sup>a</sup>
	0,080	nd	0,280	0,480	16,5	0,400	0,080	nd	17,4	Mattusch <i>et al.</i> (1998) <sup>b</sup>
	< 0,030	< 0,030	0,280	< 0,030	16,0	< 0,030	0,024	0,230	17,7	Goessler <i>et al.</i> (1998) <sup>b</sup>
	0,100	nd	0,300	0,400	13,5	0,400	0,020	0,100	14,8	Londesborough <i>et al.</i> (1999) <sup>b</sup>
				0,145**					17,9	Munoz <i>et al.</i> (1999) <sup>b</sup>
			0,420		17,2			0,260		Falk <i>et al.</i> (2000) <sup>b</sup>
			nd		16,4	0,240	< 0,050	0,250	16,9	Kuehnelt <i>et al.</i> (2001) <sup>b</sup>
		< 0,003	0,300		15,9	< 0,001	0,110	0,110	18,0	Suner <i>et al.</i> (2001) <sup>b</sup>
	0,050	0,140	0,490	0,050	16,1	0,300	nd	0,300	17,4	Kohlmeyer <i>et al.</i> (2002) <sup>b</sup>
nd	nd	0,29	0,05	16,1					Wrobel <i>et al.</i> (2002) <sup>b</sup>	
		0,25		16,0		< 0,04	0,28		Kubota <i>et al.</i> (2002) <sup>b</sup>	
		0,300		16,9	0,181	0,010	0,260	17,8	Sloth <i>et al.</i> (2003) <sup>b</sup>	
		0,660		15,8					Pizarro <i>et al.</i> (2003a) <sup>b</sup>	
nd	nd	0,260	nd	15,9	0,270	nd	nd	17,4	Simon <i>et al.</i> (2004) <sup>b</sup>	
	0,018	0,28	0,28	17,0***					McKiernan <i>et al.</i> (1999) <sup>c</sup>	
nd	0,015	0,230	0,006	17,6	0,154	0,024	0,266	19,6	Wahlen <i>et al.</i> (2004) <sup>c</sup>	
		0,204	nd	15,6				17,2	Mato-Fernandez <i>et al.</i> (2007) <sup>c</sup>	
<b>TORT 2</b>	<i>0,408</i>	<i>0,460</i>	<i>1,27</i>	<i>0,725</i>	<i>13,0</i>	<i>1,41</i>	<i>&lt; 0,070</i>	<i>&lt; 0,070</i>	<i>20,6</i>	<i>Cette étude<sup>a</sup></i>
									<b>21,6</b>	<b>Certifiée</b>
	nd	0,200	1,03	0,410	13,1	1,20	nd	0,055	19,9	Kirby et Maher (2002) <sup>a</sup>
		0,147	1,33	0,684	13,6		0,299		16,2	Brisbin <i>et al.</i> (2002) <sup>a</sup>
			1,06	0,470	12,8					Karthikeyan et Iyer (2004) <sup>a</sup>
				0,190**						Sloth <i>et al.</i> (2005) <sup>a</sup>
		0,500	1,10	0,500	12,2	0,80	nd	nd	15,1	Hirata <i>et al.</i> (2006) <sup>a</sup>
	nd	nd	1,04	0,320	13,9	1,20	0,040	0,050	19,0	Foster <i>et al.</i> (2007) <sup>a</sup>
	nd	nd	1,70	0,780	14,4	1,40	0,060	0,050	22,0	Foster <i>et al.</i> (2007) <sup>a</sup>
				0,581					22,3	Munoz <i>et al.</i> (1999) <sup>b</sup>
		0,030	0,97		13,8	0,150****	< 0,003	< 0,003	23,0	Suner <i>et al.</i> (2001) <sup>b</sup>
			1,39		13,0	1,08	0,024	0,055		Sloth <i>et al.</i> (2003) <sup>b</sup>
nd	0,093	0,84	0,093	14,3	0,84	0,043	0,044	19,7	Wahlen <i>et al.</i> (2004) <sup>c</sup>	
		0,95		17,5				22,6	Fitzpatrick <i>et al.</i> (2002) <sup>d</sup>	
0,093	0,093	0,84	0,093	14,2		0,024		21,6	Cao <i>et al.</i> (2008) <sup>e</sup>	
<b>CRM 627</b>	<i>0,054</i>	<i>0,063</i>	<i>0,154</i>	<i>&lt; 0,015</i>	<i>4,9</i>	<i>0,051</i>	<i>&lt; 0,070</i>	<i>&lt; 0,070</i>	<i>5,2</i>	<i>Cette étude<sup>a</sup></i>
					<b>3,9</b>				<b>4,8</b>	<b>Certifiée</b>
	0,076	< 0,016	0,157	< 0,024	4,1	0,037	< 0,042		4,4	Article 1 <sup>a</sup>
	0,002	0,010	0,154	0,005	4,1	< 0,002			4,2	Nakazato <i>et al.</i> (2000) <sup>a</sup>
	nd	nd	0,139	nd	3,8				4,1	Gomez-Ariza <i>et al.</i> (2000) <sup>a</sup>
				0,015**						Sloth <i>et al.</i> (2005) <sup>a</sup>
			0,140		3,7	0,043	0,012	0,037	4,1	Sloth <i>et al.</i> (2003) <sup>b</sup>
		< 0,003	0,163		4,1	< 0,001	< 0,003	< 0,003	4,9	Suner <i>et al.</i> (2001) <sup>b</sup>
		nd	nd	5,3		nd		5,8	Mato-Fernandez <i>et al.</i> (2007) <sup>c</sup>	
nd	nd	0,140	0,010	3,6				3,8	Sanz <i>et al.</i> (2005a) <sup>e</sup>	

nd : non détecté, \* LQ (cf. Tableau XXII), \*\* somme des teneurs de As(III) et As(V), \*\*\* AB+AC, \*\*\*\* teneur en TMAO uniquement  
a : MAE, b : Liq/Sol, c : ASE, d : Enzymatique, e : Sonification

Les teneurs observées pour DMA, As(V), AB, TMAO+AB2, AC et TMA<sup>+</sup> sont généralement comparables à celles rapportées dans la littérature. La comparaison des teneurs en As (III) et MA est plus délicate, en raison du faible nombre de valeurs observées dans la littérature, notamment concernant le TORT 2 et le CRM 627. Dans le DORM 2, ces teneurs sont comparables ou légèrement inférieures à celles de la littérature alors que celles dans le TORT 2 sont largement supérieures. En réalité, il apparaît délicat d'établir un consensus sur les teneurs des espèces arséniées non certifiées dans les MRC étudiés dans la mesure où des différences importantes peuvent être observées parmi les valeurs rapportées dans la littérature. (Sloth *et al.*, 2003) C'est d'autant plus évident dans le cas des teneurs en As(V) observées dans le DORM 2 pour lequel 5 teneurs sont supérieures à 0,36 mg As kg<sup>-1</sup> (dont une supérieure à 1 mg As kg<sup>-1</sup>) alors que 8 autres sont inférieures à 0,05 mg As kg<sup>-1</sup>.

#### III. 4. 2. Validation interne de la méthode

Suite aux résultats précédents, les conditions optimisées d'extraction et de séparation semblaient adaptées à la spéciation de l'As dans les produits de la pêche et ont pu être utilisées pour la validation de la méthode analytique. Pour cette validation interne, nous avons utilisé comme support les normes NFV 03-110 (AFNOR, 1998), XPT 90-210 (AFNOR, 1999), FD V 03-115 (AFNOR, 1996). Les critères d'évaluation définis dans cette norme concernent la linéarité, les limites de détection et de quantification, la spécificité, la fidélité (en terme de répétabilité intra-laboratoire et justesse) et la reproductibilité intra.

##### III. 4. 2. a. Linéarité

La linéarité est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon. Il s'agit donc de vérifier le domaine de linéarité et d'en déduire les caractéristiques de l'étalonnage. Il faut choisir  $p$  ( $p \geq 5$ ) niveaux de concentrations situés dans le domaine de linéarité supposé. Pour chaque niveau de concentration, il faut préparer  $n$  ( $n \geq 5$ ) solutions étalons à partir d'un étalon de pureté définie et mesurer la réponse instrumentale. (AFNOR, 1998)

La linéarité de la méthode a été testée pour une gamme de concentration allant de 2 à 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  (gamme d'étalonnage de 0, 6, 15, 30, 60  $\mu\text{g As L}^{-1}$  pour AB et 0, 2, 5, 10 et 20  $\mu\text{g As L}^{-1}$  pour les autres espèces) ( $n = 10$ ). (Tableau XX)

**Tableau XX** : Résultats linéarité et stabilité

		As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2	AC
Linéarité ( $n = 10$ )	Pente	18711	22114	20496	20422	19738	14297	14972
	Ordonnée à l'origine	1177	437	902	-3157	-8617	1250	-3895
	$r^2$	0,999	1,000	1,000	0,998	0,999	1,000	0,998
Stabilité ( $n= 10, \pm \text{SD}$ )	Temps de rétention (min)	1,13 $\pm 0,02$	2,19 $\pm 0,05$	3,22 $\pm 0,11$	4,79 $\pm 0,09$	6,18 $\pm 0,10$	8,37 $\pm 0,58$	10,1 $\pm 0,7$
	Aire ( $10^6$ )	2,91 $\pm 0,29$	3,34 $\pm 0,22$	3,25 $\pm 0,30$	3,26 $\pm 0,37$	8,27 $\pm 0,51$	2,11 $\pm 0,32$	1,91 $\pm 0,25$

Pour toutes les espèces As considérées, l'analyse des aires de pics en fonction des concentrations a démontré une linéarité acceptable, avec des coefficients de corrélation  $r^2$  supérieurs à 0,995.

D'autre part, la stabilité à long terme des temps de rétention et des aires de pics des différentes espèces a été évaluée en analysant une solution multi-espèce à 20  $\mu\text{g As L}^{-1}$  à des jours différents ( $n = 10$ ). Les résultats montrent que les temps de rétention et les aires de pics des différentes espèces varient de moins de 7 et 15 %, respectivement.

#### III. 4. 2. b. Limites de détection et de quantification

La limite de détection (LD) est la plus petite concentration d'un analyte pouvant être détectée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. La limite de quantification (LQ) est la plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

Conformément à la norme NF EN 13804 (AFNOR, 2000), la LQ est égale à 6 fois l'écart-type de la moyenne de 21 blancs. Dans notre étude, les limites de détection et de quantification ont été estimées comme, respectivement, 3 et 6 fois l'écart-type des teneurs de 10 solutions de blanc exprimées en  $\text{mg kg}^{-1}$  pour une prise d'essai de 0,15 g et un volume de reprise de 50

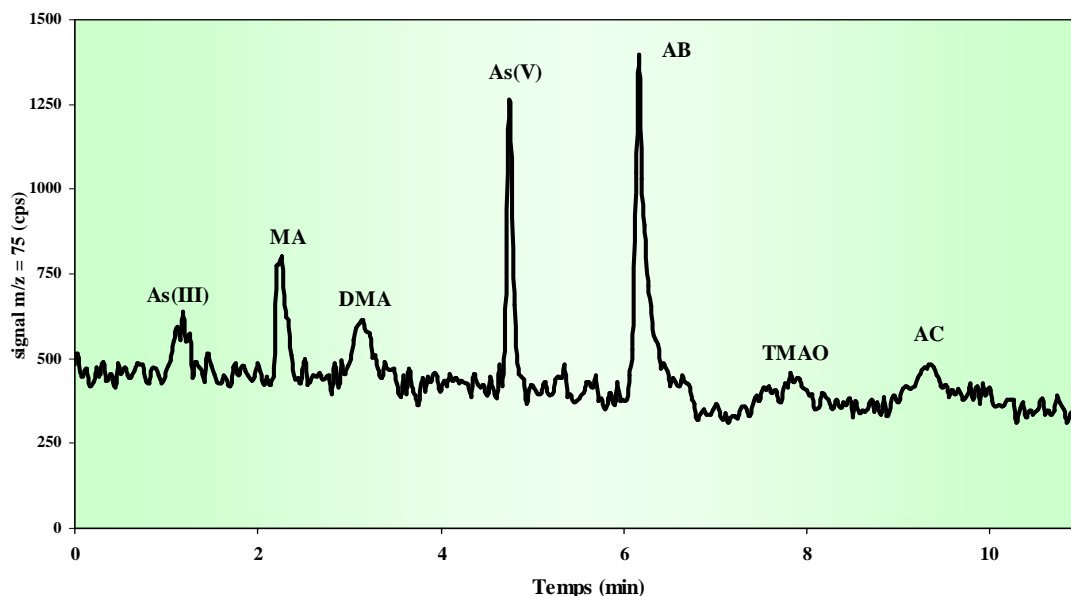
mL. Par cette méthode, les LQ estimées sont comprises entre 0,01 et 0,07 mg kg<sup>-1</sup> selon les espèces (valeurs cibles dans le Tableau XXI).

Afin de s'assurer de leur pertinence, l'acceptabilité des LQ calculées a été vérifiée par un test d'exactitude préconisé dans le projet de révision de la norme XP T 90-210. (AFNOR, 1999) Pour ce faire, une solution dopée avec une quantité d'analyte correspondant à la LQ calculée pour chaque espèce a été analysée 5 fois.

**Tableau XXI :** Évaluation des limites de quantification initiales

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2	AC
Moyenne	0,020 ± 0,003	0,031 ± 0,003	0,031 ± 0,003	0,036 ± 0,003	0,051 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,068 ± 0,006
Valeur cible	0,013	0,030	0,030	0,040	0,055	0,020	0,070
IC (10%, k = 3)	0,009-0,017	0,021-0,039	0,021-0,039	0,028-0,052	0,039-0,072	0,014-0,026	0,049-0,091

Les premiers résultats ont montré que les valeurs observées pour As(III) et TMAO étaient supérieures aux valeurs cibles choisies (intervalle de confiance = ± 30 % de la valeur cible). Ces LOQ semblent donc sous estimées et ne peuvent pas être considérées comme acceptables. D'autre part, le chromatogramme observé indique clairement une surestimation de valeurs pour MA, As(V) et AB. (Figure 17)



**Figure 17 :** Chromatogramme observé pour une solution dopée avec une quantité des espèces As correspondante aux LQ initiales

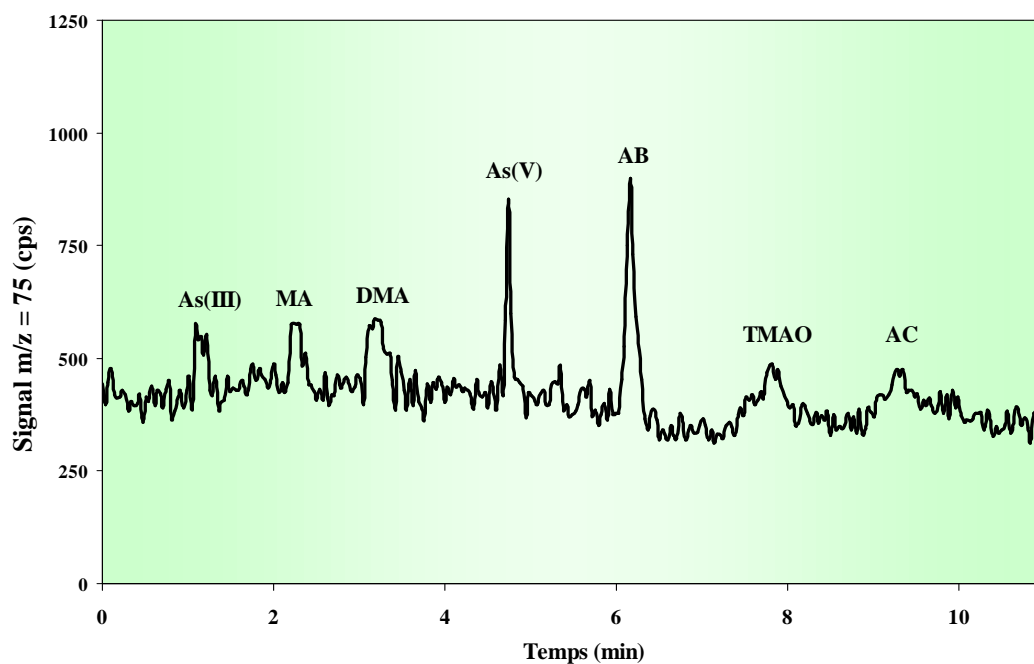
Par itérations successives, de nouvelles LQ ont été déterminées et l'évaluation de leur acceptabilité est présentée dans le tableau XXII.

**Tableau XXII :** Évaluation et vérification des limites et de détection de quantification

		As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2	AC
(mg kg <sup>-1</sup> )	LD	0,010	0,007	0,015	0,007	0,007	0,025	0,035
Vérification acceptabilité	Moyenne	0,021 ± 0,003	0,017 ± 0,002	0,027 ± 0,003	0,017 ± 0,003	0,018 ± 0,005	0,059 ± 0,011	0,076 ± 0,007
	Valeur cible	<b>0,020</b>	<b>0,015</b>	<b>0,030</b>	<b>0,015</b>	<b>0,015</b>	<b>0,050</b>	<b>0,070</b>
IC (10%, k = 3)		0,014-0,026	0,010-0,020	0,021-0,039	0,010-0,020	0,010-0,020	0,035-0,065	0,049-0,091

Les valeurs moyennes observées pour toutes les espèces considérées sont en accord avec la valeur cible choisie. Les LQ calculées ont donc été considérées comme acceptables.

La figure 18 présente le chromatogramme observé pour une solution dopée avec une quantité des espèces As correspondante à la LQ vérifiée par le test d'exactitude.



**Figure 18 :** Chromatogramme d'une solution dopée au niveau des LQ (cf. Tableau XXII).

Les LD de cette étude (0,007-0,035 mg kg<sup>-1</sup>) sont relativement proches de celles rapportées par Kolhmeyer *et al.* (2002), Brisbin *et al.* (2002), Karthakeyan et Iyer (2004), Hirata et al (2006) et Mato-Fernandez *et al.* (2007) et meilleures que celles obtenues dans les

travaux de Mattusch *et al.* (1998), Londesborough *et al.* (1999), Fitzpatrick *et al.* (2002) et Karthakeyan (2004).

Quelques études ont estimé des LD inférieures à celles de ces études. (Sloth *et al.*, 2003 ; Sanz *et al.*, 2005b ; Wang *et al.*, 2007). Cependant, les méthodes d'estimation des LD peuvent s'avérer très différentes selon les travaux considérés rendant la comparaison des données délicates.

#### *III. 4. 2. c. Spécificité*

La spécificité est la propriété d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la détermination de la grandeur de l'analyte considéré, avec la garantie que le signal mesuré provient seulement de l'analyte. Cette étude permet de mettre en évidence les éventuels effets de matrice de la méthode interne. Très souvent, la spécificité se fonde sur une absence d'interférences.

Pour tester la spécificité, il faut effectuer  $p$  ( $p \geq 10$ ) ajouts dosés sur des échantillons choisis de façon à couvrir le domaine d'application de la méthode. (AFNOR, 1998) Le principe de la mesure de la spécificité consiste à vérifier que la pente est égale à 1 et que l'ordonnée à l'origine (intersection) est égale à 0. À partir des résultats obtenus (Figure 19), on compare les tests de signification de la pente et de l'intersection des valeurs observées à celles calculées statistiquement (loi de Student), la valeur observée devant être inférieure à la valeur critique pour que le test soit validé. (Tableau XXIII)



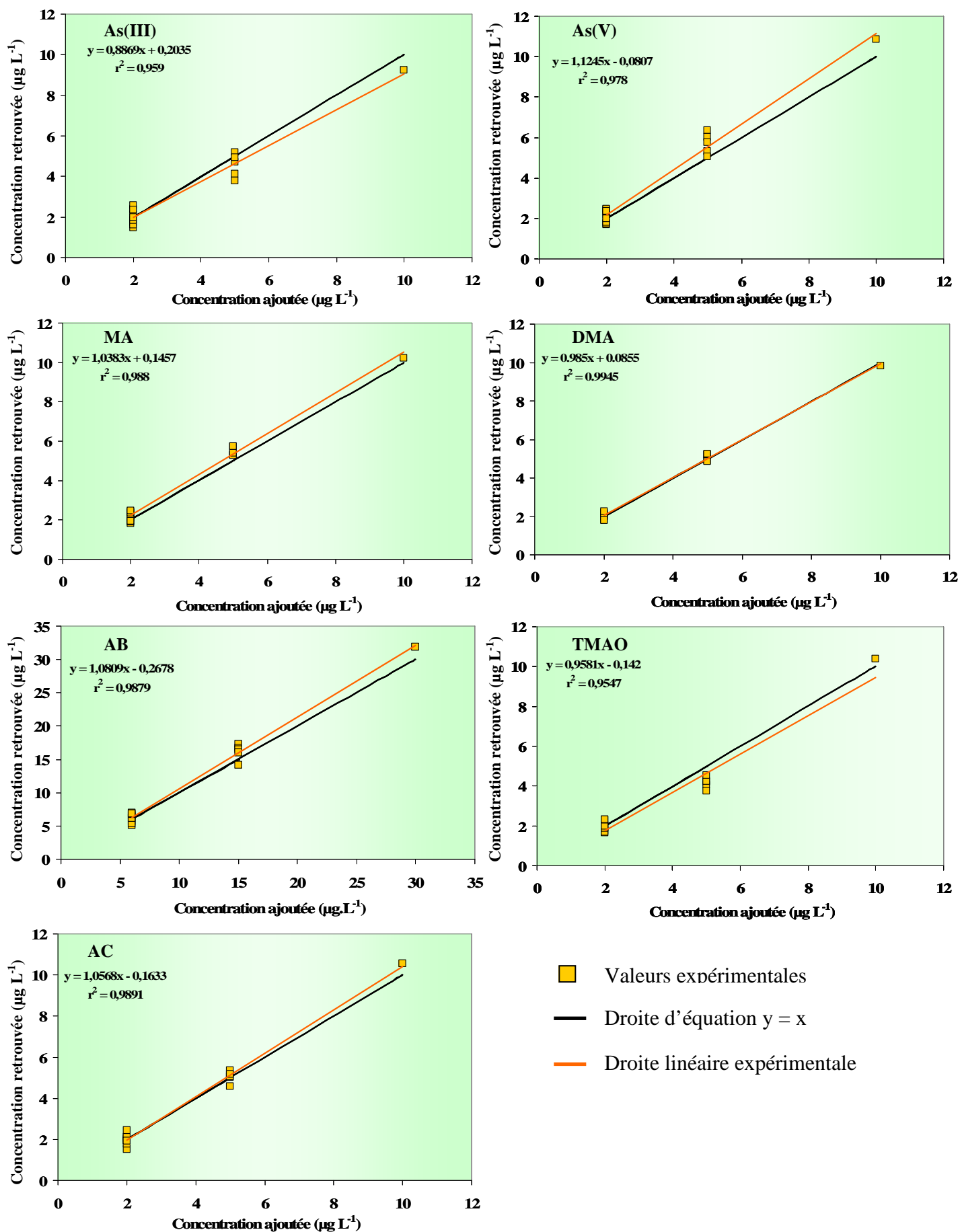


Figure 19 : Étude de la spécificité pour 7 espèces arséniées

**Tableau XXIII :** Évaluation de la spécificité

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2	AC
T <sub>valeur critique</sub>	3,012	3,012	3,012	3,012	3,012	3,012	3,012
T <sub>observée (pente ≠ 1)</sub>	2,213	1,205	0,739	2,658	0,488	0,724	1,849
T <sub>observée (ordonnée à l'origine ≠ 0)</sub>	0,954	1,100	1,013	0,413	0,866	0,588	1,275

Dans toutes les matrices étudiées, les tests de signification de la pente et de l'intersection ont été inférieurs aux valeurs critiques lues dans la table de Student, concluant à une absence d'interférences matricielles pour tous les éléments d'intérêt. La spécificité de la méthode est donc estimée acceptable, confirmant, notamment, les conclusions précédentes (cf. II. 6. 4.) sur l'influence peu significative de l'interférence  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  sur la quantification de AB.

#### III. 4. 2. d. Justesse

La justesse correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée. (AFNOR, 1998) Les critères de justesse ont été établis à l'aide de matériaux de référence certifiés (MRC) dont l'utilisation est décrite dans la norme FD V 03-115. (AFNOR, 1996)

Les tests de justesse ont donc été établis en réalisant 5 essais différents de plusieurs MRC. En l'absence de teneurs certifiées en certaines espèces, la justesse a été évaluée par la récupération d'ajouts de quantités connues (6, 15, 30  $\mu\text{g As L}^{-1}$  pour AB et 2, 5 et 10  $\mu\text{g As L}^{-1}$  pour les autres espèces) réalisés sur des échantillons avant la procédure d'extraction. L'objectif est de s'assurer que les teneurs mesurées par ICP-MS ne sont pas significativement différentes des valeurs définies dans le MRC ou l'échantillon dopé. Pour cela, un intervalle de confiance (IC) a été défini à partir d'une estimation arbitraire du  $\text{CV}_R$  (cf. III. 4. 2. f). L'intervalle de confiance autour de la valeur de référence est calculé alors selon l'expression

suivante :  $IC = M \pm \left( k \times \frac{\text{CV}_R \times M}{100 \times \sqrt{n}} \right)$  (avec IC : intervalle de confiance, M : valeur de référence

de la teneur en élément contenu dans le matériau de référence, k : facteur d'élargissement choisi égal à 3 pour un niveau de confiance de 99 %,  $\text{CV}_R$  : coefficient de variation de reproductibilité intra-laboratoire estimé arbitrairement à 10 %, n : nombre de répétitions de l'analyse du matériau de référence. Les résultats sont présentés dans le tableau XXIV.

**Tableau XXIV :** Évaluation de la justesse

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AB*	TMAO +AB2	AC	As total
Récupération teneurs certifiées (%)**			103		102-125			84-108
Récupération ajouts dosés (%)								
2 µg As L <sup>-1</sup> (n = 9)	100	109	102	106	100	98	99	
5 µg As L <sup>-1</sup> (n = 5)	91	110	102	114	109	83	101	
10 µg As L <sup>-1</sup> (n = 1)	82	102	98	109	105	104	105	
<b>Moyenne</b>	<b>93</b>	<b>107</b>	<b>101</b>	<b>109</b>	<b>104</b>	<b>96</b>	<b>101</b>	

\* Ajouts de 6, 15 et 30 µg As L<sup>-1</sup>, \*\* (cf. Tableau XVII)

Les résultats des différentes études ont montré que les écarts entre les teneurs obtenues et les valeurs de référence des MRC ou des ajouts sont compris dans les IC définis. La justesse de la méthode analytique a donc été estimée acceptable.

#### III. 4. 2. e. Répétabilité

La répétabilité est définie comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus sur des essais indépendants entre eux, dans des conditions aussi stables que possible, à de courts intervalles de temps, effectués dans un même laboratoire, par un même opérateur utilisant le même équipement et la même méthode, sur un matériau identique. Pour tester la répétabilité de la méthode, il faut analyser plusieurs échantillons au moins en double. Les résultats obtenus permettent de définir le coefficient de variation de répétabilité moyen ( $CV_r$ ), représentant l'écart entre des deux essais sur un même échantillon. La vérification de la stabilité de la répétabilité s'effectue au moyen du test de Cochran. (AFNOR, 1998) L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau XXV. Le nombre de teneurs quantifiables pour AC et TMA<sup>+</sup> étant très limité, le  $CV_r$  de ces 2 espèces n'a pu être estimé. Pour les autres espèces, le coefficient de répétabilité moyen a été estimé en analysant différents produits de la pêche à différentes teneurs comprises dans le domaine de linéarité ( $p = 8; n = 5$ ), tel que :

$$CV_r = 100 \times \sqrt{s_r^2 / Xf}$$

(avec  $Xf$  : moyenne des valeurs observées et  $s_r^2$  : variance de répétabilité).

**Tableau XXV :** Évaluation de la répétabilité et test de Cochran

		As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2
Répétabilité	CV <sub>r</sub>	7,5	6,6	5,9	6,3	3,5	5,0
Test de Cochran	Max (s) ou Log max(s) <sup>2</sup>	0,4468	0,3583	0,3113	0,4114	0,3466	0,3913
	Valeur critique	0,7940	0,7940	0,7940	0,7940	0,7940	0,7940

Les CV<sub>r</sub> estimés sont compris entre 3,5 et 7,5 % pour l'ensemble des espèces. Pour les espèces As considérées, le test de Cochran a montré que les variances pour l'ensemble des matrices étudiées étaient homogènes avec max (s)<sup>2</sup> ou log max (s)<sup>2</sup> inférieur à la valeur critique. La répétabilité des mesures a donc été considérée comme acceptable pour l'ensemble des espèces As considérées.

#### III. 4. 2. f. Reproductibilité interne

La reproductibilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus sur des essais indépendants entre eux pour une même méthode d'analyse, dans des conditions fortement variables (contrairement à la répétabilité) à des jours différents, dans différents laboratoires, par différents opérateurs utilisant un équipement différent. (AFNOR, 1998) La répétabilité et la reproductibilité sont donc deux critères extrêmes, le premier mesurant la variabilité minimale des résultats et le second, la maximale. Le calcul de la reproductibilité est identique à celui de la répétabilité, mais la moyenne est calculée sur un plus grand nombre d'essais répartis sur un intervalle de temps plus grand.

Dans notre étude, tous les tests ont été réalisés au laboratoire par la même personne sur le même appareil, et n'ont pu être poursuivis que sur un intervalle de 2 mois. La reproductibilité n'a donc pas pu être établie selon les exigences définies ci-dessus.

Néanmoins, le coefficient de reproductibilité moyen (CV<sub>R</sub>) a été estimé partiellement, en analysant 10 échantillons différents sur 3 jours différents, selon l'expression suivante :

$$CV_R = 100 \times \sqrt{\frac{s^2_L + s^2_r}{Xf}}$$

Avec  $Xf$  moyennes des valeurs observées,

$s^2_L$  est la variance qui mesure les variations dues à l'échantillon

$s^2_r$  est la variance de répétabilité

Au cours de cette étude préliminaire, les  $CV_R$  ont été estimés à 16, 13, 8, 14, 8 et 13 % pour As(III), MA, DMA, As(V), AB et TMAO, respectivement. (Article III, Annexe 4) Une fois de plus, le nombre de teneurs quantifiables pour AC et TMA<sup>+</sup> étant très limité, le  $CV_R$  de ces 2 espèces n'a pu être estimé. À noter que les  $CV_R$  obtenus sont comparables au  $CV_R$  fixé à 10 % pour évaluer la justesse et les taux de récupération.

Une fois l'étude finalisée sur le long terme et les  $CV_R$  correctement estimés, ils pourront être utilisés à la fois pour estimer les intervalles de confiance pour l'évaluation des contrôles qualité interne (CQI) et pour le calcul des incertitudes autour d'un résultat selon l'expression suivante :

$$\text{Incertitudes} = (k \times X_f \times CV_R) / (100 \times \sqrt{n})$$

Par exemple, pour un  $CV_R$  de 10% et pour une probabilité  $p = 0,95$  ( $k = 2$ ), l'incertitude sera de 20 % autour du résultat affiché pour une mesure ( $n = 1$ ) et de 14% si les mesures sont faites en double ( $n = 2$ ).

### III. 5. Applications de la méthode de spéciation

#### III. 5. 1. Échantillons de produits de la pêche non dégraissés

Afin de s'assurer que la méthode de spéciation est applicable à l'analyse d'échantillons réels, 5 échantillons de produits de la pêche, provenant de l'étude CALIPSO (Leblanc *et al.*, 2006), lyophilisés mais non dégraissés (contrairement aux MRC étudiés (cf. III.3.1.b)), ont été testés. Le tableau XXVI présente la somme des teneurs des composés arséniés d'intérêt, la somme des teneurs estimées pour les composés inconnus, la teneur en As total quantifiée directement par ICP-MS après MAE, la teneur en As total obtenue après minéralisation par la méthode interne accréditée COFRAC (Noël *et al.*, 2005) ainsi que les taux de récupération (%) observés pour ces 5 produits de la pêche après MAE.

**Tableau XXVI :** Résultats dans des produits de la pêche (n = 5)

Échantillons	$\Sigma$ composés As <sup>a</sup>	Composés inconnus <sup>b</sup>	As total (après MAE) <sup>c</sup>	As total (après minéralisation) <sup>d</sup>	Taux de récupération (%) <sup>e</sup>
Moule	9,47 ± 0,85*	0,60 ± 0,05	11,1 ± 1,0	12,2 ± 1,1	91
Dorade	10,4 ± 0,9	-	9,53 ± 0,85	10,4 ± 0,9	92
Bigorneau	13,3 ± 1,1	5,03 ± 0,45	19,7 ± 1,8	21,5 ± 1,9	92
Maquereau	8,78 ± 0,78	-	9,16 ± 0,82	9,67 ± 0,86	95
Maquereau en conserve	1,25 ± 0,11	0,19 ± 0,02	1,91 ± 0,17	2,21 ± 0,20	87

a Somme des teneurs des composés As d'intérêt, b Somme des teneurs des composés inconnus, c Teneur en As total après MAE, d Teneur As total après minéralisation selon la méthode interne accréditée (Noël *et al.*, 2005), e Taux de récupération en As total = c/d × 100; \* ± incertitude (k = 2, CV<sub>R</sub> = 10 %)

Tout d'abord, la somme des teneurs des composés As extraits, séparés et quantifiés par la méthode de spéciation est généralement similaire à la quantité d'As total extraite, sauf celle pour l'échantillon de bigorneau. Mais cette différence peut s'expliquer par la présence d'un pic inconnu entre les pics As(V) et AB, dont la teneur a été estimée (en utilisant le standard AB) à environ 5 mg kg<sup>-1</sup>. Enfin, il apparaît que le taux de récupération, compris entre 87 et 95 %, est satisfaisant pour chacun des 5 échantillons testés. La méthode semble donc adaptée à l'analyse d'échantillons réels non dégraissés. Néanmoins, d'autres échantillons, notamment des poissons gras, devront être testés, afin de s'assurer que les taux de récupération restent toujours satisfaisants.

### III. 5. 2. Échantillons aqueux

Bien que cette méthode n'ait pas été développée pour des applications sur des matrices aqueuses, nous l'avons testée sur des échantillons fournis par le laboratoire d'étude et de recherches en hydrologie de l'AFSSA-Nancy (AFSSA-LERH). Ces eaux minérales proviennent de plusieurs sources en France et leur prélèvement date de 2 à 7 ans. Par la suite, les échantillons ont été acidifiés pour leur conservation (sauf l'eau Font-Claude). Le tableau XXVII présente les résultats en As total (par le LERH en SAAGH et par la méthode accréditée par ICP-MS (Noël *et al.*, 2005) et en As inorganique (As(III) et As(V)) obtenus par notre méthode validée en III. 4.. Les autres formes As n'ont pas été détectées. Les échantillons ont été dilués au dixième avant analyse pour diminuer l'effet des sels.

**Tableau XXVII :** Teneurs en As dans les échantillons aqueux ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

Origine	Identification	PH	As (III)	As(V)	As (III + V)	As total	As total*
Puy de Dôme (St Sylvestre Pragoulin)	Agnès	1	266	294	560	550 ± 110	815
Puy de Dôme (chatel-Guyon)	Aubignat Ouest	1	45	33	78	98 ± 20	125
Isere (Uriage les Bains)	Sulfureuse	1	464	2	466	411 ± 82	570
Bas-Rhin (Morsbronn les Bains)	Les cuirassiers	1	606	297	903	980 ± 200	1400
Aveyron (Sylvanes)	Font-Claude	6,5	6	29	35	41 ± 8	70

\* teneurs obtenues par le LERH par SAAGH

Les résultats indiquent que les espèces As inorganiques présentent une répartition différente selon l'échantillon considéré. Toutefois, les échantillons étant conservés depuis une longue période, la spéciation observée dans cette étude ne correspond probablement pas à celle initiale. D'autre part, la somme des espèces As inorganiques est généralement proche de la teneur en As total estimée par ICP-MS, confirmant que ces formes sont majoritaires dans ces échantillons. À noter qu'il n'apparaît pas de différence significative entre les teneurs en As inorganiques dans les échantillons dilués et celles dans les échantillons non dilués. En revanche, les phénomènes de dédoublement de pic, décrits dans le chapitre IV, apparaissent lorsque les échantillons non dilués sont dopés avec une solution standard de MA.

Les teneurs en As total obtenues dans cette étude présente une légère sous-estimation avec celles observées par le LERH. Cette sous-estimation pourrait s'expliquer par les différences entre les méthodes utilisées et par la durée de conservation assez longue entre ces 2 analyses. Afin d'affiner l'interprétation, il faudrait prendre en compte les incertitudes associées à ces résultats (non fournis par le LERH).

En conclusion, le résultat de cette étude indique une bonne corrélation entre la méthode de spéciation et la méthode par ICP-MS pour la mesure de l'As total qui est accréditée par le COFRAC depuis 2007. Il pourrait s'avérer intéressant de faire une étude comparative plus exhaustive avec les méthodes utilisées par le LERH sur des échantillons fraîchement prélevés.

## III. 5. 3. Participation à la certification d'un MRC sur un produit de la pêche

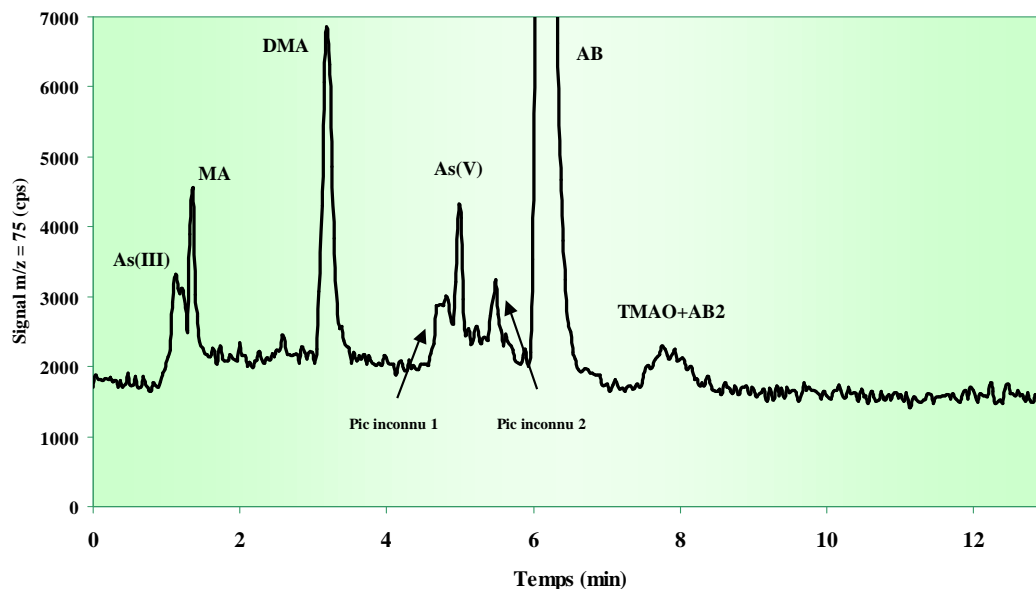
Une fois la méthode de spéciation optimisée et validée, nous avons eu l'opportunité de pouvoir participer à un exercice de certification d'un échantillon de foie d'aiguillat (DOLT 4) organisée par le National Concil Research (NRC) canadien pour effectuer la spéciation de certaines formes arséniées. Le tableau XXVIII présente les teneurs observées ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) pour As(III), MA, DMA, As(V), AB, TMAO+AB2, AC et TMA<sup>+</sup> dans DOLT 4 ( $n = 5$ ).

**Tableau XXVIII :** Teneurs observées en As dans le DOLT 4 ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2	AC	TMA <sup>+</sup>	As total
Moyenne ( $n = 5$ )	0,161	0,113	0,323	0,070	5,77	0,190	< 0,070*	< 0,070	7,82
Incertitude**	0,014	0,010	0,029	0,006	0,52	0,017	-	-	0,70
Médiane (NRC)	0,216	0,054	0,289	0,043	4,75	-	0,013	0,003	8,67
Moyenne(NRC)	0,215	0,060	0,364	0,051	4,81	-	0,013	0,003	8,68
Intervalle de tolérance <sup>a</sup>	0,158-0,272	0,013-0,107	0,201-0,527	0,028-0,074	4,32-5,30	-	0,012-0,014	0,002-0,004	7,86-9,50
Nombre de participants	2	3	10	2	15	-	1	1	10

\* LQ (voir tableau XXII), \*\* ( $k = 2$ ,  $\text{CV}_R = 10\%$ ), <sup>a</sup> moyenne (NRC)  $\pm$  écart-type (NRC)

La figure 20 présente le chromatogramme observé à  $m/z = 75$  de DOLT 4.



**Figure 20 :** Chromatogramme observé à  $m/z = 75$  de DOLT 4



Les teneurs observées pour As(III), DMA et As(V) sont incluses dans les intervalles de tolérance calculés par le NRC. La teneur observée pour TMAO+AB2 ne peut pas être comparée dans la mesure où aucun des participants n'a rapporté de valeurs à la fois pour TMAO et AB2. Les teneurs observées par les participants pour AC et TMA<sup>+</sup> (0,013 et 0,003 mg kg<sup>-1</sup>, respectivement) sont inférieures aux LQ estimées dans nos travaux. Enfin, la teneur observée en As total apparaît légèrement inférieure à l'intervalle de tolérance alors que les teneurs pour As(III) et AB sont supérieures à cet intervalle. Toutefois, ces valeurs sont en accord avec l'intervalle de tolérance si les incertitudes de mesure sont considérées ( $k = 2$ ,  $CV_R = 10\%$ ).

En ce qui concerne AB, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la surestimation observée. Tout d'abord, les valeurs obtenues dans ces travaux tiennent compte du facteur d'humidité de l'échantillon DOLT 4. Toutefois, les résultats envoyés par le NRC ne précisent pas si les autres participants ont aussi tenu compte de ce facteur dans leurs résultats. Sans cette correction de l'humidité, la teneur obtenue pour AB ( $5,45 \pm 0,49$  mg kg<sup>-1</sup>) est plus proche de l'intervalle de tolérance des résultats de la certification. D'autre part, le MRC d'aiguillat DORM 2 a été utilisé comme contrôle qualité interne lors de cette certification. Il s'est avéré que les valeurs en AB les plus proches de la valeur certifiée étaient observées après une dilution au 10<sup>ème</sup> de cet échantillon. Le tableau XXIX présente les résultats obtenus pour AB dans le DORM 2 et le DOLT 4 avec ou sans une dilution au 10<sup>ème</sup> des échantillons extraits.

**Tableau XXIX :** Teneurs en AB obtenues dans le DORM 2 et le DOLT 4 avec ou sans dilution.

	DORM 2		DOLT 4	
	Dilution au 10 <sup>ème</sup>	Sans dilution	Dilution au 10 <sup>ème</sup>	Sans dilution
Moyenne (n = 5)	18,1	16,4	5,77	5,48
Incertitude*	1,6	1,5	0,52	0,49
Médiane (NRC)	16,0	16,0	4,75	4,75
Moyenne (NRC)	15,9	15,9	4,81	4,81
Ecart-type (NRC)	1,4	1,4	0,49	0,49
Intervalle de tolérance <sup>a</sup>	14,5-17,3	14,5-17,3	4,32-5,30	4,32-5,30
Nombre de participants	15	15	15	15

\* ( $k = 2$ ,  $CV_R = 10\%$ ), a moyenne (NRC)  $\pm$  écart-type (NRC)

Une diminution relative des teneurs en AB dans les 2 échantillons peut être observée après dilution au 10<sup>ème</sup>. La teneur dans le DOLT 4 après dilution s'avère plus proche de l'intervalle de tolérance des résultats de la certification. Néanmoins, ce phénomène ne peut pas être attribué à la présence de chlore (entraînant l'apparition de l'interférence  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ ) dans la mesure où aucun signal significatif n'a été observé à  $m/z = 77$  ( $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ ). D'autre part, l'AB utilisé pour la préparation des solutions standard pourrait aussi être remis en cause. En effet, Narukawa *et al.* (2006) a montré qu'une différence de concentration en AB de près de 15 % pouvait être observée entre deux fournisseurs différents. Une comparaison de l'AB utilisé dans ces travaux de thèse, avec la solution de AB BCR CRM 626 préconisée par Narukawa *et al.* (2006), sera envisagée dès réception de ce standard. La surestimation de la teneur en AB observée pourrait aussi être due à une dérive de la pente de la courbe d'étalonnage. En effet, même si un point de milieu de la gamme est contrôlé tous les 5 échantillons durant la séquence analytique, il serait souhaitable de réaliser un contrôle supplémentaire d'un point haut de la gamme susceptible de mieux détecter une éventuelle dérive de la pente. Enfin, de fortes quantités de sels dans les échantillons non dilués pourraient engendrer une interférence non-spectroscopique entraînant une exaltation du signal de l'As. L'ajout d'un étalon interne à l'effluent de la colonne pourrait compenser cet effet.

En conclusion, cet exercice d'inter-comparaison a montré que la méthode de spéciation permet généralement d'obtenir des résultats comparables à ceux rapportés par les autres participants. Néanmoins, cette étude permet aussi de mieux cibler les éventuelles limites de la méthode de spéciation et d'engager les actions correctives pour l'améliorer.

## CONCLUSIONS DE LA PARTIE III

La mise en solution des espèces As dans les matrices biologiques est primordiale. Après étude bibliographique, nous avons choisi de tester la méthode d'extraction assistée par micro-ondes (MAE) décrite, depuis quelques années, comme une méthode permettant de parvenir à des taux satisfaisants de récupération de l'As total et des espèces As sans modification des composés initialement présents dans les matrices. De plus, cette approche est apparue comme relativement simple, robuste et particulièrement rapide en comparaison des autres méthodes d'extraction décrites dans la littérature.

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de plusieurs paramètres susceptibles d'avoir une influence sur les taux de récupération de l'As total dans des produits de la pêche. Ces travaux ont montré, dans le domaine d'étude considéré, que la composition du solvant était le paramètre prépondérant sur l'efficacité de l'extraction.

Par la suite, les résultats pour les 2 compositions de solvant présentant les meilleurs taux de récupération (100% H<sub>2</sub>O et 80 % MeOH) ont été comparés pour plusieurs MRC produits de la pêche. Nous en avons conclu qu'une extraction assistée par micro-ondes associée à un solvant uniquement aqueux permettait une extraction satisfaisante de l'As total mais aussi des différentes espèces As dans les produits de la pêche testés, tout en étant la plus adaptée à une détection par ICP-MS. En effet, ces conditions permettent d'éviter d'introduire une importante quantité de carbone susceptible de se déposer sur les cônes et de perturber la stabilité et la sensibilité du détecteur. (Beauchemin, 1989)

Enfin, l'évaluation des performances analytiques de la méthode a permis de démontrer que les conditions d'extraction et de séparation optimales déterminées étaient satisfaisantes et applicables à la spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche mais également à des matrices aqueuses. Cette évaluation pourra être confirmée par les résultats de la certification d'un échantillon de foie d'aiguillat organisée par le NRC canadien à laquelle nous avons participé.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication soumise en novembre 2008 au journal « Analytica Chimica Acta ». (Annexe 4)

## **PARTIE IV.**

### **ÉTUDE DE LA BIOACCESSIBILITE DE L'ARSENIC : MÉTHODE DE LIXIVIATION EN CONTINU ET SPÉCIATION PAR COUPLAGE HPLC/ICP-MS**

## IV. 1. Introduction

La quatrième partie de cette étude a consisté en la mise au point d'une méthode pour l'évaluation de la bioaccessibilité maximale (c'est-à-dire le pire scénario possible) de l'As total et des différentes formes arséniées dans les produits de la pêche, en combinant une technique de lixiviation en ligne et la méthode de spéciation par couplage IEC/ICP-MS décrite dans les parties précédentes de ces travaux.

L'optimisation de la méthode a été réalisée au cours d'un séjour de 6 mois au sein de l'équipe du Professeur Diane Beauchemin, dans le département de chimie de la Queen's University de Kingston, Ontario, Canada. Les données, présentées dans l'article II correspondent aux résultats obtenus avec l'instrumentation canadienne alors que ceux obtenus ultérieurement en France, dans le laboratoire de l'unité CIME de l'AFSSA-LERQAP, Maisons Alfort, France, ont été rapportés dans l'article III (Annexe 4).

Nous commencerons par définir les notions de biodisponibilité et de bioaccessibilité de l'As et nous exposerons l'état de l'art des méthodes *in vivo* et *in vitro* utilisées pour les évaluer. Par la suite, les résultats obtenus avec cette méthode en As total sur des produits de la pêche seront comparés à ceux obtenus par une méthode de lixiviation classique. Après une étude de l'influence des réactifs de digestion sur la séparation, nous détaillerons les teneurs des espèces As libérées dans les lixiviats des produits de la pêche. Enfin, celles-ci seront discutées et comparées à celles rapportées dans la partie III après extraction assistée par micro-onde (MAE).

## IV. 2. Bioaccessibilité et biodisponibilité de l'arsenic : état de l'art

Les études sur la toxicité des contaminants dans les aliments ont montré que les risques sanitaires ne correspondaient pas de manière systématique aux doses d'exposition mesurées. (Caussy, 2003) En effet, ces mesures, focalisées sur les teneurs totales des contaminants présents dans les échantillons, ne fournissent pas d'informations sur leur biodisponibilité qui permet une meilleure évaluation des risques liés à la consommation de ces produits. Certains aliments contenant de fortes teneurs en As peuvent donc être déclarés impropres à la consommation alors que l'As présent initialement n'est peut être pas libéré de manière significative pendant la digestion gastro-intestinale.

#### IV. 2. 1. Biodisponibilité et méthodes *in vivo*

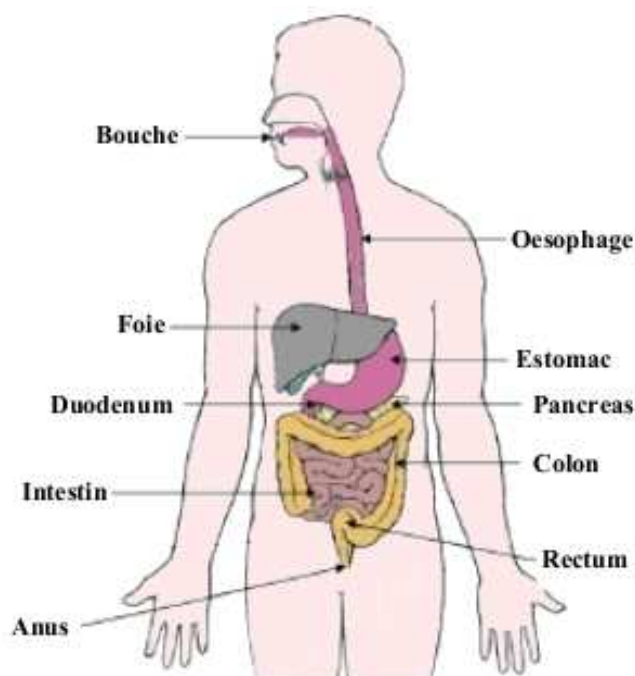
La biodisponibilité est définie comme la fraction d'un analyte susceptible d'être absorbée du système gastro-intestinal vers la circulation systémique pour être redistribuée dans l'organisme. (Ruby *et al.*, 1996 ; Rodriguez *et al.*, 1999) L'évaluation de la biodisponibilité implique l'étude de modèles animaux vivants (ou *in vivo*). Généralement, la biodisponibilité est déterminée en dosant la fraction d'analyte absorbée par l'organisme de l'animal après lui en avoir préalablement administré une quantité connue. Deux revues récentes détaillent l'ensemble des travaux *in vivo* pour l'évaluation de la biodisponibilité de divers composés (Caussy *et al.*, 2003) et pour l'arsenic spécifiquement (Caussy, 2003). Des essais *in vivo* sur des lapins, (Davis *et al.*, 1992) des singes, (Freeman *et al.*, 1995) des rats (Ng *et al.*, 1998) et des porcs (Lorenza *et al.*, 1996 ; Casteel *et al.*, 1998 ; Juhasz *et al.*, 2007a et 2008a) ont été rapportés pour évaluer la biodisponibilité de l'As dans les sols. Le porcelet est un modèle de choix pour ces études dans la mesure où son métabolisme se rapproche le plus de celui de l'homme. D'autre part, son rapport taille/poids est comparable à celui d'un « enfant » (catégorie d'âge le plus susceptible d'ingérer accidentellement des sols contaminés en As).

Néanmoins, l'utilisation de l'expérimentation animale s'avère très coûteuse, nécessite de plusieurs mois à plusieurs années d'études et demeure complexe à mettre en œuvre. D'autre part, certains modèles animaux, comme le rat ou la souris, ne permettent pas une représentation assez proche du métabolisme humain.

Enfin, il semble que la biodisponibilité de l'As total et des espèces inorganiques dans les aliments ait été très rarement évaluée. (Caussy, 2003) Un rapport ancien de l'agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA) a montré que la part des espèces inorganiques bioaccessibles contenue dans les aliments serait fortement biodisponible. (USEPA, 1984) Plus récemment, la biodisponibilité de l'As estimée dans les légumes serait comprise entre 50 et 100 %, selon les matrices. (Juhasz *et al.*, 2008b) Alors que la biodisponibilité de l'arsenic (89 %) dans un riz contenant de fortes teneurs en espèces As inorganiques serait plus importante que celle estimée dans un riz contenant principalement du DMA (33 %). (Juhasz *et al.*, 2006)

IV. 2. 2. Bioaccessibilité et méthodes *in vitro*

Pour se soustraire à ces difficultés associées aux essais *in vivo* utilisés pour évaluer la biodisponibilité, le concept de bioaccessibilité a été introduit. (Ruby *et al.*, 1996 ; Rodriguez *et al.*, 1999) Celle-ci représente la quantité d'un composé, dans une matrice ingérée, qui est libérée sous forme liquide au sein de l'appareil gastro-intestinal, et donc, qui se rend disponible pour le processus d'absorption de la muqueuse intestinale vers le réseau sanguin. (Koch *et al.*, 2007a ; Intavongse et Dean, 2006) Cette définition ne prend en compte qu'une ingestion directe de la matrice considérée et néglige les interactions éventuelles avec la peau ou les poumons. La notion de bioaccessibilité se réfère spécifiquement aux méthodes *in vitro* tentant de simuler la température, l'agitation, le pH et/ou les conditions chimiques et enzymatiques existantes dans l'organisme humain durant la digestion gastro-intestinale. (Koch *et al.*, 2007a ; Juhasz *et al.*, 2007b) Les processus de deux (ou trois) zones distinctes de l'appareil digestif humain (Figure 21) sont généralement simulés : il s'agit de la bouche, de l'estomac et de l'intestin. La majorité des études considère que la salive a une influence négligeable sur le bioaccessibilité des contaminants, et donc, se limitent généralement à la simulation des sucs gastro-intestinaux sans inclure d'interactions avec la salive. (Intavongse et Dean, 2006)



**Figure 21** : Schéma de l'appareil digestif humain

Une telle méthode a été testée initialement par Miller *et al.* (1981) pour évaluer la bioaccessibilité, et donc indirectement la biodisponibilité, du fer dans les aliments pour des études nutritionnelles. Bien plus tard, une méthode similaire fut utilisée par Ruby *et al.* (1996) pour l'évaluation de la bioaccessibilité du plomb et de l'As dans les sols. Depuis une quinzaine d'années, de nombreuses méthodes *in vitro* ont été développées pour l'évaluation de la bioaccessibilité de plusieurs éléments dans diverses matrices environnementales ou alimentaires contaminées. (Intawongse et Dean, 2006)

La revue de Intawongse et Dean (2006) a exposé ces différentes approches disponibles et a recensé les facteurs importants susceptibles d'avoir une influence sur les résultats tels que :

- la température : généralement maintenue à la température normale de l'organisme humain (37 °C) ;
- le ratio entre le volume et la prise d'essai ;
- le temps d'incubation et d'agitation ;
- l'ajout de composés alimentaires supplémentaires (pour une simulation de la digestion plus représentative de la réalité) ;
- la composition des fluides gastro-intestinaux : pH (le pH de l'estomac varie selon le régime alimentaire de la personne (végétarienne ou consommatrice de viande) et selon la période de digestion (à jeun ou non)), sels, présence d'enzymes ;
- la méthode de récupération de chaque phase de la digestion (salive, suc gastrique et intestinal) ;
- la méthode de détection (SAA, ICP-AES ou ICP-MS).

Et nous pourrions ajouter à cette liste un autre facteur influent à nos yeux, à savoir que la méthode utilisée soit bien maîtrisée, validée et encadrée par des contrôles qualité interne (CQI) pertinents.

L'étude comparative de Juhasz *et al.* (2007a) a montré que les résultats des méthodes *in vivo* et *in vitro* étaient corrélés pour l'évaluation de la biodisponibilité de l'As dans des sols contaminés. D'autre part, ces méthodes *in vitro*, infiniment moins coûteuses et plus rapides, offrent aussi l'avantage d'une bonne reproductibilité dans la mesure où il est possible de mieux contrôler les conditions opératoires que pour les tests *in vivo*. (Laparra *et al.*, 2003) Néanmoins, la diversité des procédures rapportées dans la littérature peut engendrer un ensemble de résultats très variables. (Chu *et al.*, 2004)

L'ensemble des études *in vitro* évaluant la bioaccessibilité de l'As dans des matrices environnementales est présenté dans le tableau XXX.



**Tableau XXX :** Études *in vitro* ayant évalué la bioaccessibilité de l'As dans des matrices environnementales

Réactifs utilisés	Technique de détection	Matrices étudiées	Références
Suc gastrique : 1,25 g de pepsine, 0,5 g de citrate de sodium, 0,5 g de malate, 420 µL d'acide lactique, 500 µL d'acide acétique dans 1 L (pH = 1,3 ; 2,5 et 4,0) Suc intestinal : 0,070 g de sels de bile et 0,020 g de pancréatine	ICP-AES	Sols	Ruby <i>et al.</i> (1996)
Suc gastrique : 1,25 g de pepsine, 0,5 g de citrate de sodium, 0,5 g de malate, 420 µL d'acide lactique, 500 µL d'acide acétique dans 1 L à pH 2,5 Suc intestinal : 0,175 g de sels de bile et 0,050 g de pancréatine	ICP-AES	Sols	Williams <i>et al.</i> (1998)
Suc gastrique : 1 % de pepsine dans 0,15 M de NaCl Suc intestinal : 2,10 g d'extrait de bile et 0,21 g de pancréatine	HG-ICP-AES	Sols contaminés et déchets	Rodriguez <i>et al.</i> (1999)
Suc gastrique : 1 % de pepsine, 0,15 M de NaCl dans HCl (pH = 1,8) Suc intestinal : 0,525 g d'extrait de bile et 52,5 g de pancréatine dans NaHCO <sub>3</sub> (pH = 7)	GFSAA	Sols	Sarkar et Datta (2003)
Suc gastrique : 1,25 g de pepsine, 0,5 g de citrate de sodium, 0,5 g de malate, 420 µL d'acide lactique, 500 µL d'acide acétique dans 1 L (pH = 1,3 ; 2,5 et 4,0) Suc intestinal : 0,070 g de sels de bile et 0,020 g de pancréatine	ICP-MS	Poussières	Rieuwerts <i>et al.</i> (2006)
Suc gastrique : 1 % de pepsine, 0,15 M de NaCl dans HCl (pH = 1,8) Suc intestinal : 0,525 g d'extrait de bile et 52,5 g de pancréatine dans NaHCO <sub>3</sub> (pH = 7)	GFSAA	Sols	Datta <i>et al.</i> (2006)
Suc gastrique : 1 % de pepsine, 0,15 M de NaCl dans HCl (pH = 1,5) Suc intestinal : 0,525 g d'extrait de bile et 52,5 g de pancréatine dans NaHCO <sub>3</sub> (pH = 7)	ICP-MS ICP-AES	Sols	Tang <i>et al.</i> (2007)
Suc gastrique : 30,03 g L <sup>-1</sup> de glycine dans HCl concentré (pH 1,5)	ICP-MS	Sols	Juhasz <i>et al.</i> (2007ab)
Suc gastrique : 1,25 g L <sup>-1</sup> de pepsine et 8,77 g L <sup>-1</sup> de NaCl dans HCl (pH = 1,8) Suc gastrique : 30,03 g L <sup>-1</sup> de glycine dans HCl concentré (pH 1,5)	HPLC/ICP-MS ICP-MS	Plantes Sols	Mir <i>et al.</i> (2007) Smith <i>et al.</i> (2008)
Suc gastrique : 1 g de pepsine dans 10 mL de HCl (0,1 M) pH = 2 Suc intestinal : 0,2 g de pancréatine et 1,25 g d'extrait de bile dans 50 mL de NaHCO <sub>3</sub> (0,1 M)	SAA	Algues	Laparra <i>et al.</i> (2003)
Suc gastrique : 1 g de pepsine dans 10 mL de HCl (0,1 M) pH = 2 Suc intestinal : 0,2 g de pancréatine et 1,25 g d'extrait de bile dans 50 mL de NaHCO <sub>3</sub> (0,1 M)	HPLC-HG-AFS et SAA	Algues	Almela <i>et al.</i> (2005)
Suc gastrique : 1 g de pepsine dans 10 mL de HCl (0,1 M) pH = 2 Suc intestinal : 0,2 g de pancréatine et 1,25 g d'extrait de bile dans 50 mL de NaHCO <sub>3</sub> (0,1 M)	HG-SAA et HPLC/ HG-SAA	Riz	Laparra <i>et al.</i> (2005)
Suc gastrique : 30,03 g L <sup>-1</sup> de glycine dans HCl concentré (pH 1,5)	HPLC-HG-AAS	Palourdes et algues	Koch <i>et al.</i> (2007a)
Suc gastrique : 1,25 g L <sup>-1</sup> de pepsine, 0,25 g L <sup>-1</sup> de citrate de sodium, 0,5 g L <sup>-1</sup> d'acide malique, 1 mL L <sup>-1</sup> d'acide acétique et 0,15 M NaCl dans HCl (pH = 1,65) Suc intestinal : 17,5 mg mL <sup>-1</sup> de sels de bile et 5 g mL <sup>-1</sup> de pancréatine dans Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH = 7)	HG-SAA et HPLC/ICP-MS	Médicaments	Koch <i>et al.</i> (2007b)
Suc gastrique : 1,25 g L <sup>-1</sup> de pepsine et 0,15 M NaCl dans HCl (pH = 1,8)	ICP-MS et HPLC/ICP-MS	Médicaments	Koch <i>et al.</i> (2007b)
Suc gastrique : 0,4 M de glycine dans HCl (pH = 1,4)	ICP-MS et HPLC/ICP-MS	Médicaments	Koch <i>et al.</i> (2007b)

La majorité des recherches se sont focalisées sur l'évaluation de la bioaccessibilité de l'As dans les sols contaminés (Ruby *et al.*, 1996 ; Williams *et al.*, 1998 ; Rodriguez *et al.*, 1999 ; Sarkar et Datta, 2003 ; Rieuwerts *et al.*, 2006 ; Datta *et al.*, 2006 ; Tang *et al.*, 2007 ; Juhasz *et al.*, 2007a et b ; Mir *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2008). À l'opposé, la bioaccessibilité de l'As dans les produits de la pêche, et plus généralement dans les matrices alimentaires, a très peu été évaluée, à l'exception de trois études dans les algues, (Laparra *et al.*, 2003 ; Almela *et al.*, 2005 ; Koch *et al.*, 2007a) d'une dans les palourdes (Koch *et al.*, 2007a) et d'une dans le riz (Laparra *et al.*, 2005). Enfin, il est important de signaler qu'aucune étude recensée dans le tableau XXX ne s'est intéressée aux effets de la salive.

D'autre part, beaucoup de modèles *in-vitro* qui évaluent la bioaccessibilité de l'As impliquent une approche statique qui ne permet pas d'acquérir des données en temps réel sur la quantité d'arsenic libérée puisque toutes les mesures sont réalisées après l'extraction avec les fluides gastro-intestinaux. Ce n'est que récemment qu'une méthode de détermination en ligne et en continu par ICP-MS de la bioaccessibilité du plomb et du zinc dans un échantillon de son de maïs a été développée. (Chu et Beauchemin, 2004) Dans un premier temps, un dispositif par injection en flux continu (FI) de réactifs (salive, suc gastrique et suc intestinal artificiels) pompés à travers une mini-colonne d'échantillon d'aliments a été employé. (Chu et Beauchemin, 2004) Dans un second temps, ce dispositif a été remplacé par un pompage en continu des réactifs à travers la mini-colonne pour obtenir des profils plus lisses. (Chu et Beauchemin, 2005) Cette approche permet une mesure en temps réel par ICP-MS des éléments libérés par chaque réactif, mais aussi l'acquisition d'informations sur les interactions entre les éléments et la matrice considérés. Ainsi, un pic étroit indiquera que l'élément a été aisément libéré et présentait donc des liaisons faibles avec la matrice alors qu'un profil plus large indiquera, au contraire, une interaction forte entre l'élément et la matrice. (Chu et Beauchemin, 2005) Enfin, la méthode de lixiviation en continu par ICP-MS, en plus d'être simple et rapide à mettre en œuvre, permet de minimiser les éventuelles contaminations durant la préparation de l'échantillon dans la mesure où les étapes de préparation sont restreintes et en système fermé. Cette approche fournit donc une réponse simple et pragmatique à l'évaluation de la bioaccessibilité maximale d'un élément dans une matrice environnementale ou alimentaire donnée pour le pire des scénarii pouvant se produire au cours de la digestion.

#### IV. 2. 3. Bilan de l'état de l'art

Cet état de l'art des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité et bioaccessibilité de l'As a fourni plusieurs informations :

- La bioaccessibilité de l'As est généralement déterminée par des méthodes *in vivo* qui s'avèrent souvent coûteuses et complexes à mettre en œuvre.
- Les méthodes *in vitro*, en simulant les processus de digestion dans l'organisme, permettent la détermination de la quantité d'As libérée dans l'appareil gastro-intestinal correspondant à sa bioaccessibilité. Néanmoins, la grande majorité des études se sont focalisées sur la bioaccessibilité de l'As dans les sols et très peu de travaux se sont intéressés aux produits de la pêche.
- La méthode de lixiviation en continu mise au point précédemment (Chu et Beauchemin, 2005) apparaît comme une approche pragmatique permettant la mesure par ICP-MS en temps réel de la quantité maximale d'un élément donné libérée par chacun des réactifs simulant les fluides gastro-intestinaux.

L'objectif de la suite de l'étude est donc double :

- D'une part, la mise au point d'une méthode simple, rapide et peu coûteuse de lixiviation en continu pour mesurer, en temps réel par ICP-MS, la bioaccessibilité maximale de l'As total dans les produits de la pêche. Cette méthode sera comparée à une méthode statique plus couramment utilisée.
- D'autre part, la combinaison de cette méthode avec la méthode de spéciation développée dans les parties précédentes de ces travaux pour la détermination des espèces arséniées dans les lixiviats recueillis.

#### IV. 3. Conditions expérimentales

Les réactifs et matériels utilisés dans les travaux réalisés au Canada et en France sont détaillés dans l'article II et l'article III (Annexe 4), respectivement.

### IV. 3. 1. Instrumentation

#### *IV. 3. 1. a. Instrumentation pour les travaux réalisés au Canada*

L'ICP-MS utilisé pour cette partie de l'étude est un UltraMass 700, fabriqué et commercialisé par la société *Varian* (Mulgrave, Victoria, Australia). Le système chromatographique utilisé consiste en une chaîne chromatographique DX600/BioLC avec une pompe gradient GS50 (fabriquée et commercialisée par la société *Dionex*) équipée d'une boucle d'injection de 100  $\mu$ L. Les connexions entre l'ICP-MS et le système chromatographique sont identiques à celle décrites dans le paragraphe II. 3. 1.. La colonne chromatographique utilisée est identique à celle décrite en II. 3. 2..

#### *IV. 3. 1. b. Instrumentation pour les travaux réalisés en France*

Les appareils utilisés dans cette étude sont les mêmes que ceux décrits dans la partie III.

### IV. 3. 2. Acquisition des données

#### *IV. 3. 2. a. Acquisition des données pour les travaux réalisés au Canada*

L'acquisition des données pour la lixiviation en continu et la spéciation des lixiviats a été réalisée en mode « temps résolu », 3 points par pic avec un temps de mesure de 10 ms et un espacement de 0,025 amu, aux masses sur charges  $m/z = 75(\text{As})$ ,  $77(\text{ArCl})$ ,  $82(\text{Se})$ . Les données brutes obtenues furent ensuite traitées avec des logiciels internes écrits en *QBASIC* pour le lissage (polynôme de Savitzky et Golay appliqué à chaque fenêtre de 7 points, qui se déplace point par point) et la détermination des aires de pics. D'autre part, le mode continu, aux masses sur charges  $m/z = 75(\text{As})$ ,  $77(\text{ArCl})$ ,  $82(\text{Se})$  avec un temps d'intégration de 10 s, a été utilisé pour la méthode statique et la vérification du bilan en masse.

#### *IV. 3. 2. b. Acquisition des données pour les travaux réalisés en France*

L'acquisition des données pour la lixiviation en continu et la spéciation des lixiviats est identique à celle décrite en II. 3. 2. alors que celle pour la méthode statique et la vérification du bilan en masse est basée sur celle rapportée en II. 3. 4..

#### IV. 3. 3. Échantillons et matériaux de référence certifiés

Les MRC utilisés pour les études canadiennes et françaises, TORT 2 (Hépatopancréas de homard), DORM 2 (muscle d'aiguillat), DOLT 3 (foie d'aiguillat), DORM 3 (protéine de poisson) et CRM 627 (Thon), sont commercialisés par la société Promochem (Molsheim, France).

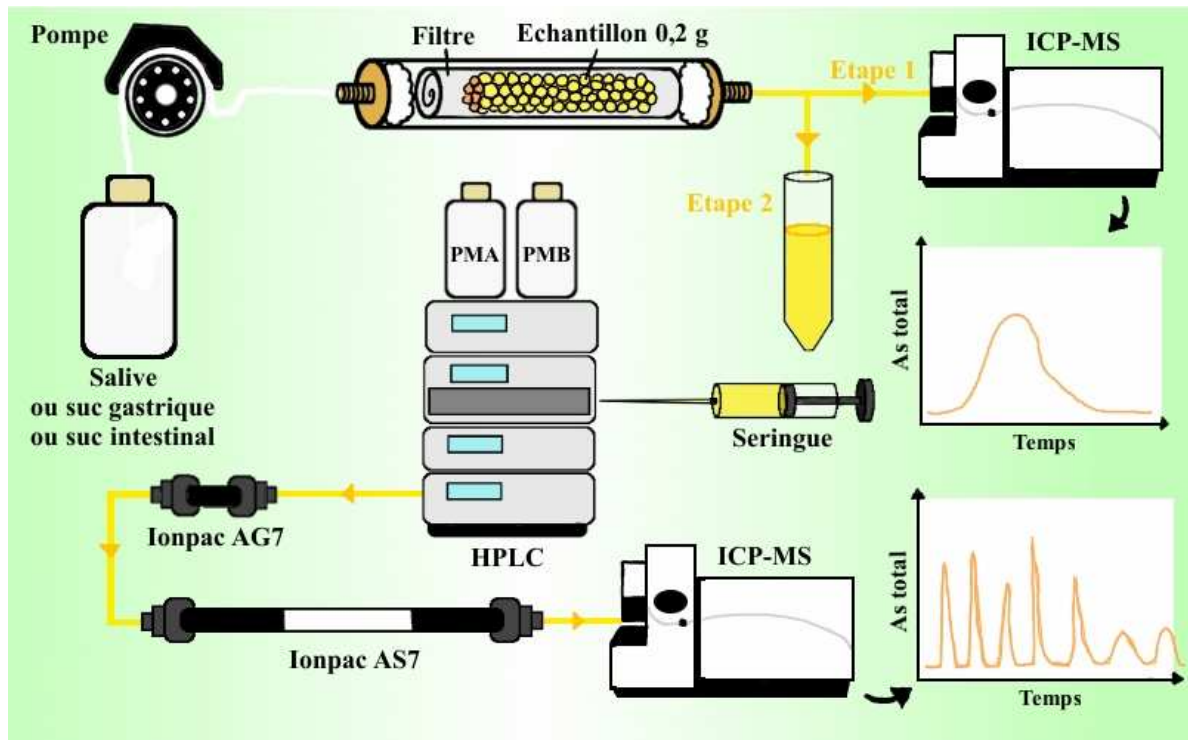
#### IV. 3. 4. Procédure de lixiviation en ligne

Pour les deux études, la procédure de lixiviation en ligne est basée sur les travaux de Chu et Beauchemin (2005). La préparation de la mini-colonne consiste à enrouler environ 200 mg d'échantillons lyophilisés dans un filtre Isopore (0,4 mm, Ø 47 mm) commercialisé par la société *Millipore*, et à introduire le tout dans un tube en PTFE (8 cm de long, 3/16 de diamètre externe et 1/8 de diamètre interne) entre deux morceaux de laine de quartz (sans les tasser pour éviter les phénomènes de surpressions à l'intérieur de la mini-colonne). (Figure 22) La mini-colonne est connectée au nébuliseur de l'ICP-MS par un tuyau en PTFE (0,8 mm de diamètre interne).

Chaque réactif (salive, suc gastrique et intestinal) est préparé selon les recommandations de l'USP XXIII (1995) puis injecté successivement dans la mini-colonne à l'aide d'une pompe péristaltique. Les réactifs et la mini-colonne sont maintenus à 37 °C dans un bain thermostaté. Les temps de lixiviation ont été sélectionnés selon la physiologie humaine (Johnson *et al.*, 1985) : 5 minutes pour la salive et 1 heure (réduit à 20 minutes au final) pour les sucs gastrique et intestinal. En effet, une étude précédente a montré que la quantité d'analyte libérée n'augmentait plus après 20 minutes. (Rodriguez *et al.*, 1999) L'As total libéré est détecté par l'ICP-MS.

Dans un premier temps, le lixiviat est dirigé vers le nébuliseur du système ICP-MS pour être analysé en temps réel en mode temps résolu (TRA) à la masse  $m/z = 75$  (As total). La quantification a été réalisée par calibration externe, par injection répétée de solutions étalons, préparées dans les mêmes conditions que les échantillons, à travers une boucle d'injection de 100 µL. Un blanc, consistant en une mini-colonne contenant uniquement le filtre et les morceaux de laine de quartz, a également été analysé.

Dans un second temps, le lixiviat d'un doublon de l'échantillon est recueilli pour la quantification des espèces As.



**Figure 22 :** Schéma du dispositif de la lixiviation en continu

#### IV. 3. 5. Méthode statique

Par comparaison, une méthode statique a aussi été testée. 200 mg d'échantillon sont placés dans des tubes avec 6 mL de salive ou 24 mL de suc gastrique ou intestinal. Ensuite, les tubes sont agités pendant la même durée que pour la lixiviation en continu à 37 °C et centrifugés. Le surnageant est alors quantifié en mode continu en utilisant des solutions étalons préparées dans les mêmes conditions que les matrices correspondantes. Enfin, le résidu est introduit dans un nouveau tube avec le réactif suivant.

#### IV. 3. 6. Vérification du bilan en masse

##### *IV. 3. 6. a. Procédure pour les travaux réalisés au Canada*

Pour les procédures (statique et de lixiviation continue), les résidus sont recueillis et digérés, dans un mélange de 5 mL HNO<sub>3</sub> et 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxyde d'hydrogène) pendant 4 heures à 50 °C au bain-marie. Ils sont ensuite analysés par ICP-MS à  $m/z = 75$  (As total). Les solutions étalons, préparées dans les mêmes conditions que la matrice, sont utilisées pour la quantification des échantillons digérés en mode continu.

#### *IV. 3. 6. b. Procédure pour les travaux réalisés en France*

La procédure de digestion des résidus, obtenus après les deux procédures (lixiviation en ligne et statique), est identique à celle décrite dans la partie III.

#### *IV. 3. 7. Quantification des espèces arséniées dans les lixiviats*

##### *IV. 3. 7. a. Procédure pour les travaux réalisés au Canada*

Les lixiviats de salive sont collectés, dilués au cinquième, et analysés en se basant sur la méthode de spéciation décrite dans la partie II. Néanmoins, les conditions chromatographiques ont dû être modifiées comme décrites dans l'article II afin de pallier les modifications dans la séparation des espèces arséniées dues à la salive.

Pour l'étalonnage de l'instrument, quatre solutions étalons de 0, 2, 5, 10  $\mu\text{g As L}^{-1}$  des 7 espèces arséniées considérées (As(III), MA, DMA, As(V), AB, TMAO, AC) sont préparées dans les mêmes conditions que les lixiviats. Les résultats pour TMAO sont présentés comme la somme de teneurs en TMAO et AB2. En effet, l'injection d'une solution étalon de AB2 a montré que le pic de cette espèce pouvait co-éluer avec celui de TMAO dans les conditions de séparation utilisées.

##### *IV. 3. 7. b. Procédure pour les travaux réalisés en France*

La procédure utilisée est la même que celle décrite dans la partie III. Néanmoins, une dilution au moins au dixième a été nécessaire pour maintenir une séparation satisfaisante des composés arséniés.

#### **IV. 4. Résultats expérimentaux**

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme de 2 articles, l'un publié dans « Journal of Analytical and Atomic Spectrometry » (Article II) et l'autre soumis dans « Analytica Chimica Acta » (Article III) (Annexe 4).

# A simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry†

Vincent Dufailly,<sup>a</sup> Thierry Guérin,<sup>\*,a</sup> Laurent Noël,<sup>a</sup> Jean-Marc Frémy<sup>b</sup> and Diane Beauchemin<sup>c</sup>

Received 28th February 2008, Accepted 12th May 2008

First published as an Advance Article on the web 8th July 2008

DOI: 10.1039/b803516d

A quick and simple on-line leaching method was used to assess the maximum bio-accessibility of As in seafood samples. Artificial saliva, gastric juice and intestinal juice were successively pumped through a mini-column of sample (maintained at 37 °C in a thermostatically controlled water bath), which is connected to the nebulizer of an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) instrument. In contrast to the usual batch method, this approach allows the continuous monitoring of the progressive release of As by the 3 reagents. Thus, the dissolution equilibrium is driven to the right, thereby enabling the determination of the maximum amount of analyte that can be dissolved (*i.e.* the worst-case scenario). Results for 4 certified reference materials (CRMs) show that saliva alone was sufficient to release, in less than 5 min, all the bio-accessible total As that was mobilised by saliva and gastric juices in the batch mode.

The As speciation in each leachate was then determined by ion-exchange chromatography (IEC) coupled to ICP-MS, after adjustment to the gradient program previously optimised by experimental design, along with a 5-fold sample dilution and increased stabilisation time. Under these optimised conditions, 7 different arsenic species in saliva could be separated within 18 min in a single chromatographic run. In all cases, the sum of bio-accessible and residue As concentrations agreed with the certified value. Bio-accessible speciation results were compared and discussed with those previously reported by different extraction methods in the literature.

## Introduction

Seafood products have been identified as important contributors in human exposure to arsenic (As).<sup>1</sup> Usually, risk assessment for this element taking into consideration exposure through these products is mostly based on total As content. However, toxicity studies have shown that health risks to humans do not always correlate with the external exposure dose of the elements.<sup>2</sup> Indeed, seafood products containing a high level of total arsenic can be declared unsafe, whereas the actual As toxicity depends on its chemical form,<sup>3</sup> and also its bio-availability.<sup>2</sup> The bio-availability of an element, which is largely determined by its ability to be absorbed into the systemic circulation system where it can reach the target organ and exert its toxic effect,<sup>2,4</sup> depends on its bio-accessibility, which is defined as the fraction of the external dose that is released from the environmental matrices in the gastrointestinal tract and becomes available for absorption.<sup>2,5,6</sup>

Although, *in vivo* studies of oral bio-availability, which typically consist in dosing experimental animals<sup>7,8</sup> or humans<sup>9,10</sup> with

various concentrations of arsenic and measuring the responses, are generally considered the most reliable model,<sup>6</sup> they remain very complex, expensive and time-consuming.

On the other hand, the bio-accessibility of arsenic is generally assessed by *in vitro* digestion models in order to approach the predictive availability of metals for humans. Several *in vitro* models for this approach, reviewed by Intawongse *et al.*,<sup>5</sup> have been developed to assess the bio-accessibility of As, but the majority of applications have been to soil samples, a few in seaweeds<sup>11–13</sup> and only one in seafood<sup>11</sup> and one in rice.<sup>14</sup>

Generally, the methods used are batch gastrointestinal models, which mimic processes that occur through the human digestive tract by sequentially exposing samples to simulated gastric and intestinal conditions. However, Oomen *et al.*,<sup>15</sup> while comparing five different *in vitro* gastrointestinal models, showed that the different models led to a wide range of bio-accessibility values. Moreover, many studies limited themselves to simulated gastric and intestinal juices and did not include a reaction with saliva.<sup>11–15</sup> Finally, the absence of real-time data is also another limitation of these models and the scarce dynamic models existing provide only data at specific times.<sup>15,16</sup>

The bio-accessibility of arsenic varies not only with the matrix but also with the chemical species of the analyte.<sup>4</sup> So, the speciation of bio-accessible As in seafood is necessary to precisely identify and quantify the different As species involved in the gastro-intestinal tract processes for a better risk assessment to the consumer.

The majority of speciation methods used high performance liquid chromatography (HPLC) to perform the separation with

<sup>a</sup>Unité des Contaminants Inorganiques et Minéraux de l'Environnement, AFSSA-LERQAP, 23, Avenue du Général de Gaulle, F-94706 Maisons-Alfort Cedex, France. E-mail: t.guerin@afssa.fr

<sup>b</sup>Unité d'Evaluation des Risques Physico-Chimiques, AFSSA-DERNS, 27-31, Avenue du Général Leclerc, F-94701 Maisons-Alfort, France

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Queen's University, 90 Bader Lane, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6

† Presented at the 2008 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Temecula, CA, USA, January 7–12, 2008.



detection by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).<sup>17–22</sup> Indeed, this hyphenation combines a rapid, powerful and reproducible separation method with a very efficient detector which is recognised for its high sensitivity and wide linear dynamic range. Some studies based on the work of Londesborough *et al.*<sup>23</sup> used a Dionex anion-exchange column with a nitric acid eluent.<sup>23–26</sup> This method allows a satisfactory separation of both inorganic and organic arsenic species in a single chromatographic run. It has been applied to matrices such as water,<sup>23</sup> mushrooms<sup>23</sup> and fish products.<sup>23–26</sup>

The objectives of this work were: (1) to use a simple, rapid and inexpensive on-line leaching method by artificial gastro-intestinal fluids, previously developed for zinc and lead in corn bran,<sup>27,28</sup> to measure in real time the maximum bio-accessibility of total As from seafood products; (2) to use and adapt a previously optimised ion-exchange chromatography (IEC) coupled to ICP-MS technique,<sup>26</sup> for the simultaneous determination of seven As species in each collected leachate.

## Experimental

### Instrumentation

A Varian UltraMass 700 ICP-MS instrument (Mulgrave, Victoria, Australia) was used with a Sturman–Masters spray chamber and a concentric nebulizer. The chromatographic system consisted in a DX600/BioLC liquid chromatography system with a GS50 gradient pump (Dionex, Oakville, Canada), an injection valve with a 50  $\mu\text{L}$  injection loop, an IonPac AG7 guard column, and an IonPac AS7 (250  $\times$  4 mm,  $\text{\O}10$  mm particles) anion-exchange column (all Dionex, Voisins Le Bretonneux, France). The analytical column was connected to the nebuliser of the ICP-MS instrument using a 50 cm long PEEK tubing (0.17 mm id). The operating conditions are summarised in Table 1.

For continuous leaching and arsenic species determination, data acquisition was carried out in time-resolved, peak-hopping mode with three points per peak, one scan per replicate, a dwell time of 10 000 ms and 0.025 a.m.u. spacing. The raw data were then treated with in-house QBASIC software for smoothing (using a seven point Savitzky–Golay polynomial moving window) and determination of peak area. Continuous nebulisation was used for the batch method and for checking the mass balance. Data acquisition was then performed in the steady-state mode (using a 10 s integration time).

Table 1 Initial instrumental settings and separation conditions

<b>ICP-MS (Varian Ultramass)</b>	
Plasma gas flow	Ar, 15 L min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas flow	Ar, 1.05 L min <sup>-1</sup>
Aerosol carrier	Ar, 0.9 L min <sup>-1</sup>
Plasma Power	1.35 kW
Sample uptake rate	1.2 mL min <sup>-1</sup>
Monitored signals	<sup>75</sup> As, <sup>77</sup> AsCl
<b>HPLC (Dionex GS50 gradient pump)</b>	
Columns	IonPac AG7 + IonPac AS7
Column temperature	20 °C
Mobile phase flow rate	1.35 mL min <sup>-1</sup>
Mobile phase A (MPA)	0.5 mmol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> , 1% MeOH
Mobile phase B (MPB)	50 mmol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> , 1% MeOH

### Reagents

Artificial gastric juice and intestinal juice were prepared in compliance with USP XXIII.<sup>29</sup> Artificial saliva was prepared by diluting 6.8 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 77 ml of 0.2 M NaOH (all ACS grade; Bioshop, Burlington, Canada) to 1 L with doubly deionized water (DDW) (Milli-Q Plus, Millipore, Mississauga, Canada), and adjusting the pH to 6.5, using 0.2 M NaOH. For the artificial gastric juice, 2.0 g of NaCl (ACS grade; Bioshop), 3.2 g of pepsin (Sigma–Aldrich, Oakville, Canada) and 7.0 ml of concentrated HCl (ultra-pure; EM Science, New Jersey, USA) were diluted to 1 L (pH 1.2) using DDW. Artificial intestinal juice was prepared by diluting 6.8 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (ACS grade; Bioshop), 10 g of pancreatin (Sigma–Aldrich) and 77 ml of 0.2 M NaOH (ACS grade; Bioshop) to 1 L with DDW, and adjusting the pH to 6.8, using 0.2 M NaOH. Total arsenic standard solutions were prepared in each reagent matrix using 1000 mg L<sup>-1</sup> mono-element solution (SCP Science, Baie D'urfe, Canada). Nitric acid (trace metal grade, Fisher Scientific, Nepean, Canada) and hydrogen peroxide (ACS, Fisher Scientific) were used for the digestion of residues.

Some 1000 mg As L<sup>-1</sup> standard stock solutions of arsenic compounds were prepared from the following reagents: sodium (meta) arsenite (As(III)) ( $\geq 99.0\%$ ), sodium arsenate dibasic heptahydrate (As(V)) ( $\geq 98.5\%$ ), disodium methylarsenate (MA) ( $\geq 98.4\%$ ), cacodylic acid (DMA) ( $\geq 99.0\%$ ) (all Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and arsenobetaine (AB), arsenocholine (AC), trimethylarsine oxide (TMAO) (all Argus Chemicals, Vernio, Italy). Stock solutions of each As compound were stored at 4 °C in the dark. The stability of these standards in terms of total arsenic content and purity of the species was checked by ICP-MS. Each stock solution was further diluted to 1 mg As L<sup>-1</sup>, out of which multi-compound calibration standards were prepared daily. Methanol (HPLC gradient grade, Fisher Scientific) and nitric acid (trace metal grade, Fisher Scientific) were used for the eluents.

### Foodstuffs reference samples

The Certified Reference Materials (CRMs), TORT-2 (Lobster Hepatopancreas), CRM 627 (Tuna fish), DOLT-3 (Dogfish liver) and DORM-3 (Fish protein) were purchased from Promochem (Molsheim, France). All samples were used as provided without further grinding.

### On-line continuous leaching procedure

The continuous leaching procedure was as described previously.<sup>28</sup> The mini-column was prepared by loosely packing (to minimize back-pressure) about 200 mg aliquots of solid sample wrapped into a Isopore membrane (0.4  $\mu\text{m}$ , 47 mm d.) filter (Millipore, Mississauga, Canada) placed in a PTFE tubing (8 cm long, 3/16-in od, 1/8-in id) between two quartz wool plugs. It was connected to the nebuliser of ICP-MS by a PTFE tubing (35 cm long, 0.8 mm id). Each reagent (artificial saliva, gastric juice and intestinal juice) was pumped by a peristaltic pump into the mini-column. Both the reagents and the mini-column were maintained at 37 °C in a thermostatically controlled water bath. Leaching times were selected according to human physiology.<sup>30</sup> Leaching was carried out during 5 min for saliva. One hour each was initially used for

gastric and intestinal juices, which was then cut back to 20 min. Another study (using a batch method) also indicated that analyte concentration did not increase after 20 min.<sup>31</sup> The released As was analysed in real time by ICP-MS in time-resolved mode. Quantification for the continuous leaching procedure was performed by external calibration, by repeated injection of standards solutions, which were prepared daily in each reagent, through a 100  $\mu\text{L}$  injection loop (Rheodyne Inc., Cotati, Canada) mounted on a universal automatic actuator (Anachem Ltd., Luton, England). A blank consisting of leaching a mini-column containing only a filter and quartz wool plugs was also analysed.

#### Batch method

For comparison, a batch method was also used where about 200 mg aliquots of solid sample were placed into test tubes with a certain volume of reagent (6 mL for saliva or 24 mL for gastric and intestinal juices). The tubes were shaken for the same time as for continuous leaching at human body temperature (37 °C) and then centrifuged. The supernatant was analysed by continuous nebulisation using standard solutions prepared in the corresponding matrix. And the residue was loaded into another test tube with the next reagent.

#### Mass balance

For both on-line and batch methods, the residue remaining following the three extractions was collected and digested in a mixture of 5 mL  $\text{HNO}_3$  and 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 4 hours at 50 °C, then diluted to 50 mL with DDW and finally analysed by ICP-MS at  $m/z$  75 (total As). Standard solutions prepared in the same final matrix were used for the analysis of the diluted digest by continuous nebulisation.

#### Arsenic species determination procedure

The saliva leachates were collected, 5-fold diluted, and analysed by a previously developed speciation method (IEC/ICP-MS).<sup>26</sup> A nitric acid gradient (pH 3.3–1.3), with 1% of methanol in the mobile phase, was used to separate the seven arsenic species in a single chromatographic run. A 4-point external calibration was carried out with the respective standard compounds that were prepared daily in saliva.

## Results and discussion

Fig. 1 shows the leaching profiles (total As at  $m/z$  75) of both DORM-3 and a blank solution with artificial saliva, gastric and intestinal juices, respectively. Only the saliva leaching profile (Fig. 1a) presented a significant peak within less than 5 min, whereas the gastric and intestinal juices (Fig. 1b and c) profiles were similar to that of the blank within 20 min. The increased signal for the gastric juice (composed of NaCl and HCl) was probably due to  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  since a similar signal was also observed at  $m/z = 77$  corresponding to  $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ . Moreover, the front peak observed for the intestinal juice profile was an artifact corresponding to the gastric juice remaining in the mini-column. The same phenomenon was observed for the 4 CRMs studied in this work (data not shown). It appears that the bio-accessible total As was only released by saliva in less than 5 min from these samples

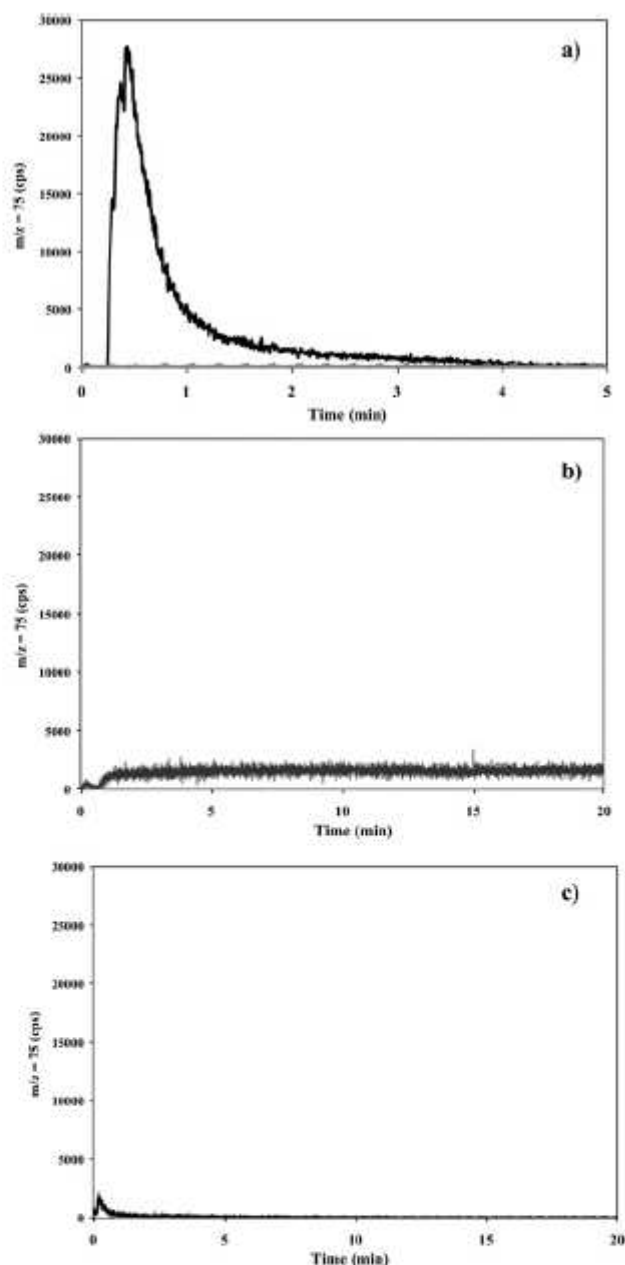


Fig. 1 The leaching profiles ( $m/z = 75$ ) of DORM-3 (black line) and a blank solution (grey line) that were observed with artificial saliva (a), gastric (b) and intestinal juices (c).

and nothing more was released by gastric or intestinal juices. The fast release indicated that As was adsorbed on the samples or weakly bound to them. So, this approach not only allows the determination of the total As quantity released by the different juices but also provides some information on the source of this element in the sample, as previously shown.<sup>27,28</sup> To the best of the authors' knowledge, this is the first study in which the bio-accessibility of total As in seafood was evaluated using a continuous leaching method that involved, in a first step, a simulated saliva digestion. Moreover, numerous works did not consider the oral cavity digestion process and restricted their studies to gastric and intestinal juice.<sup>11–15</sup> Evidently, this step

should not be neglected in bio-accessibility studies since, as shown here, all bio-accessible As was apparently released during this step.

#### Comparison of total As results by the on-line and batch methods

The mean total As quantities released (saliva + gastric + intestinal juices) and that left in the residue when using on-line continuous leaching and a batch method are presented in Fig. 2 for the 4 CRMs, with error bars corresponding to the precision under reproducibility ( $n = 5$ ,  $k = 2$ ). The percentage was calculated as follows:  $(Xf / Xc) \times 100$  with  $Xf$ : total As (released As + residue) and  $Xc$ : certified values (total As). According to the analysed CRM, 42 to 59% of total bio-accessible As was released by saliva (*i.e.* nothing else by the other juices) when using the on-line continuous leaching method. For the batch method, a major part of the As was released by saliva but a minor part was released by gastric juice (not shown). This minor part could be very different according to the sample and did not exceed 10% in all cases. Moreover, the sum of released total As was between 52 and 69% when using the batch method. Discrepancies for DOLT-3 and CRM 627 results observed between the batch method (69 and 53%, respectively) and the continuous leaching method (42% for both CRMs) may be explained by differences in surface and contact time, which were larger and longer between the matrix and the reagent for batch leaching.

So, about 50% of total As was released with the continuous leaching method in seafood CRMs studied, which is consistent with results previously found in clams (34–46%) by Koch *et al.*,<sup>11</sup> using a batch method with simulated gastric and intestinal juices. In seaweeds, these percentages generally exceeded 60%.<sup>11–13</sup>

In any case, the mass balance (*i.e.* the sum of As quantity released and left in the residue) was in agreement with the

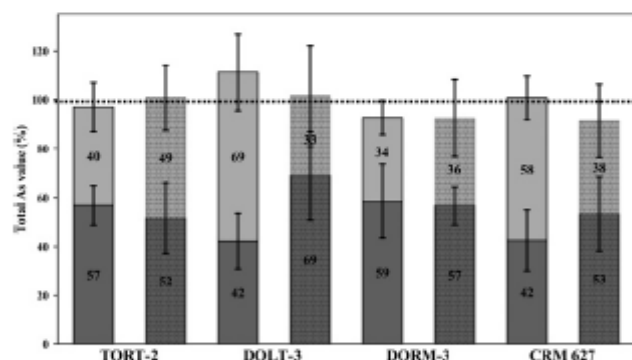


Fig. 2 Comparison of total As released (dark grey) and left in residue (light grey) by on-line continuous leaching (full) and a batch method (dotted).

reference value for both methods (dotted line in Fig. 2). The precision under reproducibility ( $CV_R$ ) ( $n = 5$ ) of the As amounts released and in the residue were evaluated to be lower than 15 and 20% with the continuous leaching and the batch method, respectively. These differences can be explained by an additional sample manipulation for the batch process. Moreover, even if they remain acceptable, these slightly high  $CV_R$  values may be attributed to differences in particle size distribution from one mini-column to another.<sup>32</sup>

#### Optimisation of the separation conditions in saliva matrix

The next step was to test, in saliva, the separation conditions of the seven As species that were previously optimised by experimental design with standard solutions prepared in water.<sup>26</sup> Since the liquid chromatography system differed from the one that was used before, the initial gradient program 1 (GP1, Table 2) was slightly modified (*i.e.* the first step after injection was reduced by 30 s). The separation of arsenic species in water was satisfactory in less than 15 min whereas a degradation of all resolutions was observed for the same mixture prepared in saliva. In particular, co-elutions of As(III)/MA and of TMAO/AC are noticed, corresponding to a general decrease in retention time. A study recently carried out showed that this behaviour was essentially due to the salts present in the saliva (data not shown). So, it appeared that the speciation analysis of the saliva leachates required a specific adjustment and an optimisation of separation conditions. By modifying slightly the gradient program (GP2 Table 2) and by diluting the saliva solution 5-fold, the seven As species were satisfactorily separated (Fig. 3a and b) within 18 min (including the stabilisation time, which was doubled).

However, as the  $pK_a$  of MA is very close to the pH of the mobile phase, the MA peak from real samples is very sensitive to pH variations of the mobile phase, as well as to the state of the chromatographic column and the composition of the matrix. Finally, a peak split for AC (Fig. 3a) could be observed that arose from the increase in nitric acid concentration in the mobile phase when passing from step 3 to step 4 of the gradient program. Further investigations are needed to eliminate or reduce these effects.

#### Speciation results

With these new separation conditions (GP2 Table 2), saliva leachates from the 4 CRMs were analysed using IEC/ICP-MS. The observed amounts of the seven As species, the sum of species, the residue and the total As are presented in Table 3. The limits of quantification (LOQ) were estimated as 6 times the standard deviation of the average signal from the blank samples

Table 2 Optimised gradient program for the 7 As species separation in water (GP1) and saliva (GP2)

		S1 <sup>a</sup>	S2 <sup>a</sup>	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
GP1	MP	—	100% A	100% A	10% A	80% A	—
	Time/min	—	4.0	2.5	2.5	5.5	—
GP2	MP	500 mM HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	100% A	0% A	100% A	0% A
	Time/min	2.0	6.0	3.0	2.5	1.5	3.0

<sup>a</sup> S1 et S2: Stabilisation step 1 and 2.

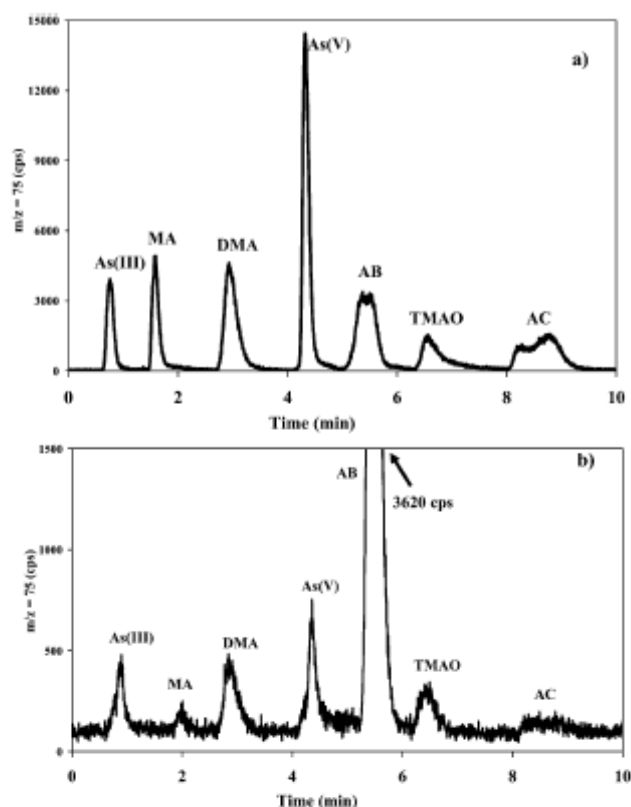


Fig. 3 Chromatogram (with GP2) of arsenic species from a standard solution ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) prepared in saliva (a) and a saliva leachate of TORT-2 (b) (all 5-fold diluted).

( $n = 7$ ) after corrections for sample weight (0.2 g) and dilution 1 : 5. The slightly high LOQ ( $0.09\text{--}0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) could be explained by the low sensitivity of the second-generation ICP-MS instrument used in this work. Nevertheless, the LOQ recently estimated in a Thermo X Series II ICP-MS system indicated an improvement by about a factor 10 ( $0.007\text{--}0.02 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

To directly compare the observed total arsenic values (*i.e.* the sum of the residue and total amounts of As species) with the certified value, Z-scores were calculated according to the most suitable procedure for the short-term evaluation of the CRMs, with the relative standard deviation corresponding to

intermediate precision under reproducibility conditions arbitrarily fixed at 10% ( $k = 2$ ).<sup>33</sup> The statistics of a normal distribution is such that about 95% of data points will lie between a Z-score of  $-2$  and  $+2$ . All Z-scores for observed total arsenic values in the 4 seafood CRMs were considered as acceptable ( $<|2|$ ), confirming the obtained results for total As (Fig. 2). As predicted, results show that the non-toxic organic form AB was the most released species by saliva (around 75% of total bio-accessible As). All the CRMs are only certified in total As, except CRM 627 which is also certified in DMA and AB ( $0.15$  and  $3.9 \text{ mg As kg}^{-1}$ , respectively). In this sample, about 60 and 40% of DMA and AB were released by saliva. So, the methylated form DMA seems more easily released than the organic form AB in the tuna fish matrix (CRM 627).

To the best knowledge of the authors, only a few studies have reported results of arsenic speciation in CRM 627<sup>26,34–38</sup> and TORT-2<sup>37–43</sup> and no study has reported results of the 7 As species in DORM-3 and DOLT-3. However, as only about 50% of the total arsenic present in these materials was bio-accessible, the bio-accessible values observed for CRM 627 and TORT-2 should be lesser than those previously reported by complete extraction methods. This was generally the case except for As( $\text{m} + \text{v}$ ) and TMAO values in TORT-2 and As( $\text{m} + \text{v}$ ) value in CRM 627.

For CRM 627, the As( $\text{m} + \text{v}$ ) bio-accessible value ( $0.20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) corresponding only to As(v), as As(m) was lower than LOQ was higher than previously reported ( $0.005\text{--}0.076 \text{ mg kg}^{-1}$ ).<sup>26,34–38</sup> This overestimation is due to the fact that the content was only 2 times higher than the LOQ and associated with a relatively important standard deviation ( $\pm 0.10 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

For TORT-2, a significant overestimation of the bio-accessible TMAO ( $1.42 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was observed, compared to the result previously obtained.<sup>37</sup> In fact, this value is similar to the sum of TMAO ( $0.15 \text{ mg kg}^{-1}$ )<sup>37</sup> and TMAP values ( $0.836\text{--}1.20 \text{ mg kg}^{-1}$ )<sup>41,42</sup> previously reported. So, this result confirmed the hypothesis of Sloth *et al.*<sup>35</sup> that TMAO and TMAP found in DORM 2 might have coeluted in the system of Kohlmeier *et al.* (or similar systems).<sup>24</sup> This hypothesis will be tested in future work, once TMAP standard solution have been acquired.

The sum of bio-accessible inorganic forms (As( $\text{m} + \text{v}$ )) values ( $1.06 \text{ mg kg}^{-1}$ ) obtained in TORT-2 seems also excessive compared to values previously reported ( $0.093\text{--}1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ).<sup>38–41</sup> If the As(v) value ( $0.37 \text{ mg kg}^{-1}$ ) seems consistent with the

Table 3 As species amounts ( $\text{mg As kg}^{-1}$ ) released by saliva in 4 CRMs ( $n = 5$ ;  $k = 2$ )

	TORT-2	DOLT-3	DORM-3	CRM 627	LOQ <sup>a</sup>
As(m)	$0.69 \pm 0.07^a$	$0.32 \pm 0.28$	< LOQ	< LOQ	0.12
MA	$0.24 \pm 0.06$	$0.17 \pm 0.06$	< LOQ	< LOQ	0.13
DMA	$0.74 \pm 0.13$	$0.24 \pm 0.09$	$0.30 \pm 0.10$	$0.09 \pm 0.02$	0.09
As(v)	$0.37 \pm 0.14$	< LOQ	$0.27 \pm 0.10$	$0.20 \pm 0.10$	0.10
AB	$9.46 \pm 0.70$	$2.90 \pm 0.83$	$3.23 \pm 0.55$	$1.57 \pm 0.27$	0.14
TMAO + TMAP	$1.42 \pm 0.50$	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.15
AC	$0.26 \pm 0.11$	< LOQ	$0.31 \pm 0.08$	< LOQ	0.17
Total species	$13.2 \pm 1.4$	$3.7 \pm 1.2$	$4.2 \pm 0.6$	$2.0 \pm 0.5$	
Residue	$8.1 \pm 1.0$	$6.9 \pm 2.8$	$2.7 \pm 1.3$	$2.6 \pm 0.4$	
Total	$21.2 \pm 1.2$	$10.6 \pm 1.9$	$6.9 \pm 0.7$	$4.6 \pm 0.5$	
Total As reference value	$21.6 \pm 1.8$	$10.2 \pm 0.5$	$6.9 \pm 0.3$	$4.8 \pm 0.3$	
Z-score	$-0.2$	$0.4$	$0.0$	$-0.5$	

<sup>a</sup> Values mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ;  $k = 2$ ). <sup>b</sup> Limits of quantification were estimated as 6 times SD ( $n = 7$ ) of blank solution.

literature (0.093–0.684 mg kg<sup>-1</sup>),<sup>38–43</sup> the As(m) concentration (0.69 mg kg<sup>-1</sup>) would be overestimated. Nevertheless, as explained by Sloth *et al.*,<sup>38</sup> a large variability exists between the reported values obtained by different extraction and separation methods; hence, no consensus value for inorganic arsenic could be established in either of the CRMs. This emphasizes the need for further research toward the development of reliable methods for the determination of inorganic arsenic in biological samples with certified values for inorganic arsenic.

## Conclusions

The use of the on-line continuous leaching method provides a simple and rapid approach to assess the maximum bio-accessibility of total As and As species in seafood products for the worst case scenario that can occur in the human gastrointestinal tract, *i.e.* 100% of the bio-accessible As is bio-available. In addition, this approach minimizes the potential contaminations since the preparation of the sample is reduced and conducted in a closed system. Future work will include the determination of As bio-accessibility in more real samples as well as a study of potential modifications of As species in gastric and intestinal juices. Moreover, in order to improve reproducibility of the method, a study of influence of the different parameters of the mini-column preparation (length and diameter of the mini-column, leaching flow rate, amount of sample, *etc.*) will be conducted.

## References

- U. Ballin, R. Kruse and H. S. Russel, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1994, **350**, 54.
- D. Caussy, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2003, **56**, 164.
- B. K. Mandal and K. T. Suzuki, *Talanta*, 2002, **58**, 201.
- D. Caussy, M. Gochfeld, E. Gurzau, C. Neagu and H. Ruedele, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2003, **56**, 45.
- M. Intawongse and J. R. Dean, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**(9), 876.
- M. Robson, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2003, **56**, 104.
- A. L. Juhasz, E. Smith, J. Weber, M. Rees, A. Rofe, T. Kuchel, L. Sansom and R. Naidu, *Chemosphere*, 2007, **69**, 961.
- S. M. Roberts, W. R. Weimar, J. R. T. Vinson, J. W. Munson and R. J. Bergeron, *Toxicol. Sci.*, 2002, **67**, 303.
- E. I. Brima, R. O. Jenkins, P. R. Lythgoe, A. G. Gault, D. A. Polya and P. I. Harris, *J. Environ. Monit.*, 2007, **9**, 98.
- I. Koch, S. Sylvester, V. W. M. Lai, A. Owen, K. J. Reimer and W. R. Cullen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2007, **222**(3), 357.
- I. Koch, K. McPherson, P. Smith, L. Easton, K. G. Doe and K. J. Reimer, *Mar. Pollut. Bull.*, 2007, **54**, 586.
- C. Almela, J. M. Laparra, D. Vélez, R. Barberá, R. Farré and R. Montoro, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 7344.
- J. M. Laparra, D. Vélez, R. Montoro, R. Barberá and R. Farré, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 6080.
- J. M. Laparra, D. Vélez, R. Barberá, R. Farré and R. Montoro, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 8829.
- A. G. Oomen, A. Hack, M. Minekus, E. Zeijdner, G. Schoeters, W. Verstraete, T. V. D. Wiele, J. Wragg, C. J. M. Rompelberg, A. J. A. M. Sips and J. H. V. Wijnen, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**, 3326.
- M. Minekus, P. Marteau, R. Havenaar and J. H. J. Huisintveld, *ATLA, Altern. Lab. Anim.*, 1995, **23**, 197.
- Z. Gong, X. Lu, M. Ma, C. Watt and X. C. Le, *Talanta*, 2002, **58**, 77.
- K. A. Francesconi and D. Kuehnelt, *Analyst*, 2004, **129**, 373.
- M. Leermakers, W. Baeyens, M. De Gietera, B. Smedts, C. Meert, H. C. De Bisschop, R. Morabito and P. Quevauviller, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**(1), 1.
- T. Guérin, A. Astruc and M. Astruc, *Talanta*, 1999, **50**, 1.
- C. B'Hymer and J. A. Caruso, *J. Chromatogr., A*, 2004, **1045**(1–2), 1.
- D. Beauchemin, *Anal. Chem.*, 2006, **78**(12), 4111.
- S. Londesborough, J. Mattusch and R. Wennrich, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1999, **363**, 577.
- U. Kohlmeier, S. Jakubik, J. Kuballa and E. Jantzen, *Mikrochim. Acta*, 2005, **151**(3–4), 249.
- S. H. Karthikeyan, *Appl. Organomet. Chem.*, 2004, **18**, 323.
- V. Dufailly, L. Noël, J.-M. Frémy, D. Beauchemin and T. Guérin, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 1168.
- M. Chu and D. Beauchemin, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1213.
- M. Chu and D. Beauchemin, *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.*, 2005, **50**(5), 289.
- USP, *US Pharmacopeia XXIII*, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 1995.
- L. R. Johnson, *Gastrointestinal Physiology*, Mosby, St. Louis, 1985.
- R. R. Rodriguez, N. T. Basta, S. W. Casteel and L. W. Pace, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**, 642.
- D. Beauchemin, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2873.
- L. Jorhem, J. Engman and T. Schroder, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2001, **370**, 178.
- E. Sanz, R. Munoz-Olivas and C. Camara, *J. Chromatogr., A*, 2005, **1097**, 1.
- J. J. Sloth, E. H. Larsen and K. Julshamn, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 452.
- T. Nakazato, T. Taniguchi, H. Tao, M. Tominaga and A. Miyazakia, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 1546.
- M. A. Suner, V. Devesa, O. Munoz, D. Vélez and R. Montoro, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 390.
- J. J. Sloth, E. H. Larsen and K. Julshamn, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 6011.
- S. Hirata, H. Toshimitsu and M. Aihara, *Anal. Sci.*, 2006, **22**, 39.
- S. Karthikeyan, S. Hirata and C. S. P. Iyer, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2004, **84**(8), 573.
- R. Wahlen, S. McSheehy, C. Scrivera and Z. Mester, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 876.
- J. Kirby and W. Maher, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, **17**, 838.
- J. A. Brisbin, C. B'Hymer and J. A. Caruso, *Talanta*, 2002, **58**(1), 133.

## IV. 5. Discussion

Les principaux résultats de l'évaluation de la bioaccessibilité de l'As dans les produits de la pêche sont résumés dans ce chapitre. Ces données sont complétées par l'étude de l'influence de la salive sur la séparation des composés arséniés qui n'avait pas pu être développée dans l'article II et l'article III (Annexe 4).

### IV. 5. 1. Évaluation de la bioaccessibilité de l'As total dans les produits de la pêche

#### IV. 5. 1. a. Résultat de la lixiviation en continu

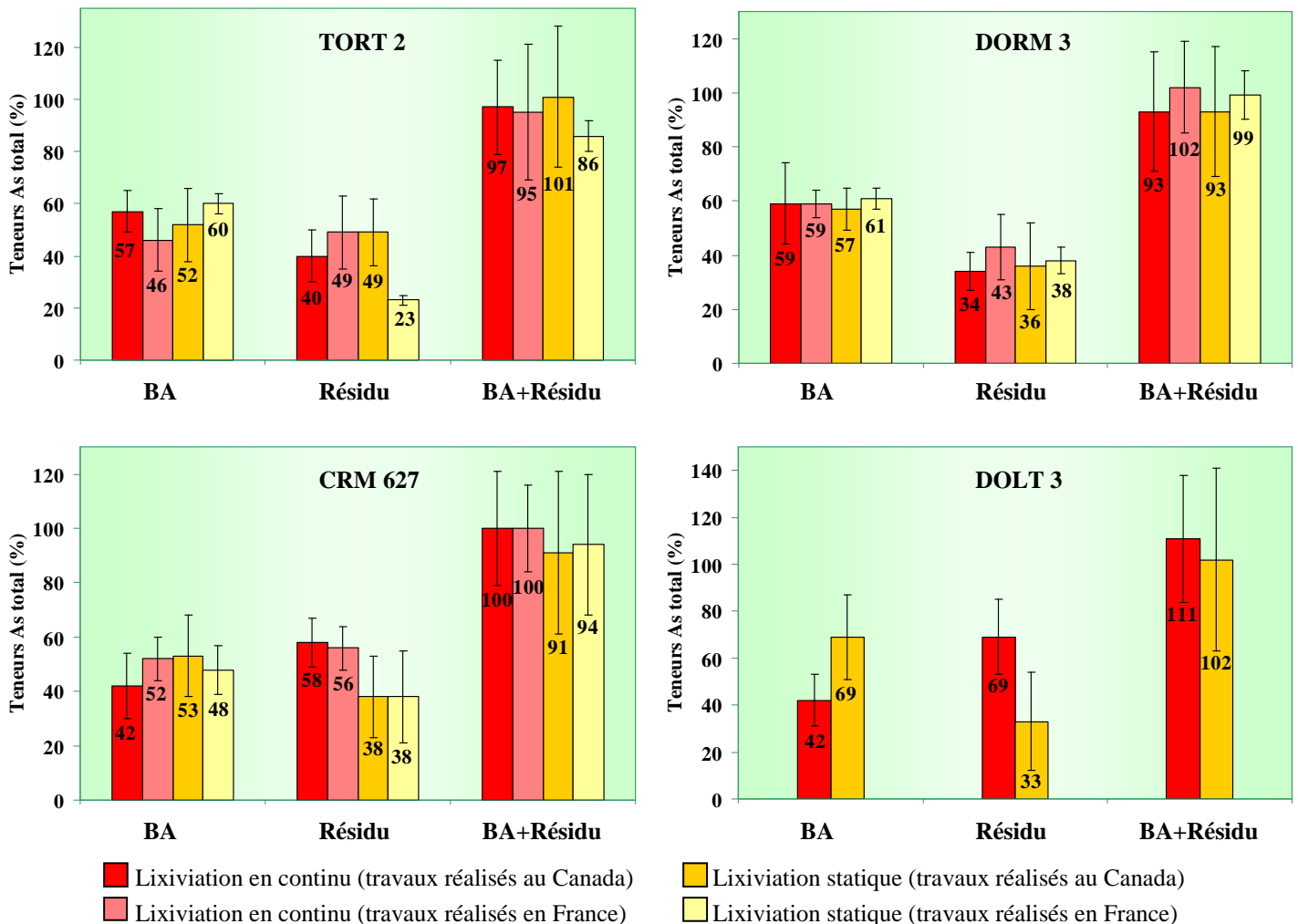
Comme détaillé dans l'article II, pour tous les MRC testés, la totalité de l'As total bioaccessible (environ 50 % de l'As total) semble libérée par la salive artificielle en moins de 5 minutes, et plus rien n'est ensuite libéré par les sucs gastro-intestinaux. Les résultats des travaux réalisés au laboratoire en France sont venus confirmer ces observations (Article III). L'As présent dans ces échantillons semble donc avoir des liaisons relativement faibles avec les matrices, et être aisément et rapidement soluble en milieu aqueux. Ainsi, l'approche de lixiviation en continu, en plus de quantifier l'As total libéré par les fluides gastro-intestinaux, permet aussi d'évaluer la force des liaisons entre l'analyte considéré et l'échantillon. Cette solubilité élevée de l'As dans ces échantillons vient confirmer les taux de récupération satisfaisants obtenus par la procédure MAE avec un solvant composé uniquement d'H<sub>2</sub>O chauffée (Cf. Partie III).

Afin de pouvoir comparer ces résultats à minima avec la littérature, des essais complémentaires ont été réalisés en injectant directement le suc gastrique artificiel dans les mini-colonnes d'échantillons. Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés avec l'injection de salive (i. e. la totalité de l'As total bioaccessible est libérée très rapidement). À notre connaissance, cette étude est la première à évaluer la bioaccessibilité de l'As dans les produits de la pêche par une méthode de lixiviation continue en incluant une première étape de digestion par de la salive artificielle. En effet, les études *in vitro* dans leur grande majorité ont eu tendance à négliger l'interaction entre la salive et les échantillons dans les processus de digestion simulés et se limitent à la digestion par les sucs gastro-intestinaux. (Intavongse et Dean, 2006) Néanmoins, cette étude semble montrer clairement que le rôle de la salive ne devrait pas être négligé dans les travaux d'évaluation de la bioaccessibilité de l'As dans les produits de la pêche.

## IV. 5. 1. b. Comparaison des méthodes statique et de lixiviation en continu

Le figure 23 présente les teneurs (%) moyennes d'As total libéré et restant dans le résidu après les 2 procédures de lixiviation (en continu et statique) pour les 4 MRC considérés. Les résultats des travaux réalisés aux laboratoires au Canada et en France sont présentés. Les pourcentages bioaccessibles ( $\%_{BA}$ ) et des résidus ( $\%_r$ ) présentés ont été calculés selon les expressions suivantes :

$$\%_{BA} = (X_{BA}/X_c) \times 100 \quad \text{et} \quad \%_r = (X_r/X_c) \times 100$$



**Figure 23 :** Teneurs en As total (en %) de la lixiviation sur les 4 MRC (n = 5,  $\pm$  SD)

Tout d'abord, les résultats obtenus pour les travaux réalisés aux laboratoires au Canada et en France sont relativement similaires malgré la différence d'appareillage. D'autre part, le bilan en masse (c'est-à-dire la somme des quantités d'As libérée et restante dans le résidu) est dans tous les cas en accord avec la valeur de référence (10 %,  $k = 2$ ) pour tous les MRC et les deux méthodes, sauf pour le TORT 2 avec la méthode statique dans les travaux réalisés en France ( $83 \pm 6$  %).

Selon l'échantillon considéré et l'origine des travaux, 42 à 59 % de l'As total est libéré par la salive lorsque la méthode de lixiviation en continu est utilisée. Pour la méthode statique, une fraction très importante de l'As est libérée par la salive même si une partie peut ensuite être libérée par le suc gastrique. Cependant, cette partie est très variable selon l'échantillon et ne dépasse pas 10 % dans tous les cas. La somme globale d'As total libéré avec la méthode statique est comprise entre 48 et 69 %.

Les quantités d'As libérées avec les deux méthodes sont généralement comparables compte tenu des « incertitudes » associées ( $\pm$  écart-type (SD)). La tendance générale se dégageant après cette étude est donc qu'approximativement 50 % de l'As total présent dans les échantillons considérés est libéré (et est donc considéré comme bioaccessible) avec les 2 méthodes *in vitro* utilisées. Ces résultats sont difficilement comparables avec les études précédentes sur la bioaccessibilité de l'As dans la mesure où elles se sont intéressées à des matrices légèrement différentes et n'ont pas pris en compte le rôle de la salive dans la digestion. Néanmoins, les teneurs d'As total bioaccessible obtenues dans notre étude sont proches de celles rapportées par Koch *et al.* (2007a) dans les palourdes (34-46 %) avec une méthode statique simulant uniquement les sucs gastro-intestinaux.

#### IV. 5. 2. Influence de la salive sur la séparation des espèces As

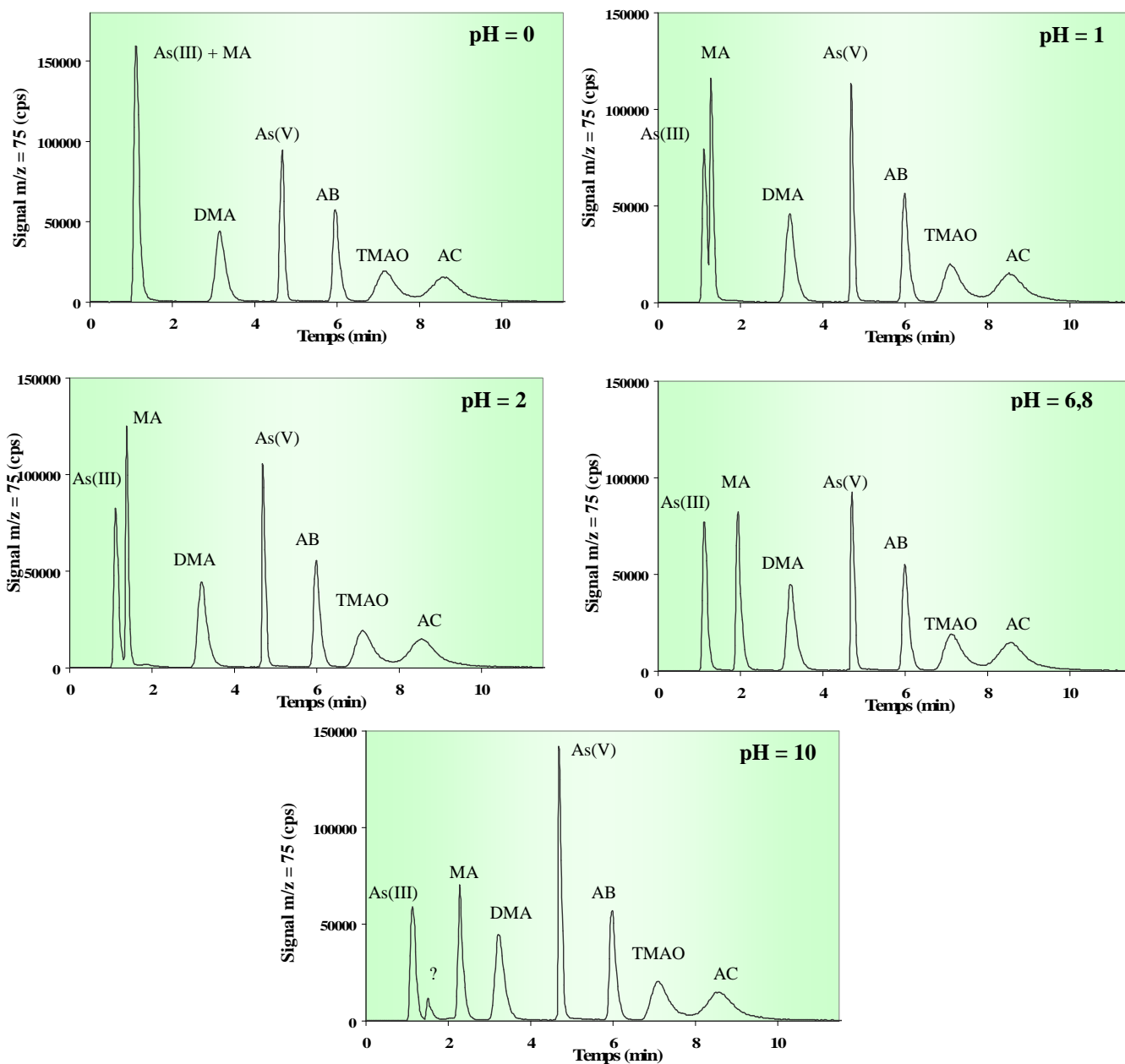
L'étape suivante a consisté à tester les conditions chromatographiques de séparation des espèces As optimisées dans la partie I dans une solution de salive artificielle. Comme rapporté dans l'article II, une dégradation des résolutions est observée pour une solution étalon des 7 espèces As préparée dans de la salive. Une étude réalisée au laboratoire en France, qui n'a pas été présentée dans l'article II, a permis de déterminer les causes exactes de cette détérioration de la séparation.



Un pH égal à 6,8 et une forte quantité de sels  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  étant les deux grandes caractéristiques de la solution de salive, il a été supposé qu'un de ces deux paramètres était à l'origine des modifications observées. Ils ont donc été étudiés individuellement en préparant d'une part des solutions étalons des 7 espèces à différents pH (0-10) sans rajouter de sels  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , et d'autre part des solutions avec différentes teneurs en sels  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,007-7  $\text{g L}^{-1}$ ) en fixant cette fois le pH comme étant égal à celui de l'eau MilliQ (pH = 4,5).

#### *IV. 5. 2. a. Influence du pH sur la séparation des espèces As*

La figure 24 présente les chromatogrammes obtenus pour des solutions étalons à  $10 \mu\text{g As L}^{-1}$  des 7 espèces As à différents pH (pH de la salive (6,8) et entre 0 et 10 par pas de 1) dans les conditions chromatographiques optimisées dans la partie III.



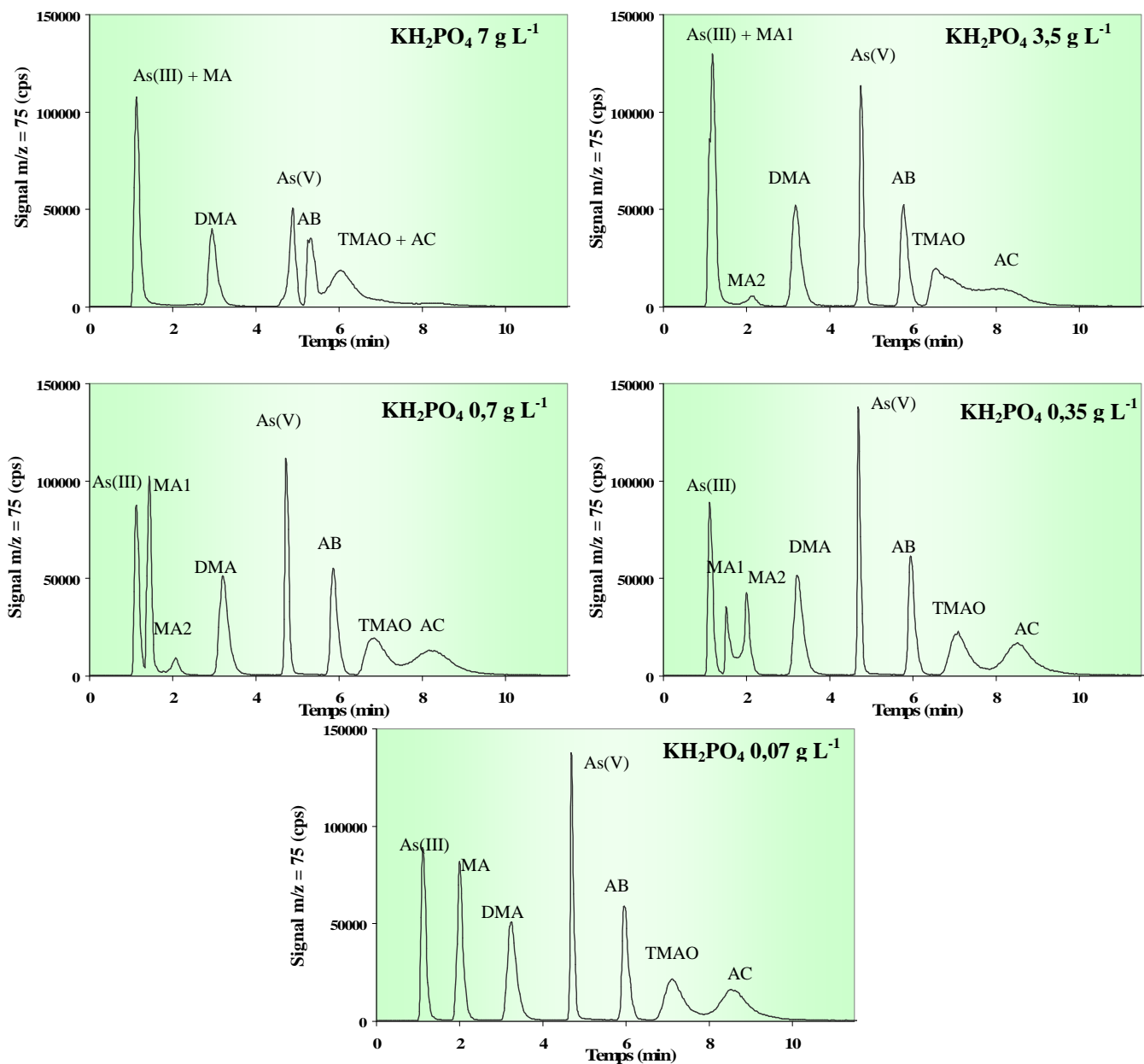
**Figure 24 :** Chromatogramme des solutions étalons à  $10 \mu\text{g As L}^{-1}$  des 7 espèces As

Dans un souci de synthèse, seuls ces cinq chromatogrammes sont présentés. En effet, les autres essais intermédiaires donnent les mêmes résultats que le chromatogramme observé pour  $\text{pH} = 6,8$ . Les temps de rétention de DMA, As(V), AB, TMAO et AC ne semblent pas être influencés de manière significative quelque soit le  $\text{pH}$  de la solution. Néanmoins, pour un  $\text{pH}$  inférieur ou égal à 2, la résolution entre As(III) et MA diminue jusqu'à ce que ces deux composés co-éluent pour un  $\text{pH} = 0$ . Ce comportement est dû au fait qu'à partir de ce  $\text{pH}$ , la forme neutre de MA devient majoritaire, impliquant une diminution du temps de rétention de ce composé. D'autre part, à  $\text{pH} = 10$ , il apparaît un pic inconnu entre les pics As(III) et MA qui n'a pas pu être clairement identifié (mais ce pic ne correspond ni à As(III) ni à MA).

À l'inverse, le profil des pics As(III) et MA pour un pH compris entre 2 et 10 est strictement identique à celui observé pour une solution étalon préparée dans de l'eau (Partie II). Le pH de la solution à analyser ne semble donc pas avoir une influence significative sur la séparation des composés arséniés, excepté pour As(III) et MA à un pH inférieur à 2 ou excédant 10.

#### IV. 5. 2. b. Influence de la quantité de sels sur la séparation des espèces As

La figure 25 présente les chromatogrammes obtenus pour des solutions étalons des 7 espèces As à pH = 4,5 et préparées avec différentes quantités de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,07$ - $7 \text{ g L}^{-1}$ ). À noter que la teneur en sels dans la salive est de  $6,8 \text{ g L}^{-1}$



**Figure 25 :** Chromatogramme des solutions étalons à  $10 \mu\text{g As L}^{-1}$  des 7 espèces As dans différentes quantités de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,07$ - $7 \text{ g L}^{-1}$ )

Tout d'abord, les résultats montrent que dans des conditions proches de celles de la salive (7 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), le profil du chromatogramme est identique à celui observé pour une solution de salive (6,8 g L<sup>-1</sup>) et donc, avec des résolutions fortement dégradées. Si cette solution est diluée au demi (3,5 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), la résolution des pics AB, TMAO et AC est améliorée. Mais le pic MA est dédoublé et un de ces pics co-élue avec le pic As(III), comme observé précédemment dans certaines matrices complexes. (Simon *et al.*, 2004 ; Londesborough *et al.*, 1999)

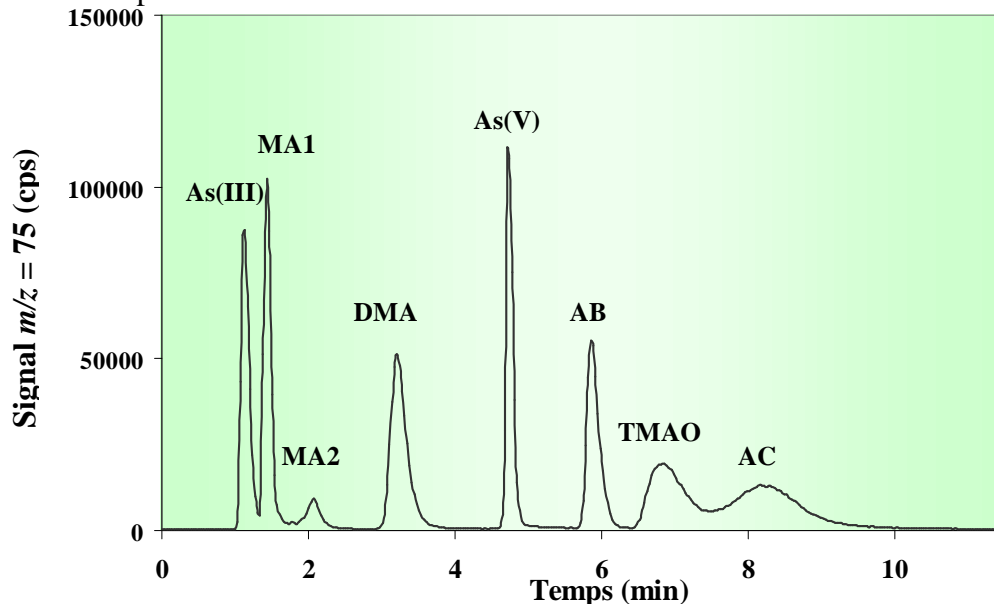
Simon *et al.* (2004) rapporte que ce dédoublement de pic pourrait être lié au pKa de MA (pKa = 3,6). Le pH de la phase mobile lors de la séparation étant proche de ce pKa (pH = 3,3), deux formes de MA coexistent : une forme neutre qui n'est pas retenue par la colonne (MA1) et une forme anionique qui rentre en interaction avec la phase stationnaire de la colonne (MA2). Un pH trop faible (cf. IV.5.2.a) ou la présence de sels dans les matrices complexes (la salive pour cette étude) semblent donc déplacer cet équilibre vers la formation de MA1 qui co-élue avec As(III) au détriment de la forme anionique MA2 correspondant au deuxième petit pic observé. À partir de 0,07 mg L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, les deux pics MA ont tendance à se rejoindre au temps de rétention observé pour MA dans une solution étalon ne contenant pas de sels. Une dilution au centième de la matrice salivaire serait donc nécessaire pour maintenir une séparation chromatographique des espèces arséniées correspondant aux conditions de séparation optimisées (cf. Partie 2).

#### IV. 5. 2. c. Conclusions

Ces résultats ont donc démontré que la présence de sels dans la salive semblait être à l'origine de la détérioration de la séparation des composés As. D'autre part, les phénomènes de co-élution des espèces As(III) et MA rencontrés lors de l'analyse de certaines matrices complexes seraient aussi liés à la présence de sels dans ces matrices déstabilisant le fragile équilibre des formes MA lors de la séparation.

Dans un premier temps, pour les travaux réalisés au laboratoire au Canada, des conditions chromatographiques spécifiques et une dilution au cinquième des échantillons ont dû être mises en place pour la spéciation de l'As dans les lixiviats de salive. Néanmoins, les faibles sensibilités de l'appareillage utilisé pour ces travaux n'ont pas permis de déceler que le phénomène de dédoublement du pic MA et la co-élution de MA1 et As(III) restaient persistants pour certains lixiviats d'échantillons réels.

Dans un deuxième temps, avec l'appareillage utilisé lors des travaux réalisés au laboratoire en France, seule une dilution au dixième (au minimum) a été nécessaire pour réduire les effets des sels sur la séparation et pour obtenir un compromis acceptable entre la résolution et la sensibilité des pics observés pour la spéciation des lixiviats de salive. (Figure 26) Dans ces conditions, il est toutefois nécessaire d'ajouter les 2 pics MA pour quantifier avec justesse ce composé.



**Figure 26 :** Chromatogramme observé pour une solution étalon à  $10 \mu\text{g As L}^{-1}$  des 7 espèces As préparée dans de la salive diluée au dixième.

#### IV. 5. 3. Spéciation des lixiviats de salive

Les teneurs obtenues dans les lixiviats de salive pour les travaux réalisés aux laboratoires au Canada et en France sont présentées dans les articles II et III (Annexe 4), respectivement. Ayant été obtenus sur des appareillages différents avec des conditions chromatographiques spécifiques, ces résultats ne peuvent pas faire l'objet de comparaisons et nous nous sommes donc focalisés sur les derniers résultats des travaux réalisés au laboratoire en France avec un appareillage plus performant.

Le tableau XXXI présente les teneurs des 7 espèces As observées dans les lixiviats de salive de 3 MRC (TORT 2, DORM 3 et CRM 627) (Article III, Annexe 3). Les teneurs en As total des résidus et des bilans en masse sont aussi rapportées dans ce tableau. Les limites de quantification présentées ont été estimées comme 6 fois l'écart type de solution de blancs (salive diluée au dixième  $n = 10$ ). Elles sont comparables à celles estimées dans la partie III.

**Tableau XXXI :** Teneurs des espèces As dans les lixiviats de salive de 3 MRC ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2	AC	Résidu	$\Sigma^{**}$	Teneur certifiée	As total BA
TORT 2	0,169 $\pm 0,072^*$	0,239 $\pm 0,089$	0,368 $\pm 0,124$	0,319 $\pm 0,163$	8,88 $\pm 1,73$	0,832 $\pm 0,237$	< LOQ	9,4 $\pm 2,8$	20,2 $\pm 1,9$	21,6 $\pm 1,8$	10,0 $\pm 2,6$
DORM 3	0,013 $\pm 0,002$	0,030 $\pm 0,014$	0,309 $\pm 0,020$	0,043 $\pm 0,105$	3,42 $\pm 0,18$	0,132 $\pm 0,013$	< LOQ	3,1 $\pm 0,9$	7,1 $\pm 0,5$	6,9 $\pm 0,3$	4,0 $\pm 0,4$
CRM 627	0,019 $\pm 0,003$	0,034 $\pm 0,013$	0,083 $\pm 0,007$	< LOQ	2,35 $\pm 0,24$	0,033 $\pm 0,010$	< LOQ	2,3 $\pm 0,4$	4,7 $\pm 0,5$	4,8 $\pm 0,3$	2,5 $\pm 0,4$
LOQ***	0,010	0,030	0,020	0,030	0,040	0,030	0,050				

\*  $\pm$  SD ( $n = 5$ ), \*\* Somme des résidus et teneurs BA des espèces As, \*\*\* Prise d'essai de 0,2 g et volume de reprise de 7 mL et dilution au dixième

Les résultats indiquent que le bilan en masse est en accord avec les teneurs de référence en As total pour les 3 MRC confirmant les résultats rapportés en IV.5.1.b.. Comme attendu, l'espèce AB, généralement prépondérante dans les produits de la pêche, est l'espèce la plus représentée dans les lixiviats de salive (environ 87 % de l'As total bioaccessible en moyenne).

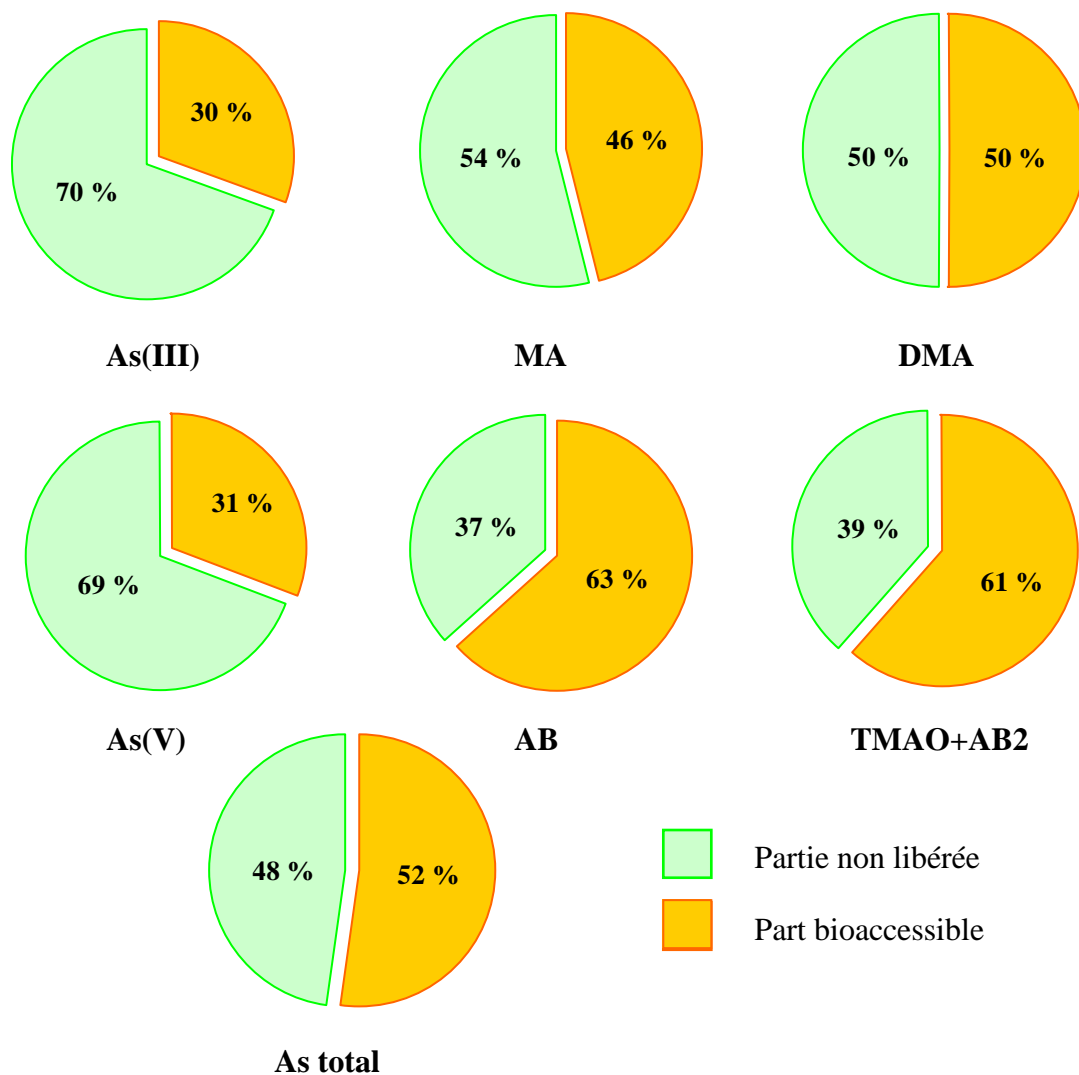
Le tableau XXXII présente les pourcentages bioaccessibles des espèces arséniées ( $\%_{BA}$ ) dans les 3 MRC déterminés selon l'expression :  $\%_{BA} = (X_{BA}/X_{MAE}) \times 100$  (avec  $X_{BA}$  : la teneur bioaccessible de l'espèce As considérée,  $X_{MAE}$  : la teneur de l'espèce As considérée observée après la procédure MAE décrit dans la partie III). Les teneurs bioaccessibles de AC étant inférieures à la LQ, les pourcentages pour cette espèce n'ont pas pu être calculés.

**Tableau XXXII :** Pourcentages bioaccessibles des espèces As dans les 3 MRC (%)

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +AB2	As total
TORT 2	41	52	29	44	69	59	46
DORM 3	12	32	67	17	73	60	59
CRM 627	36	54	54	-	48	65	52

Comme décrit dans l'article III, les pourcentages bioaccessibles peuvent être très différents selon la matrice étudiée. Les deux formes inorganiques As(III) et As(V), notamment, présentent des pourcentages bioaccessibles faibles pour DORM 3 (12 et 17 %, respectivement) alors que ceux pour TORT 2 sont plus élevés (41 et 44 %, respectivement). À l'inverse, les valeurs bioaccessibles pour l'As total restent similaires dans les 3 MRC (environ 50 %). À noter que deux études précédentes utilisant une méthode statique ont montré que la bioaccessibilité des organo-sucre (entre 80 et 100 %) (Almela *et al.*, 2005) ou des espèces inorganiques (entre 50 et 80 %) (Laparra *et al.*, 2003) est également spécifique à chaque type d'algue étudié.

La figure 27 présente, sous forme de diagrammes, la proportion bioaccessible moyenne (%), ainsi que la portion non libérée des 3 MRC pour chaque espèce ainsi que pour l'As total.



**Figure 27 :** Proportion bioaccessible moyenne (%) des 3 MRC pour chaque espèce et pour l'As total.

Il apparaît que les proportions bioaccessibles moyennes pour les deux formes méthylées MA et DMA (46 et 50 %, respectivement) sont très proches de celle de l'As total (52 %). D'autre part, les proportions pour AB et TMAO+AB2 (63 et 61 % respectivement) sont légèrement supérieures aux résultats des autres espèces et de l'As total. Enfin, les formes inorganiques As(III) et As(V) pour les 3 MRC considérés ont tendance à apparaître comme les formes arséniées les moins libérées par la salive (proportion bioaccessible d'arsenic inorganiques d'environ 30 %).

La bioaccessibilité de l'As dans les produits de la pêche a fait l'objet de très peu d'études répertoriées, la majorité des travaux s'étant focalisés sur les sols. (Caussy, 2003 ; Intawongse et Dean, 2006) À notre connaissance, cette étude est la première à comparer de manière directe les bioaccessibilités de différentes espèces As qu'elles soient inorganiques ou organiques dans des produits de la pêche. Néanmoins, ces résultats viennent confirmer les travaux de Koch *et al.* (2007a) qui ont montré que des bioaccessibilités différentes étaient observées pour l'As total dans des palourdes selon la quantité d'arsenic inorganique dans les échantillons. Ainsi, l'As total dans des palourdes contenant une forte concentration en espèces As inorganiques apparaissait moins bioaccessible (36-44 %) que celui dans des palourdes contenant majoritairement des composés As organiques (83-88 %). De même, plusieurs études ont montré que la quantité d'arsenic inorganique était faible dans les algues alors que, dans le même temps, la bioaccessibilité de l'arsenic total dans ces mêmes échantillons était importante ((32-67 % pour Laparra *et al.* (2003), 38-87 % pour Almela *et al.* (2005), 62-79 % pour Koch *et al.* (2007a)). En conclusion, il semblerait que les espèces inorganiques auraient tendance à être moins bioaccessibles que les espèces organiques dans les produits de la pêche et dans les algues.



## CONCLUSIONS DE LA PARTIE IV

Les méthodes *in vivo* d'évaluation de la biodisponibilité de l'As étant longues, coûteuses et complexes à réaliser, des méthodes alternatives *in vitro* ont été développées pour l'évaluation de la bioaccessibilité de cet élément. Nous avons choisi de tester une méthode simple, rapide et pragmatique de lixiviation en continu (Chu et Beauchemin, 2005) permettant une mesure en temps réel de la bioaccessibilité maximale de l'As total dans les produits de la pêche. Cette méthode a ensuite été combinée à la méthode de spéciation décrite dans les parties II et III pour évaluer les proportions bioaccessibles des espèces As dans ces échantillons. Les essais ont été réalisés dans deux laboratoires différents : dans un premier temps, au sein du département de chimie de la Queen's university de Kingston au Canada, et par la suite, dans le laboratoire de l'unité CIME de l'AFSSA-LERQAP.

Les résultats des ces essais réalisés dans 4 MRC produits de la pêche ont montré que la totalité de l'As total bioaccessible (environ 50 % de l'As total présent dans les échantillons),, était libérée par la salive artificielle en moins de 5 minutes et rien de plus n'était libéré par les sucs gastro-intestinaux. Ces résultats ont souligné l'importance de considérer la salive, généralement négligée, dans la simulation du processus de digestion au sein de l'organisme.

Au préalable à la spéciation des lixiviats de salive, une étude a été réalisée pour déterminer l'influence de ce réactif sur la séparation chromatographique des espèces arséniées. La présence de sels dans la salive semblerait être la principale cause de la détérioration des résolutions des pics. Ces mêmes phénomènes avaient été observés pour la spéciation de l'arsenic dans certaines matrices complexes (partie III). Une dilution des lixiviats a permis d'obtenir un compromis satisfaisant entre la résolution et la sensibilité des pics chromatographiques.

La spéciation des lixiviats de salive sur des MRC produits de la pêche semble indiquer que les espèces inorganiques (As(III) et As(V)) présenteraient une bioaccessibilité plus faible que les espèces arséniées organiques. Notre étude est la première à mettre en évidence cette tendance dans les produits de la pêche de manière directe en comparant les teneurs bioaccessibles avec les teneurs totales présentes dans les échantillons pour chaque espèce As. Néanmoins, cette tendance devra être confirmée par l'analyse d'un nombre plus important d'échantillons.

Enfin, pour une évaluation des risques encore plus précise, il serait nécessaire d'étudier l'influence de la cuisson et de la préparation culinaire des aliments sur la bioaccessibilité de l'As total et des espèces As. En effet, les travaux de Laparra *et al.* (2003 et 2005) ont démontré une augmentation significative de la bioaccessibilité de l'As après cuisson d'échantillons d'algues et de riz. D'autre part, il serait intéressant de comparer cette méthode de lixiviation en continu avec la méthode européenne « BioAvailability Research Group Europe » (ou BARGE), dont l'objectif est d'établir une méthodologie harmonisée pour une évaluation plus réaliste de la biodisponibilité orale des éléments traces.

## CONCLUSIONS GENERALES

Le principal objectif de cette étude a été de développer et de valider une méthode analytique de spéciation de l'arsenic et d'évaluation de sa bioaccessibilité dans les produits de la pêche, permettant de mieux apprécier les risques encourus par le consommateur et, en conséquence, de proposer à nos autorités de tutelle et à tous les acteurs soucieux de l'amélioration de la sécurité sanitaire des aliments destinés à l'homme, une évaluation des risques plus fine et pertinente, à l'avenir.

La première partie de ce travail a porté sur la mise au point d'une méthode de séparation des principales espèces arséniées couramment retrouvées dans les produits de la pêche par couplage entre la chromatographie d'échanges d'ions (IEC) et la détection par ICP-MS. La colonne échangeuse d'anions Ionpac AS7 (*Dionex*), retenue dans cette étude, garantit une séparation simple, rapide et simultanée des principaux composés, et présente également la particularité d'être associée à un éluant composé principalement d'acide nitrique, considéré comme le plus compatible avec une détection par ICP-MS. La méthodologie des plans d'expériences utilisée dans ces travaux, a permis, en un minimum d'essais, d'une part d'évaluer l'influence des différents facteurs et de leurs interactions éventuelles sur la séparation de 7 espèces arséniées et d'autre part, de déterminer les conditions analytiques optimales tout en minimisant le temps d'analyse par rapport aux études précédentes, en conservant des résolutions satisfaisantes et en améliorant les sensibilités pour l'ensemble des composés considérés (Article I).

Le même processus a été réalisé pour déterminer les conditions chromatographiques optimales de séparation de 9 composés arséniés (2 composés anticoccidiens (additifs alimentaires) susceptibles d'être retrouvés dans les volailles d'importation, en plus des 7 espèces précédentes). Ces conditions pourront être utilisées pour la spéciation de l'arsenic dans les volailles traitées avec ces additifs alimentaires à base d'arsenic.

La deuxième partie de ces travaux a concerné la mise au point de l'étape cruciale de mise en solution des espèces arséniées dans les produits de la pêche par extraction assistée par micro-ondes (MAE). Cette technique simple, robuste et rapide permet d'obtenir des taux de récupération satisfaisants de l'arsenic total et des formes arséniées sans modifications des espèces initialement présentes. Ce procédé offre également le double avantage de consommer de faibles volumes de solvant (réduisant ainsi la quantité de déchets et les risques de contamination) et d'être utilisée en système fermé ce qui évite les pertes d'éléments volatils et

les contaminations par les particules atmosphériques. Les résultats d'une étude préliminaire, portant sur l'influence de plusieurs paramètres sur les taux de récupération de l'As total dans des produits de la pêche, ont permis de conclure que la composition du solvant apparaissait comme le paramètre prépondérant sur l'efficacité de l'extraction. Ainsi, notre étude a montré clairement qu'un solvant uniquement composé d'eau était suffisant pour obtenir par MAE des taux de récupération satisfaisants en As total et en spéciation dans les produits de la pêche. Au demeurant, ces conditions permettent également de réduire le risque de dépôts de carbone au sein de l'ICP-MS perturbant sa stabilité et sa sensibilité.

Par la suite, les critères analytiques (linéarité, limites de détection et de quantification, justesse, spécificité, fidélité et reproductibilité interne) de la méthode de spéciation optimisée ont été évalués selon les normes en vigueur. La linéarité, les LQ (0,02-0,07 mg kg<sup>-1</sup>), la spécificité et la justesse ont été considérées acceptables pour toutes les espèces, et les CV<sub>R</sub> estimés sont compris entre 8 et 16 % selon les espèces. Les résultats ont donc démontré que la méthode était pratiquement validée pour la spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche, même si la reproductibilité interne estimée dans cette étude devra nécessairement être affinée en l'évaluant à plus long terme. L'ensemble des résultats de cette deuxième partie a fait l'objet d'un article soumis en novembre 2008 au journal « *Analytica Chimica Acta* » (Article III, Annexe 4).

Suite à cette étude, la méthode validée a pu être appliquée, d'une part, à la spéciation de l'As dans des échantillons aqueux pour la tester sur d'autres matrices chargées en sels, et d'autre part, à la certification d'un échantillon de foie d'aiguillat organisée par le NRC canadien dont les résultats pourront venir confirmer l'évaluation de la justesse de la méthode.

La troisième partie de ces travaux s'est intéressé à la mise au point d'une méthode *in vitro* d'évaluation de la bioaccessibilité maximale (correspondant à la part maximale libérée dans l'organisme) de l'arsenic et des formes arséniées dans les produits de la pêche, en combinant une méthode de lixiviation en continu avec la méthode de spéciation.

L'objectif de cette technique de lixiviation en continu est de mesurer, en temps réel par ICP-MS, la part d'As libérée par des réactifs simulant les liquides gastro-intestinaux de l'appareil digestif, et de proposer une alternative simple et pragmatique aux méthodes *in vivo* longues, coûteuses et complexes à mettre en œuvre. (Article II)

Alors que la salive est généralement négligée dans la simulation des fluides gastro-intestinaux, nos résultats montrent que la totalité de l'As bioaccessible, qui représente environ 50 % de l'As total présent dans les produits de la pêche étudiés, est libérée très rapidement (en moins de 5 min) par la salive sans que rien d'autre ne soit ensuite libéré par les sucs gastro-intestinaux.

En raison de la présence de sels dans ces échantillons, la spéciation de l'arsenic bioaccessible a nécessité une dilution au minimum au dixième des lixiviats de salive afin d'obtenir un compromis satisfaisant entre résolution et sensibilité. Malgré cette étape préalable, les LQ (0,010-0,050 mg kg<sup>-1</sup>) sont proches de celles estimées pour la méthode de spéciation. En comparant directement les teneurs bioaccessibles avec les teneurs totales présentes dans les échantillons pour chaque espèce As, nos travaux sont les premiers à mettre en évidence que la bioaccessibilité des espèces arséniées inorganiques apparaît moins importante que celle des espèces organiques dans les produits de la pêche. Néanmoins cette tendance reste à confirmer par l'analyse d'un nombre plus important d'échantillons différents.

En perspectives, même si l'ensemble de ces résultats apparaît très prometteur, il serait intéressant d'étudier d'éventuelles modifications des espèces As dans les sucs gastrique et intestinal. L'évaluation de la bioaccessibilité sur de nouvelles matrices, ainsi que pour d'autres éléments d'intérêt pourra également être envisagée. De même, il conviendrait d'étudier l'influence de la cuisson et de la préparation culinaire des aliments sur la bioaccessibilité de l'As pour affiner l'évaluation des risques, mais aussi de comparer notre méthode de lixiviation avec la méthode européenne BARGE qui tente d'harmoniser les méthodologies d'évaluation de la biodisponibilité orale des éléments traces. Une comparaison des résultats de l'évaluation de la bioaccessibilité avec ceux de l'estimation de biodisponibilité par des études *in vivo*, pourra aussi être envisagée afin de s'assurer de leur cohérence.

L'utilisation d'une solution tampon en début de séparation, comme rapportée par Simon *et al.* (2004), sera testée afin de tenter de se soustraire totalement au problème de dédoublement du pic MA susceptible d'être rencontré dans les matrices réelles. Enfin, de nouveaux échantillons frais et plus gras devront être testés afin de s'assurer que les taux de récupération obtenus sont toujours satisfaisants. D'autre part, les échantillons de l'étude alimentaire totale (EAT 2) en cours de réalisation par l'AFSSA, ainsi que des échantillons d'abats et de volailles d'importation susceptibles d'être traités avec des composés anticoccidiens chargés en arsenic, seront analysés afin d'affiner la reproductibilité et la robustesse de la méthode de

spéciation et aussi d'élargir son domaine d'application. Une fois les produits de la pêche de l'étude EAT 2 analysés en spéciation, les données de contamination des différentes formes arséniées présentes seront croisées avec les données de consommation, permettant alors d'affiner l'évaluation de l'exposition de la population française. L'étude de la bioaccessibilité sur les produits de l'EAT 2 les plus contributeurs à l'exposition permettra également de contribuer à une évaluation des risques plus précise et d'aider nos gestionnaires à prendre les décisions plus appropriées en terme de gestion des risques.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Ackley, K. L., C. B'Hymer, K. L. Sutton et J. A. Caruso (1999)** "Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS." *J. Anal. At. Spectrom.* 14: 845-850.
- AFNOR (1996)** "Analyse de produits agricoles et alimentaires – Guide pour l'utilisation des matériaux de référence." Association française de normalisation, FD V 03-115.
- AFNOR (1998)** "Analyse de produits alimentaires – Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence." Association française de normalisation, NF V 03-110.
- AFNOR (1999)** "Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence" Association française de normalisation, XPT 90-210.
- AFNOR (2000)** "Produits alimentaires. - Dosage des éléments trace. - Critères de performance et généralités." Association française de normalisation, NF EN 13805.
- Ahmann, D., L. R. Krumholz, H. F. Hemond, D. R. Lovley et F. M. M. Morel (1997)** "Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona watershed." *Environ. Sci. Technol.* 31: 2923-2930.
- Almela, C., J. M. Laparra, D. Vélez, R. Barbera, R. Farré et R. Montoro (2005)** "Arsenosugars in Raw and Cooked Edible Seaweed: Characterization and Bioaccessibility" *J. Agric. Food Chem.* 53: 7344-7351.
- Aposhian, H. V., H. S. Gurzau, X. C. Le, A. Gurzau, S. M. Healy, X. Lu, M. Ma, L. Yip, R. A. Zakharyan, R. M. Maiorino, R. C. Dart, M. G. Tircus, D. Gonzalez-Ramirez, D. L. Morgan, D. Avram et M. M. Aposhian (2000)** "Occurrence of Monomethylarsonous Acid in Urine of Humans Exposed to Inorganic Arsenic." *Chem. Res. Toxicol.* 13: 693-697.
- Amran, M. B., F. Lagarde et M. J. F. Leroy (1997)** "Determination of arsenic species in marine organisms by HPLC-ICP-OES and HPLC-HG-QFAAS." *Mikrochim. Acta* 127: 195-202.
- ATSDR (2000)** "Toxicological Profiles for Arsenic." Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US department of Health and Human Services, Public Health Services, Atlanta, GA, USA.
- <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.html>
- Bacon, J. R., K. L. Linge, R. R. Parrish et L. Van Vaeck (2007)** "Atomic spectrometry update. Atomic mass spectrometry" *J. Anal. At. Spectrom.* 22(8): 973-1006.
- Bacon, J. R., K. L. Linge et R. R. Parrish (2008)** "Atomic spectrometry update. Atomic mass spectrometry" *J. Anal. At. Spectrom.* 23(8): 1130-1162.



- Ballin**, U., R. Kruse, H. A. Russel (1994) "Determination of total arsenic and speciation of arseno-betaine in marine fish by means of reaction - headspace gas chromatography utilizing flame-ionization detection and element specific spectrometric detection" *Fresenius' J. Anal. Chem.* 350(1-2): 54-61.
- Bates**, M. N., A. H. Smith et K. P. Cantor (1995) "Case-control study of bladder cancer and arsenic in drinking water. " *Am. J. Epidemiol.* 141: 523-530.
- Beauchemin**, D., K. W. M. Siu, J. W. McLaren et S. S. Berman (1989) "Determination of arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry" *J. Anal. At. Spectrom.* 4: 285-289.
- Beauchemin**, D. (2008) "Inductively coupled plasma mass spectrometry" *Anal. Chem.* 80(12): 4455-4486.
- Bednar**, A. J., J. R. Garbarino, I. Ferrer, D. W. Rutherford, R. L. Wershaw, J. F. Ranville et T. R. Wildeman (2003) "Photodegradation of roxarsone in poultry litter leachate" *Sci. Total Environ.* 302: 237-245.
- Bélanger**, J. M. R. et J. J. R. Paré (2006) "Applications of microwave-assisted processes (MAP™) to environmental analysis." *Anal. Bioanal. Chem.* (2006) 386:1049-1058.
- B'Hymer**, C. et J. A. Caruso (2002) "Evaluation of HPLC Systems for the Separation and Quantification of Arsenic Compounds from Apple Extracts." *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25(4): 639-653.
- B'Hymer**, C. et J. A. Caruso (2004) "Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry." *J. Chromatogr. A* 1045(1-2): 1-13.
- Bissen**, M. et F. H. Frimmel (2000) "Speciation of As(III), As(V), MMA and DMA in contaminated soil extracts by HPLC-ICP/MS." *Fresenius J. Anal. Chem.* 367: 51-55.
- Bissen**, M. et F. H. Frimmel (2003) "Arsenic – a Review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility." *Acta Hydroch. Hydrob.* 31(1): 9-18.
- Boyle**, R. W. et I. R. Jonasson (1973) "The geochemistry of arsenic and its use as an indicator element in geochemical prospecting" *J. Geochem. Explor.* 2: 251-296.
- Braman**, R. S. et C. C. Foreback (1973) "Methylated forms of arsenic in the environment." *Science* 182: 1247-1249.
- Brisbin**, J. A. et J. A. Caruso (2002) "Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by inductively coupled plasma mass spectrometry." *Analyst* 127: 921-929.

- Brisbin, J. A., C. B'Hymer et J. A. Caruso (2002)** "A gradient anion exchange chromatographic method for the speciation of arsenic in lobster tissue extracts." *Talanta* 58: 133-145.
- Brown, J., K. Kitchin et M. Georges (1997)** "Dimethylarsinic acid treatment alters six different rat biochemical parameters: relevance to arsenic carcinogenesis." *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 17: 71-84.
- Brown, C. C. et K. C. Chu (1983a)** "A new method for the analysis of cohort studies: implications of the multistage theory of carcinogenesis applied to occupational arsenic exposure." *Environ. Health Perspect.* 50(4): 293-308.
- Brown, C. C. et K. C. Chu (1983c)** "Implications of the multistage theory of carcinogenesis applied to occupational arsenic exposure." *J. Natl. Cancer Inst.* 70(3): 455-463.
- Cao, X., C. Hao, G. Wang, H. Yang, D. Chen, X. Wang, (2008)** "Sequential Extraction Combined with HPLC-ICP-MS for As Speciation in Dry Seafood Products" *Food Chem.* doi: 10.1016/j.foodchem. 2008.08.001
- Capar, S. G., W. R. Mindak et J. Cheng (2007)** "Analysis of food for toxic elements" *Anal. Bioanal. Chem.* 389(1): 159-169.
- Caruso, J. A., D. T. Heitkemper et C. B'Hymer (2001)** "An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple samples." *Analyst* 126: 136-140.
- Casteel, S. W., L. D. Brown, R. P. Cowart, L. W. Pace, E. Hoffman, G. M. Henningsen et C. P. Weis (1998)** "Bioavailability of arsenic in contaminated media." *Toxicol. Lett.* 95: 135.
- Caussy, D. (2003)** "Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic" *Ecotoxicol. Environ. Safety* 56: 164-173.
- Caussy, D., M. Gochfeld, E. Gurzau, C. Neagu et H. Ruedeke (2003)** "Lessons from case studies of metals:investigating exposure, bioavailability, and risk" *Ecotoxicol. Environ. Safety* 56: 45-51.
- Chen, C. J., M. M. Wu, S. S. Lee, J. D. Wang, S. H. Cheng et H. Y. Wu (1988)** "Atherogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well water. Multiple risk factors and related malignant neoplasms of blackfoot disease" *Arteriosclerosis* 8(5): 452-460.
- Chen, C. J., H. Y. Chiou, M. H. Chiang, L. J. Lin et T. Y. Tai (1996)** "Dose-Response Relationship Between Ischemic Heart Disease Mortality and Long-term Arsenic Exposure" *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*16: 504-510.
- Chen, Y. C., C. J. Amarasiriwardena, Y. M. Hsueh et D. C. Christiani (2002)** "Stability of Arsenic Species and Insoluble Arsenic in Human Urine." *Cancer Epidem. Biomar.* 11: 1427-1433.

- Chen, C. L., L. I. Hsu, H. Y. Chiou, Y. M. Hsueh, S. Y. Chen, M. M. Wu et C. J. Chen** (2004) "Ingested arsenic, cigarette smoking, and lung cancer risk: A follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan" *J. Am. Med. Assoc.* 292(24): 2984-2990.
- Chen, Z. L., K. F. Akter, M. M. Rahman et R. Naidu** (2007) "The separation of arsenic species in soils and plant tissues by anion-exchange chromatography with inductively coupled mass spectrometry using various mobile phases." *Microchem. J.* doi: 10.1016/j.microc.2007.10.007
- Chu, M. et D. Beauchemin** (2004) "Simple method to assess the maximum bio-accessibility of elements from food using flow injection and inductively coupled plasma mass spectrometry" *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19: 1213-1216.
- Chu, M et D. Beauchemin** (2005) "Méthode améliorée pour évaluer la bioaccessibilité maximale des éléments dans les aliments solides par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif" *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.*, 50 (5): 289.
- Chiou, H. Y., Y. M. Hsueh, K. F. Liaw, S. F. Horng, M. H. Chiang, Y. S. Pu, J. S. N. Lin, C. H. Huang, C. J. Chen** (1995) "Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: A seven- year follow-up study in Taiwan" *Cancer Res.* 55(6): 1296-1300.
- Choong, T. S. Y., T. G. Chuah, Y. Robiah, F. L. Gregory Koay et I. Azni** (2007) "Arsenic toxicity, health hazards and removal techniques from water: an overview." *Desalination* 217: 139-166.
- Cullen, W. R., B. C. McBride, A. W. Pickett et J. Reglinski** (1984) "The wood preservative chromated copper arsenate is a substrate for trimethylarsine biosynthesis" *Appl. Environ. Microbiol.* 47(2): 443-444.
- Cullen, W. R. et K. J. Reimer** (1989) "Arsenic Speciation in the Environment." *Chem. Rev.* 89: 713-784.
- Dagnac, T., A. Padro, R. Rubio et G. Rauret** (1998) "Optimisation of the extraction of arsenic species from mussels with low power focused microwaves by applying a Doehlert design. " *Anal. Chim. Acta* 364: 19-30.
- Datta, R., D. Sarkar, S. Sharma, K. Sand** (2006) "Arsenic biogeochemistry and human health risk assessment organo-arsenical pesticide-applied acidic and alkaline soils: An incubation study" *Sci. Total Environ.* 372: 39-48.
- Daus, B., J. Mattusch, A. Paschke, R. Wennrich et H. Weiss** (2000) "Kinetics of the arsenite oxidation in seepage water from a tin mill tailings pond." *Talanta* 58: 153-164.

- Daus, B., R. Wennrich, P. Morgenstern, H. Wei, E. H. L. Palmieri, H. A. Nalini, L. V. Leonel, R. P. G. Monteiro et R. M. Moreira (2005)** "Arsenic Speciation in Plant Samples from the Iron Quadrangle, Minas Gerais, Brazil." *Mikrochim. acta* 151(3-4): 175-180.
- Davis, A., M. V. Ruby et P. D. Bergstrom (1992).** "Bioavailability of arsenic and lead in soils from butte, Montana, mining district." *Environ. Sci. and Technol.* 26 (3): 461-468.
- De la Calle, M. B., D. Vendelbo, A. Bernreuther, H. Emteborg, I. Verbist et P. Taylor (2008)** "Report of the fourth interlaboratory comparison organised by the Community Reference Laboratory for Heavy Metals in Feed and Food : Total Cd, Pb, As, Hg and methylmercury in seafood" Community Reference Laboratory for Heavy Metals in Feed and Food (CRL-HM), Belgique.
- Devesa, V., M. A. Súnier, V. W. M. Lai, S. C. R. Granchinho, J. M. Martínez, D. Vélez, W. R. Cullen et R. Montoro (2002)** "Determination of arsenic species in a freshwater crustacean *Procambarus clarkii*." *Appl. Organomet. Chem.* 16(3): 123-132.
- Ding, Z., B. Zheng, J. Long, H. E. Belkin, R. B. Finkelman, C. Chen, D. Zhou et Y. Zhou (2001)** "Geological and geochemical characteristics of high arsenic coals from endemic arsenosis areas in southwestern Guizhou Province, China" *Appl. Geochem.* 16: 1353-1360.
- Directive 98/83/CE (1998)** "Directive du Conseil de l'Union européenne n° 98/83/CE du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine" *Journal officiel des communautés européennes*, 3 novembre 1998.  
<http://aida.ineris.fr/textes/directives/text0507.htm>
- Dopp, E., L. M. Hartmann, A. M. Florea, U. von Recklinghausen, R. Pieper, B. Shokouhi, A. W. Rettenmeier, A. V. Hirner et G. Obe (2004)** "Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells" *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201: 156-165.
- Duarte, F. A., J. S. F. Pereira, M. F. Mesko, F. Goldschmidt, E. M. de Moraes Flores et V. L. Dressler (2007)** "Evaluation of Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Arsenic Speciation in Water from Industrial Treatment of Shale.", *Spectrochim. Acta B* 62(9): 978-984.
- Ebisuda, K., T. Kunito, R. Kubota et S. Tanabe (2002)** "Arsenic concentrations and speciation in the tissues of ringed seal (*phoca hispida*) from Pangnirtung, Canada." *Appl. Organometal. Chem.*(16): 451-457.
- Edmonds, J. S. et K. A. Francesconi (1993)** "Arsenic in Seafoods : Human Health Aspects and Regulations." *Mar. Pollut. Bull.* 26(12): 665-674.

- European Commission** (2001) "Ambient air pollution by As, Cd and Ni compounds. Position paper, working group on arsenic, cadmium and nickel compounds" DG Environment, 315.
- Enterline, P. E. Et G. M. Marsh** (1982) "Cancer among workers exposed to arsenic and other substances in a copper smelter." *Am. J. Epidemiol.* 116(6) 895-911.
- Falk, K. et H. Emons** (2000) "Speciation of arsenic compounds by ion-exchange HPLC-ICP-MS with different nebulizers." *J. Anal. At. Spectrom.* 15: 643-649.
- Feldmann, J., V. W.-M. Lai, W. R. Cullen, M. Ma, X. Lu et X. C. Le** (1999) "Sample Preparation and Storage Can Change Arsenic Speciation in Human Urine." *Clin. Chem.* 45(11): 1988-1997.
- Feldmann, J., K. John et P. Pengprecha** (2000) "Arsenic metabolism in seaweed-eating sheep from Northern Scotland." *Fresenius J. Anal. Chem.* 368: 116-121.
- Fengxiang, X. H., Y. Su, D. L. Monts, M. J. Plodinec, A. Banin et G. E. Triplett** (2003) "Assessment of the global industrial-age anthropogenic arsenic contamination" *Naturwissenschaften* 90: 395-401.
- Fitzpatrick, S., L. Ebdon et M. Foulkes** (2002) "Separation and Detection of Arsenic and Selenium Species in Environmental Samples by HPLC-ICP-MS." *Int. J. Environ. An. Ch.* 82: 835-841.
- Foster, S., W. Maher, F. Krikowa et S. Apte** (2007) "A microwave-assisted sequential extraction of water and dilute acid soluble arsenic species from marine plant and animal tissues" *Talanta* 71: 537-549.
- Francesconi, K. A. et J. S. Edmonds** (1997) "Arsenic and marine organisms." *Adv. Inorg. Chem.* 44: 147-189.
- Francesconi, K. A., S. Khokiattiwong, W. Goessler, S. N. Pedersen et M. Pavkov** (2000) "A new arsenobetaine from marine organisms identified by liquid chromatography–mass spectrometry." *Chem. Commun.* 1083-1084.
- Francesconi, K. A. et D. Kuehnelt** (2004) "Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications 2000-2003." *Analyst* 129: 373-395.
- Freeman, G. B., R. A. Schoof, M. V. Ruby, A. O. Davis, J. A. Dill, S. C. Lia, C. A. Lapin et P. D. Bergstrom** (1995) "Bioavailability of arsenic in soil and house dust impacted by smelter activities following oral administration in cynomolgus monkeys." *Fund. Appl. Toxicol.* 28 (2): 215-222.

- Fricke**, M. W., P. A. Creed, A. N. Parks, J. A. Shoemaker, C. A. Schwegel et J. T. Creed (2004) "Extraction and detection of a new arsine sulfide containing arsenosugar in molluscs by IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS" *J. Anal. At. Spectrom.* 19: 1454-1459.
- Gallagher**, P. A., J. A. Shoemaker, X. Wei, C. A. Brockhoff-Schwegel et J. T. Creed (2001) "Extraction and detection of arsenicals in seaweed via accelerated solvent extraction with ion chromatographic separation and ICP-MS detection." *Fresenius J. Anal. Chem.* 369(1): 71-80.
- Gallagher**, P. A., S. Murray, X. Wei, C. A. Schwegel et J. T. Creed (2002) "An evaluation of sample dispersion media used with accelerated solvent extraction for the extraction and recovery of arsenicals from LFB and DORM-2." *J. Anal. At. Spectrom.* 17: 581-586.
- Gebel**, T. W. (2002) "Arsenic methylation is a process of detoxification through accelerated excretion" 205(6): 505-508.
- Geiszinger**, A., W. Goessler, D. Kuehnelt, K. Francesconi et W. Kosmus (1998) "Determination of Arsenic Compounds in Earthworms." *Environ. Sci. Technol.* 32: 2238-2243.
- Gherbi**, L (2008) "Développement et validation d'une méthode de dosage multi-élémentaire par ICPMS avec utilisation d'une chambre de collision (CCT) dans les denrées alimentaires après minéralisation par micro-ondes en système fermé" Mémoire Master Recherche 2, AFSSA-LERQAP-CIME, Maisons Alfort, France.
- Goessler**, W., D. Kuehnelt, C. Schlagenhaufen, Z. Slejkovec et K. J. Irgolic (1998) "Arsenobetaine and other arsenic compounds in the National Research Council of Canada Certified Reference Materials DORM 1 and DORM 2." *J. Anal. At. Spectrom.* 13: 183-187.
- Gomez-Ariza**, J. L., D. Sánchez-Rodas, I. Giráldez et E. Morales (2000) "Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS." *Analyst* 3: 401-407.
- Gong**, Z., X. Lu, M. Ma, C. Watt et X. C. Le (2002) "Arsenic speciation analysis." *Talanta* 58: 77-96.
- Gong**, Z., X. Lu, C. Watt, B. Wen, B. He, J. Mumford, Z. Ning, Y. Xia et X. X. Le (2006) "Speciation analysis of arsenic in groundwater from Inner Mongolia with an emphasis on acid-leachable particulate arsenic." *Anal. Chim. Acta*, 555: 181-187.
- Goupy**, J. (1988) "La méthode des plans d'expériences, optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats." Editions Dunod, France.
- Guérin**, T. (1998) "Spéciation multi-élémentaire de l'arsenic, sélénium, antimoine et tellure dans des eaux et des lixiviats de sols par couplage HPLC-ICP-MS" Thèse de doctorat, Université de Pau et des pays de l'Adour, France.

- Guérin, T., A. Astruc et M. Astruc (1999)** "Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors : a review of the main separation techniques." *Talanta* 50: 1-24.
- Hanaoka, K., W. Goessler, K. Yoshida et Y. Fujitaka (1999)** "Arsenocholine- and Dimethylated arsenic-containing Lipids in Star-spotted Shark *Mustelus Manazo*." *Appl. Organometal. Chem.* 13: 765-770.
- Hanaoka, K., Y. Tanaka, Y. Nagata, K. Yoshida et T. Kaise (2001a)** "Water-soluble arsenic residues from several arsenolipids occurring in the tissues of the star-spotted shark *Mustelus manazo*" *Appl. Organomet. Chem.* 15: 299-305.
- Hanaoka, K., H. Ohno, N. Wada, S. Ueno, W. Goessler, D. Kuehnelt, C. Schlagenhafen, T. Kaise et K. J. Irgolic (2001b)** "Occurrence of organo-arsenicals in jellyfishes and their mucus." *Chemosphere* 44(4): 743-749.
- Hanaoka, K., W. Goessler, H. Ohno, K. J. Irgolic et T. Kaise (2001c)** "Formation of toxic arsenical in roasted muscles of marine animals." *Appl. Organometal. Chem.* 15(1): 61-66.
- Hansen, H. R., R. Pickford, J. Thomas-Oates, M. Jaspars et J. Feldmann (2004)** "2-Dimethylarsinothiyl Acetic Acid Identified in a Biological Sample: The First Occurrence of a Mammalian Arsenothioyl Metabolite" *Angew. Chem. Int. Ed.* 43: 337-340.
- Heitkemper, D. T., N. P. Vela, K. R. Stewart et C. S. Westphal (2001)** "Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry." *J. Anal. At. Spectrom.* 16: 299-306.
- Hirano, S., Y. Kobayashi, X. Cui, S. Kanno, T. Hayakawa et A. Shraim (2004)** "The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells : important roles of thiol compounds" *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198: 458-467.
- Hirata, S. et H. Toshimitsu (2005)** "Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS." *Anal. Bioanal. Chem.* 383(3): 454-460.
- Hirata, S., H. Toshimitsu et M. Aihara (2006)** "Determination of Arsenic Species in Marine Samples by HPLC-ICP-MS." *Anal. Sci.* 2006, 22(1): 39-45.
- Hughes M. F. (2002)** "Arsenic toxicity and potential mechanisms of actions" *Toxicol. Lett.* 133: 1-16.
- Hsueh, Y. M., G. S. Cheng, M. M. Wu, H. S. Yu, T. L. Kuo et C. J. Chen (1995)** "Multiple risk factors associated with arsenic induced skin cancer: effects of chronic liver disease and malnutritional status." *Br. J. Cancer* 71: 109-114.
- IARC (1987)** "Arsenic and arsenic compounds" Monographs on the evaluation of carcinogenic Risks to human, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- Intawongse**, M. et J. R. Dean (2006) "*In-vitro* testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples" *Trends Anal. Chem.* 25(9): 876-886.
- Jackson**, B. P. et P. Bertsch (2001) "Determination of Arsenic Speciation in Poultry Wastes by IC-ICP-MS." *Environ. Sci. Technol.* 35(24): 4868-4873.
- Jackson**, B. P., P. L. S. Allen, W. A. Hopkins et P. M. Bertsch (2002) "Trace element speciation in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from a fly ash settling basin by liquid chromatography-ICP-MS." *Anal. Bioanal. Chem.* 374: 203-211.
- Jackson**, B. P., P. Bertsch, M. L. Cabrera, J. J. Camberato, J. C. Seaman et C. W. Wood (2003) "Trace element speciation in poultry litter" *J. Environ. Qual.* 32: 535-540.
- Jain**, C. K. et I. Ali (2000) "Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques" *Water Res.* 34: 4304-4312.
- Johnson**, L.R. (1985) "Gastrointestinal Physiology." Mosby Compagny, 3<sup>rd</sup> edition, St. Louis, USA.
- Juhasz**, A. L., E. Smith, J. Weber, M. Rees, A. Rofe, T. Kuchel, L. Sansom et R. Naidu (2006) "In Vivo Assessment of Arsenic Bioavailability in Rice and Its Significance for Human Health Risk Assessment" *Environ. Health. Perspect.* 114(12): 1826-1831.
- Juhasz**, A. L., E. Smith, J. Weber, M. Rees, A. Rofe, T. Kuchel, L. Sansom et R. Naidu (2007a) "Comparison of in vivo and in vitro methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils" *Chemosphere* 69: 961-966.
- Juhasz**, A. L., E. Smith, J. Weber, M. Rees, A. Rofe, T. Kuchel, L. Sansom et R. Naidu. (2007b) "*In vitro* Assessment of Arsenic Bioaccessibility in Contaminated (Anthropogenic and Geogenic) Soils." *Chemosphere* 69: 69-78.
- Juhasz**, A. L., E. Smith, J. Weber, R. Naidu, M. Rees, A. Rofe, T. Kuchel et L. Sansom (2008a) "Effect of soil ageing on in vivo arsenic bioavailability in two dissimilar soils" *Chemosphere* 71: 2180-2186.
- Juhasz**, A. L., E. Smith, J. Weber, M. Rees, A. Rofe, T. Kuchel, L. Sansom et R. Naidu (2008b) " Application of an in vivo swine model for the determination of arsenic bioavailability in contaminated vegetables" *Chemosphere* 71: 1963-1969.
- Kahn**, M., R. Ralm, E. Schmeisser, B. Vallant, K. A. Francesconi et W. Goessler (2005) "Two Novel Thio-Arsenosugars in Scallops Identified with HPLC-ICPMS and HPLC-ESMS." *Environ. Chem.* 2: 171-176.
- Kaise**, T., Y. Horiguchi, S. Fukui, K. Shiomi, M. Chino et T. Kikuchi (1992) "Acute toxicity and metabolism of arsenocholine in mice." *Appl. Organometal. Chem.* 6: 369-373.



- Kaltreider**, R. C., A. M. Davis, J. P. Lariviere et J. W. Hamilton (2001) "Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor" *Environ. Health Perspect.* 109 (3): 245-251.
- Kannamkumarath**, S. S., K. Wrobel et J. A. Caruso (2004) "Speciation of arsenic in different types of nuts by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry." *J. Agr. Food Chem.* 52(6): 1458-63.
- Karthikeyan**, S. H., K. Honda, O. Shikino et S. Hirata (2003) "Speciation of arsenic in marine algae and commercial shrimp using ion chromatography with ICP-MS detection." *Atom. Spectrosc.* 24(3): 79-88.
- Karthikeyan**, S. H. (2004) "Ion chromatography-ICP-MS determination of arsenic species in marine samples." *Appl. Organometal. Chem.* 18: 323-30.
- Karthikeyan**, S. H., S et C. S. P. Iyer (2004) "Determination of arsenic species by microwave-assisted extraction followed by ion-pair chromatography-ICP-MS : analysis of reference materials and fish tissues." *Int. J. Environ. An. Ch.* 84(8): 573-82.
- Kim**, M. J., J. Nriagu et S. Haack (2003) "Arsenic behavior in newly drilled wells" *Chemosphere* 52: 623-633.
- Kirby**, J. et W. Maher (2002) "Tissue accumulation and distribution of arsenic compounds in three marine fish species: relationship to trophic position." *Appl. Organometal. Chem.* 16(2): 108-115.
- Kirby**, J., W. Maher, A. Chariton et F. Krikowa (2002) "Arsenic concentrations and speciation in a temperate mangrove ecosystem, NSW, Australia." *Appl. Organometal. Chem.* 16: 192-201.
- Koch**, I., K. McPherson, P. Smith, L. Easton, K. G. Doe et K. J. Reimer (2007a) "Arsenic bioaccessibility and speciation in clams and seaweed from a contaminated marine environment" *Mar. Pollut. Bull.* 54: 586-594.
- Koch**, I., S. Sylvester, V. W. M. Lai, A. Owen, K. J. Reimer et W. R. Cullen (2007b) "Bioaccessibility and excretion of arsenic in Niu Huang Jie Du Pian pills" *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222(3): 357-364.
- Koellensperger**, G., J. Nurmi, S. Hann, G. Stingeder, W. J. Fitz et W. W. Wenzel (2002) "CE-ICP-SFMS and HPIC-ICP-SFMS for arsenic speciation in soil solution and soil water extracts." *J. Anal. At. Spectrom.* 17: 1042-1047.

- Kohlmeyer, U., J. Kuballa et E. Jantzen (2002)** "Simultaneous separation of 17 inorganic and organic arsenic compounds in marine biota by means of high-performance liquid chromatography/ inductively coupled plasma mass spectrometry." *Rapid Commun. Mass Sp.* 16: 965-974.
- Kohlmeyer, U., E. Jantzen, J. Kuballa et S. Jakubik (2003)** "Benefits of high resolution IC–ICP–MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin." *Anal. Bioanal. Chem.* 377: 6-13.
- Kohlmeyer, U., S. Jakubik, J. Kuballa et E. Jantzen (2005)** "Determination of Arsenic Species in Fish Oil After Acid Digestion." *Mikrochim. Acta* 151(3-4): 249-255.
- Kubota, R., T. Kunito et S. Tanabe (2002)** "Chemical speciation of arsenic in the livers of higher trophic marine animals." *Mar. Pollut. Bull.* 45: 218-223.
- Kuehnelt, D., K. J. Irgolic et W. Goessler (2001)** "Comparison of three methods for the extraction of arsenic compounds from the NRCC standard reference material DORM-2 and the brown alga *Hijiki fuziforme*." *Appl. Organometal. Chem.* 15(6): 445-456.
- Lai, V. W. M., W. R. Cullen, C. F. Harrington et K. J. Reimer (1998)** "Seasonal changes in arsenic speciation in *Fucus* species." *Appl. Organometal. Chem.* 12(4): 243-251.
- Lai, V. W. M., W. R. Cullen et S. Ray (2001)** "Arsenic speciation in sea scallop gonads." *Appl. Organometal. Chem.* 15(6): 533-538.
- Lai, M. K., A. S. Beach, W. R. Cullen, S. Ray et K. J. Reimer (2002)** "Arsenic speciation in whelks, *Buccinum undatum*." *Appl. Organometal. Chem.*(16): 458-462.
- Langdon, C. J., A. A. Meharg, J. Feldmann, T. Balgar, J. Charnock, M. Farquhar, T. G. Pearce, K. T. Semple et J. Cotter-Howells (2002)** "Arsenic-speciation in arsenate-resistant and non-resistant populations of the earthworm, *Lumbricus rubellus*." *J. Environ. Monit.* 4: 603–608.
- Laparra, J. M., D. Vélez, R. Montoro, R. Barbera et R. Farré (2003)** "Estimation of Arsenic Bioaccessibility in Edible Seaweed by an in Vitro Digestion Method" *J. Agric. Food Chem.* 51, 6080-6085.
- Laparra, J. M., D. Vélez, R. Barbera, R. Farré et R. Montoro (2005)** "Bioavailability of inorganic arsenic in cooked rice : practical aspects for human health risk assessments." *J. Agric. Food Chem.* 53: 8829-8833.
- Larsen, E. H., M. Hansen et W. Gössler (1998)** "Speciation and health risk considerations of arsenic in the edible mushroom *Laccaria amethystina* collected from contaminated and uncontaminated locations." *Appl. Organometal. Chem.* 12(4): 285-291.

- Larsen**, E. H., J. Engman, J. J. Sloth, M. Hansen et L. Jorhem (2005) "Determination of inorganic arsenic in white fish using microwave-assisted alkaline alcoholic sample dissolution and HPLC-ICP-MS." *Anal. Bioanal. Chem.* 381(2): 339-46.
- Le**, X. C., X. F. Li, V. W. M. Lai, M. Ma, S. Yalcin et J. Feldmann (1998) "Simultaneous speciation of selenium and arsenic using elevated temperature liquid chromatography separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection." *Spectrochim. Acta B* 53(6-8): 899-909.
- Le, X. C.**, X. Lu et X. F. Li (2004) "Arsenic speciation." *Anal. Chem.* 76(1): 26A-36A.
- Leblanc**, J. C., L. Malmauret, T. Guérin, F. Bordet, B. Boursier et P. Verger (2000) "Estimation of the dietary intake of pesticides residues, lead, cadmium, arsenic and radionuclides by the French population through the duplicate portions method." *Food Addit. Contam.* 17(11): 925-933.
- Leblanc**, J. C., T. Guérin, L. Noël, G. Calamassi-Tran, J. L. Volatier et P. Verger (2005) "Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French Total Diet Study." *Food Addit. Contam.* 22(7): 624-641.
- Leblanc**, J. C. (2006) "CALIPSO - Etude des Consommations ALimentaires de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, PolluantS et Omega 3" INRA/INAP-G, Paris, et AFSSA, Maisons-Alfort.
- Leermakers**, M., W. Baeyens, M. De Gietera, B. Smedts, C. Meert, H. C. De Bisschop, R. Morabito et P. Quevauviller (2006) "Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation." *Trends Anal. Chem.* 25(1): 1-10.
- Li**, W., C. Wei, C. Zhang, M. Van Hulle, R. Cornelis et X. Zhang (2003) "A survey of arsenic species in chinese seafood." *Food Chem. Toxicol.* 41(8): 1103-1110.
- Lindemann**, T., A. Prange, W. Dannecker et B. Neidhart (1999) "Simultaneous determination of arsenic, selenium and antimony species using HPLC/ICP-MS." *Fresenius J. Anal. Chem.* 364: 462-466.
- Lindemann**, T., A. Prange, W. Dannecker et B. Neidhart (2000) "Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS." *Fresenius J. Anal. Chem.* 368(2-3): 214-20.
- Łobiński**, R., D. Schaumloffel et J. Szpunar (2006) "Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry" *Mass Spectrom. Rev.* 25(2): 255-289.
- Lombi**, E., R. S. Sletten et W. W. Wenzel (2000) "Sequentially extracted arsenic from different size fractions of contaminated soils" *Water, Air, Soil Poll.* 124: 319-332.

- Londesborough, S., J. Mattusch et R. Wennrich (1999)** "Separation of organic and inorganic arsenic species by HPLC-ICP-MS." *Fresenius J. Anal. Chem.* 363: 577-581.
- Lorenza, M. L., M. Ketterer, J. Lowry, J. Simon, M. Dawson, R. Poppenga (1996)** "Bioavailability of arsenic and lead in environmental substrates" EPA 910/R-96-002. US Environmental Protection Agency, Region 10, Seattle.
- Madsen, A. D., W. Goessler, S. N. Pedersen et K. A. Francesconi (2000)** "Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC-electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies." *J. Anal. At. Spectrom.* 15: 657-662.
- Mandal, B. K., Y. Ogra et K. T. Suzuki (2001)** "Identification of Dimethylarsinous and Monomethylarsonous Acids in Human Urine of the Arsenic-Affected Areas in West Bengal, India." *Chem. Res. Toxicol.* 14: 371-378.
- Mandal, B. K. et K. T. Suzuki (2002)** "Arsenic round the world: a review." *Talanta* 58: 201-235.
- Mandal, B. K., Y. Ogra, K. T. Suzuki (2003)** "Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189: 73-83.
- Mandal, B. K., Y. Ogra, K. Anzai et K. T. Suzuki (2004)** "Speciation of arsenic in biological samples." *Toxicol. Appl. Pharm.* 198: 307-318.
- Mato-Fernandez, M. J., J. R. Otero-Rey, J. Moreda-Pineiro, E. Alonso-Rodriguez, P. Lopez-Mahia, S. Muniategui-Lorenzo et D. Prada-Rodriguez (2007)** "Arsenic extraction in marine biological materials using pressurised liquid extraction." *Talanta* 71: 515-520.
- Matschullat, J. (2000)** "Arsenic in the geosphere - a review" *Sci. Total Environ.* 249: 297-312.
- Mattusch, J. et R. Wennrich (1998)** "Determination of Anionic, Neutral, and Cationic Species of Arsenic by Ion Chromatography with ICPMS Detection in Environmental Samples." *Anal. Chem.* 70: 3649-3655.
- Mattusch, J., R. Wennrich, A. C. Schmidt et W. Reisser (2000)** "Determination of arsenic species in water, soils and plants." *Fresenius J. Anal. Chem.* 366: 200-203.
- McKiernan, J. W., J. T. Creed, C. A. Brockhov, J. A. Caruso et R. M. Lorenzana (1999)** "A comparison of automated and traditional methods for the extraction of arsenicals from fish." *J. Anal. At. Spectrom.* 14: 607-613.
- McSheehy, S. et J. Szpunar (2000)** "Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection." *J. Anal. At. Spectrom.* 15: 79-87.

- McSheehy, S., P. Pohl, R. Obiski et J. Szpunar (2001a)** "Complementarity of multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray MS-MS for speciation analysis of arsenic in algae." *Anal. Chim. Acta* 440: 3-16.
- McSheehy, S., P. Pohl, R. Lobinski et J. Szpunar (2001b)** "Investigation of arsenic speciation in oyster test reference material by multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS)." *Analyst* 126(7): 1055-62.
- McSheehy, S., P. Pohl, D. Vélez et J. Szpunar (2002)** "Multidimensional liquid chromatography with parallel ICP MS and electrospray MS/MS detection as a tool for the characterization of arsenic species in algae." *Anal. Bioanal. Chem.* 372: 457-466.
- Miller, D. D., B. R. Schriker, R. R. Rasmussen et D. Van Campen (1981)** "An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals." *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 2248-2256.
- Milstein, L. S., A. Essader, C. Murrell, E. D. Pellizzari, R. A. Fernando, J. H. Raymer et O. Akinbo (2003)** "Sample Preparation, Extraction Efficiency, and Determination of Six Arsenic Species Present in Food Composites." *J. Agric. Food Chem.* 51(15): 4180-4184.
- Mir, K. A., A. Rutter, I. Koch, P. Smith, K. J. Reimer et J. S. Poland (2007)** "Extraction and speciation of arsenic in plants grown on arsenic contaminated soils" *Talanta* 72: 1507-1518.
- Mizuta, N., M. Mizuta et F. Ito (1956)** "An out break of acute arsenic poisoning caused by arsenic-contaminated soy-sauce (shoyu)." *Bull. Yamaguchi Med. Sch.* 4: 131-149.
- Moldovan, M., M. M. Gomez, M. A. Palacios et C. Camara (1998)** "Arsenic speciation in water and human urine by HPLC-ICP-MS and HPLC-MO-HG-AAS." *Microchem. J.* 59: 89-99.
- Morton, W., G. Starr, D. Pohl, J. Stoner, S. Wagner et D. Weswig (1976)** "Skin cancer and water arsenic in Lane County, Oregon." *Cancer* 37(5): 2523-2532.
- Muñoz, O., D. Vélez et R. Montoro (1999)** "Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(III) + As(V)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry" *Analyst* 24: 601-607.
- Nakazato, T., T. Taniguchi, H. Tao, M. Tominaga et A. Miyazaki (2000)** "Ion-exclusion chromatography combined with ICP-MS and hydride generation-ICP-MS for the determination of arsenic species in biological matrices." *J. Anal. At. Spectrom.* 15: 1546-1552.
- Narukawa, T., T. Kuroiwa, T. Yarita et K. Chiba (2005)** "Analytical sensitivity of arsenobetaine on atomic spectrometric analysis and the purity of synthetic arsenobetaine" *Appl. Organomet. Chem.* 20(9): 565-572.

- Narukawa, T., K. Inagaki, T. Kuroiwa et K. Chiba (2007)** "The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS" *Talanta* doi:10.1016/j.talanta.2008.07.005
- Neff, J. M. (1997)** "Ecotoxicology of Arsenic in the Marine Environment." *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 917-927.
- Ng, J. C., S. Q. Kratzmann, H. Crawley, B. Chiswell, M. R. Moore (1998)** "Speciation and absolute bioavailability. Risk assessment of arsenic-contaminated sites in a residential suburb in Canberra." *Analyst* 123 (50): 889-892.
- Ng, J. C., J. Wang et A. Shraim (2003)** "A global health problem caused by arsenic from natural sources" *Chemosphere* 52: 1353-1359.
- Noël, L., J. C. Leblanc et T. Guérin (2003)** "Determination of several elements in duplicate meals from catering establishment using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: estimation of daily dietary intake." *Food Addit. Cont.* 20(1): 44-56.
- Noël, L., V. Dufailly, N. Lemahieu, C. Vastel et T. Guérin (2005)** "Simultaneous analysis of cadmium, lead, mercury, and arsenic content in foodstuffs of animal origin by inductively coupled plasma/mass spectrometry after closed vessel microwave digestion: method validation." *J. AOAC Int.* 88(6): 1811-1821.
- OMS (2001)** "L'arsenic dans l'eau de boisson" Organisation Mondiale de la Santé, Genève, Suisse.
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/fr/>
- Pan, F., J. F. Tyson et P. C. Uden (2007)** "Simultaneous speciation of arsenic and selenium in human urine by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry" *J. Anal. At. Spectrom.* 22: 931-937.
- Pardo-Martínez, M., P. Viñas, A. Fisher et S. J. Hill (2001)** "Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods." *Anal. Chim. Acta* 441: 29-36.
- Paré, J. J. R. et J. M. R. Bélanger (1994)** "Microwave-Assisted process (MAP) : a new tool for the analytical laboratory." *Trends Anal. Chem.* 13(4): 176-184.
- Parmar, S., L. M. Rundhaugen, L. Boehlke, M. Riley, C. Nabhan, A. Raji, J. L. Frater et M. S. Tallman (2004)** "Phase II trial of arsenic trioxide in relapsed and refractory acute myeloid leukemia, secondary leukemia and/or newly diagnosed patients at least 65 years old" *Leuk. Res.* 28(9): 909-919.

- Pergantis**, S. A., E. M. Heithmar et T. Hinners (1997) "Speciation of arsenic animal-feed additives using microbore high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry" *Analyst* 10: 1063-1068.
- Peters**, G. R., R. F. McCurdy et J. T. Hindmarsh (1996) "Environmental aspects of arsenic toxicity" *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 33(6): 457-493.
- Petrick**, J. S., F. Ayala-Fierro, W. R. Cullen, D. E. Carter et H. V. Aposhian (2000) "Monomethylarsonous Acid (MMA<sup>III</sup>) Is More Toxic Than Arsenite in Chang Human Hepatocytes." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163: 203-207.
- Pichard**, A., M. Bisson, N. Houeix, C. Hulot, G. Lacroix, J. P. Lefèvre, S. Lévêque, H. Magaud, A. Morin, L. Cornu et C. Gillet (2005) "Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Arsenic et ses dérivés." INERIS, 3 février 2005.
- Pizarro**, I., M. Gómez, M. A. Palacios et C. Cámara (2003a) "Evaluation of stability of arsenic species in rice." *Anal. Bioanal. Chem.* 376: 102–109.
- Pizarro**, I., M. Gómez, C. Cámara et M. A. Palacios (2003b) "Arsenic speciation in environmental and biological samples. Extraction and stability studies." *Anal. Chim. Acta* 495(1-2): 85-98.
- Quaghebeur**, M., Z. Rengel et M. Smirk (2003) "Arsenic speciation in terrestrial plant material using microwave-assisted extraction, ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry." *J. Anal. At. Spectrom.* 18(2): 128-134.
- Raber**, G., K. A. Francesconi, K. J. Irgolic et W. Goessler (2000) "Determination of arsenosugars in algae with anion-exchange chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector." *Fresenius J. Anal. Chem.* 367: 181-188.
- Rabieh**, S., A. V. Hirnera et J. Matschullat (2008) "Determination of arsenic species in human urine using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)." *J. Anal. At. Spectrom.* 23: 544-549.
- Rattanachongkiat**, S., G. E. Millward et M. E. Foulkes (2004) "Determination of arsenic species in fish, crustacean and sediment samples from Thailand using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)." *J. Environ. Monitor.* 6(4): 254-61.
- Rieuwerts**, J. S., P. Searle and R. Buck (2006) "Bioaccessible arsenic in the home environment in southwest England" *Sci. Total Environ.* 371: 89-98.

- Ritsema**, R., L. Dukan, T. R. Navarro, W. (van)Leeuwen, N. Oliveira, P. Wolfs et E. Lebret (1998) "Speciation of arsenic compounds in urine by LC-ICP MS." *Appl. Organometal. Chem.* 12: 591-599.
- Rodriguez**, R. R., N. T. Basta, S. W. Casteel et L. W. Pace (1999) "An In Vitro Gastrointestinal Method To Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media" *Environ. Sci. Technol.* 33: 642-649.
- Rodriguez**, I. B., G. Raber et W. Goessler (2008) "Arsenic speciation in fish sauce samples determined by HPLC coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry" *Food Chem.* doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.054.
- Ronkart** , S. N., V. Laurent, P. Carbonnelle, N. Mabon, A. Copin et J-P. Barthélemy (2007) "Speciation of five arsenic species (arsenite, arsenate, MMAA, DMAA and AsBet) in different kind of water by HPLC-ICP-MS." *Chemosphere* 66: 738-745.
- Rowan**, J.T. et R.S. Houk (1989) "Attenuation of Polyatomic Ion Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry by Gas-Phase Collisions." *Appl. Spectrosc.* 43(6): 976-980.
- Ruby**, M.; A. Davis, R. Schoof, S. Eberle et C. M. Sellstone (1996) "Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test" *Environ. Sci. Technol* 30: 422-430.
- Ruiz-Chancho**, M. J., J. F. Lopez-Sanchez, E. Schmeisser, W. Goessler, K. A. Francesconi et R. Rubio (2008) "Arsenic speciation in plants growing in arsenic-contaminated sites." *Chemosphere* 71(8): 1522-1530
- Sadiq**, M. (1997) "Arsenic chemistry in soils: an overview of thermodynamic predictions and fields observations" *Water, Air, Soil Pollut.*, 93: 117-136.
- Sado**, G. et M. C.Sado (1991) "Les plans d'expériences, de l'expérimentation à l'assurance qualité." Editions Afnor technique, France.
- Sakai**, T., Y. Inoue, Y. Date, T. Aoyama, K. Yoshida et G. Endo (2001) "Simultaneous determination of neutral, anionic and cationic compounds within one chromatographic run using an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector." *Appl. Organometal. Chem.* 15(4): 285-290.
- Sanz**, E., R. Munoz-Olivas et C. Camara (2005a) "Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples." *J. Chromatogr. A* 1097: 1-8.
- Sanz**, E., R. Munoz-Olivas et C. Camara (2005b) "A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe." *Anal. Chim. Acta* 535: 227-235.



- Sarkar**, D. et R. Datta (2003) "A modified in-vitro method to assess bioavailable arsenic in pesticide-applied soils" *Environ. Pollut.* 126: 363-366.
- Saverwyns**, S., X. Zhang et F. Vanhaecke (1997) "Speciation of Six Arsenic Compounds Using High-performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry With Sample Introduction by Thermospray Nebulization." *J. Anal. At. Spectrom.* 12: 1047-1052.
- Schaeffer**, R., K. A. Francesconi, N. Kienzl, C. Soeroes, P. Fodor, L. Varadi, R. Raml, W. Goessler et D. Kuehnelt (2006) "Arsenic speciation in freshwater organisms from the river Danube in Hungary." *Talanta* 69(4): 856-65.
- Schmeisser**, E., W. Goessler, N. Kienzl et K. A. Francesconi (2004) "Volatile Analytes Formed from Arsenosugars: Determination by HPLC-HG-ICPMS and Implications for Arsenic Speciation Analyses." *Anal. Chem.* 76: 418-423.
- Schmidt**, A. C., W. Reisser, J. Mattusch, P. Popp et R. Wennrich (2000) "Evaluation of extraction procedures for the ion chromatographic determination of arsenic species in plant materials." *J. Chromatogr. A* 889(1-2): 83-91.
- Schoof**, R. A., L. J. Yost, J. Eickhoff, E. A. Crecelius, D. W. Cragin, D. M. Meacher et D. B. Menzel (1999) "A market basket survey of inorganic arsenic in food." *Food Chem. Toxicol.* 37: 839-846.
- SCOOP Task 3.2.11** (2004) "Assessment of the dietary exposure to lead, cadmium, mercury and arsenic of the population of the EU Member States." Rapport final, Directorate-General Health and Consumer Protection.  
[http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop\\_3-2-11\\_heavy\\_metals\\_report\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-11_heavy_metals_report_en.pdf)
- Seidel**, A., J. J. Waypa et M. Elimelech (2001) "Role of charge (Donnan) exclusion in removal of arsenic from water by a negatively charged porous nanofiltration membrane" *Environ. Engin. Sci.* 18, 105-113.
- Seixas**, S., P. Bustamante et G. J. Pierce (2005) "Interannual patterns of variation in concentrations of trace elements in arms of *Octopus vulgaris*." *Chemosphere* 59(8): 1113-24.
- Simon**, S., H. Tran, F. Pannier et M. Potin-Gautier (2004) "Simultaneous determination of twelve inorganic and organic arsenic compounds by liquid chromatography-ultraviolet irradiation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry" *J. Chromatogr. A* 1024: 105-113.
- Sloth**, J. J., E. H. Larsen et K. Julshamn (2003) "Determination of organoarsenic species in marine samples using gradient elution cation exchange HPLC-ICP-MS." *J. Anal. At. Spectrom.* 18(5): 452-459.

- Sloth, J. J.** (2004) "Speciation analysis of arsenic : development of selective methodologies for assessment of seafood safety" Thèse de doctorat, University of Bergen, Norway.
- Sloth, J. J., E. H. Larsen et K. Julshamn** (2005) "Survey of Inorganic Arsenic in Marine Animals and Marine Certified Reference Materials by Anion Exchange High-Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry." *J. Agric. Food Chem.*, 53 (15): 6011 -6018.
- Smedley, P.L. et D. G. Kinniburgh** (2002) "A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters" *Appl. Geochem.* 17: 517-569.
- Smith, A. H., M. Goycolea, R. Haque et M. L. Biggs** (1998) "Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of northern chile due to arsenic in drinking water." *Amer. J. Epidemiol.* 147: 660-669.
- Smith, E., R. Naidu, J. Weber et A. L. Juhasz** (2008) "The impact of sequestration on the bioaccessibility of arsenic in long-term contaminated soils" *Chemosphere* 71(4): 773-780.
- Soeroes, C., W. Goessler, K. A. Francesconi, E. Schmeisser, R. Raml, N. Kienzl, M. Kahn, P. Fodora et D. Kuehnelt** (2005) "Thio arsenosugars in freshwater mussels from the Danube in Hungary." *J. Environ. Monit.* 7: 688-692.
- Styblo, M., L. M. Del Razo, L. Vega, D. R. Germolec, E. L. LeCluyse, G. A. Hamilton, W. Reed, C. Wang, W. R. Cullen et D. J. Thomas** (2000) "Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells." *Arch. Toxicol.* 74: 289-299.
- Styblo, M., Z. Drobná, I. Jaspers, S. Lin et D. J. Thomas** (2002) "The Role of Biomethylation in Toxicity and Carcinogenicity of Arsenic: A Research Update." *Environ. Health Persp.* 110(5): 767-771.
- Suner, M., V. Devesa, O. Munoz, D. Velez et R. Montoro** (2001) "Application of column switching in high-performance liquid chromatography with on-line thermo-oxidation and detection by HG-AAS and HG-AFS fir the analysis of organoarsenical species in seafood samples." *J. Anal. At. Spectrom.* 16: 390-397.
- Suzuki, K. T., T. Tomita, Y. Ogra et M. Ohmichi** (2001) "Glutathione-conjugated Arsenics in the Potential Hepato-enteric Circulation in Rats." *Chem. Res. Toxicol.* 14: 1604-1611.
- Suzuki, K. T., B. K. Mandal et Y. Ogra** (2002) "Speciation of arsenic in body fluids." *Talanta* 58(1): 111-119.

- Szymańska-Chabowska, A., J. Antonowicz-Juchniewicz et R. Andrzejak (2002)** "Some aspects of arsenic toxicity and carcinogenicity in living organism with special regard to its influence on cardiovascular system, blood and bone marrow" *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 15(2): 101-116.
- Tang, X. Y., Y. G. Zhu, X. Q. Shan, R. McLaren et J. Duan (2007)** "The ageing effect on the bioaccessibility and fractionation of arsenic in soils from China" *Chemosphere* 66: 1183-1190.
- Taylor, A., S. Branch, M. P. Day, M. Patriarca et M. White (2006)** "Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages" *J. Anal. At. Spectrom.* 21(4): 439-491.
- Taylor, A., S. Branch, M. P. Day, M. Patriarca et M. White (2007)** "Clinical and biological materials, foods and beverages" *J. Anal. At. Spectrom.* 22(4): 415-456.
- Templeton, D. M., F. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. Van Leeuwen et R. Lobinski (2000)** "Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches." *Pure Appl. Chem.* 72(8): 1453-1470.
- Thomas, D. J., M. Styblo and S. Lin (2001)** "The Cellular Metabolism and Systemic Toxicity of Arsenic." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176: 127-144.
- Tlustos, P., W. Goessler, J. Száková et J. Balík (2002)** "Arsenic compounds in leaves and roots of radish grown in soil treated by arsenite, arsenate and dimethylarsinic acid." *Appl. Organometal. Chem.* 16(4): 216-220.
- Tsai, S. M., T. N. Wang et Y. C. Ko (1999)** "Mortality for certain diseases in areas with high levels of arsenic in drinking water" *Arch. of Environ. Health* 54(3): 186-193.
- Tseng, W. P. (1977)** "Effects and dose - response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic." *Environ. Health Persp.* 19: 109-119.
- Tseng, W. P., H. M. Chu, S. W. How, J. M. Fong, C. S. S. Lin et S. Yen (1986)** "Prevalence of Skin Cancer in a Endemic Area of Chronic Arsenicism in Taiwan." *J. Natl. Cancer I.* 40: 453-463.
- Tukai, R., W. A. Maher, I. J. McNaught et M. J. Ellwood (2002)** "Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry." *Anal. Chim. Acta* 457(2): 173-185.
- USP XXIII (1995)** "Simulated gastric fluid." United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD, USA.

**USEPA Working Group** (1984) "Health Effects Assessment for Arsenic" EPA/540/1-86/020, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

**US EPA (IRIS)** (1993) "Arsenic - Reference dose for chronic oral exposure (RfD)." United States Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.

<http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/>

**US EPA (IRIS)** (1998) "Monography inorganic arsenic - Integrated Risk Information System - Carcinogenicity Assessment for lifetime exposure." United States Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.

<http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/>

**US EPA** (2002) "Chromated Copper Arsenate (CCA): Manufacturers to use new wood preservatives, replacing most residential uses of CCA" United States Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.

[http://www.epa.gov/oppad001/reregistration/cca/cca\\_transition.htm](http://www.epa.gov/oppad001/reregistration/cca/cca_transition.htm)

**Uthus, E. O.** (1992) "Evidence for arsenic essentiality" Environ. Geochem. Health 14(2): 55-58.

**Van den Broeck, K., C. Vandecasteele et J. M. C. Geunsb** (1998) "Speciation by liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry of arsenic in mung bean seedlings used as a bio-indicator for the arsenic contamination." Anal. Chim. Acta 361(1-2): 101-111.

**Van Hulle, M., C. Zhang, X. Zhang and R. Cornelis** (2002) "Arsenic speciation in chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS." Analyst 127(5): 634-40.

**Vassileva, E., A. Becker et J. A. C. Broekaert** (2001) "Determination of arsenic and selenium species in groundwater and soil extracts by ion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry." Anal. Chim. Acta 441(1): 135-146.

**Vela, N. P., D. T. Heitkemper et K. R. Stewart** (2001) "Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry." Analyst 126: 1011-1017.

**Vélez, D. et R. Montoro** (2001) "Inorganic arsenic in foods : current overview and future challenges." Recent Res. Devel. Agr. Food Chem. 5: 55-71.

**Wahlen, R., S. McSheehy, C. Scriver et Z. Mester** (2004) "Arsenic speciation in marine certified reference materials Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry" J. Anal. At. Spectrom., 19, 876-882.

- Wang, S.** et C. N. Mulligan. (2006) "Occurrence of arsenic contamination in Canada: sources, behaviour and distribution" *Sci. Total Environ.* 366: 701-721.
- Wang, R. Y., Y. L. Hsu, L. F. Chang et S.-J. Jiang** (2007) "Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer." *Anal. Chim. Acta* 590: 239-244.
- Wangkarn, S.** et S. A. Pergantis (2000) "High-speed separation of arsenic compounds using narrow-bore high-performance liquid chromatography on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry." *J. Anal. At. Spectrom.* 15: 627-633.
- Wei, X., C. A. Brockhoff-Schwegel et J. T. Creed** (2001) "A comparison of urinary arsenic speciation via direct nebulization and on-line photo-oxidation±hydride generation with IC separation and ICP-MS detection." *J. Anal. At. Spectrom.* 16(1): 12-19.
- WHO** (1989) "Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Thirty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives." World Health Organization Technical Report Series 776, Genève, Suisse.
- WHO/FNU/FOS** (1995) "Application de l'analyse des risques dans le domaine des normes alimentaires". World Health Organization, Genève, Suisse.
- WHO** (2001) "Arsenic and arsenic compounds. " *Environmental Health Criteria* 224. Second edition. Genève, Suisse.
- <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>
- WHO** (1996) "Arsenic in: Guidelines for drinking-water quality. Health criteria and other supporting information." World Health Organization. 2nd ed. Vol. 2. Genève, Suisse.
- Williams, T. M., B. G. Rawlins, B. Smith et N. Breward** (1998) "In-vitro determination of arsenic bioavailability in contaminated soil and mineral beneficiation waste from Ron Phibun, southern Thailand: A basis for improved human risk assessment" *Environ. Geochem. Health* 20(4): 169-177.
- Williams, P. N., A. H. Price, A. Raab, S. A. Hossain, J. Feldmann et A. A. Meharg** (2005) "Variation in Arsenic Speciation and Concentration in Paddy Rice Related to Dietary Exposure." *Environ. Sci. Technol.* 39: 5531-5540.
- Wrobel, K., K. Wrobel, B. Parker, S. S. Kannamkumarath, J. A. Caruso** (2002) "Determination of As(III), As(V), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and arsenobetaine by HPLC/ICP/MS: analysis of reference materials, fish tissues and urine." *Talanta* 58: 899-907.

**Xie, Q., R. Kerrich, E. Irving, K. Liberb et F. Abou-Shakrac (2002)** "Determination of five arsenic species in aqueous samples by HPLC coupled with a hexapole collision cell ICP-MS." *J. Anal. At. Spectrom.* 17: 1037-1041.

**Yamaoka, Y., M. L. Carmona, J. M. Oclarit, K. Jin et Y. Shibata (2001)** "Arsenic compounds in marine sponge (*Haliclona permolis*, *Halichondria japonica*, *Halichondria okadai* and *Haliclona sp. white*) from Seto Inland Sea, Japan." *Appl. Organometal. Chem.* 15(4): 261-265.

**Zheng, J., W. Kosmus, F. Pichler-Semmelorock et M. Kock (1999)** "Arsenic speciation in human urine reference materials using high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection." *J. Trace Elem. Med. Biol.* 13: 150-156.

**Zheng, J., H. Hintelmann, B. Dimock et M. S. Dzurko (2003)** "Speciation of arsenic in water, sediment, and plants of the Moira watershed, Canada, using HPLC coupled to high resolution ICP-MS." *Anal. Bioanal. Chem.* 377(1): 14-24.

**Zheng, J. et H. Hintelmann (2004)** "Hyphenation of high performance liquid chromatography with sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace level anionic and cationic arsenic compounds in freshwater fish." *J. Anal. At. Spectrom.* 19(1): 1991-1995.

**ANNEXES**

**Plan fractionnel et complémentaire 2<sup>7-4</sup> (séparation 9 espèces)****Plan fractionnel 2<sup>7-4</sup>**

	(1)	(2)	(3)	(4) = (123)	(5) = (12)	(6) = (23)	(7) = (13)
<b>1</b>	- 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1
<b>2</b>	+ 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1
<b>3</b>	- 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1
<b>4</b>	+ 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	- 1
<b>5</b>	- 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1
<b>6</b>	+ 1	- 1	+ 1	- 1	- 1	- 1	+ 1
<b>7</b>	- 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1	- 1
<b>8</b>	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1

**Plan complémentaire 2<sup>7-4</sup>**

	(1)	(2)	(3)	(4) = (123)	(5) = (-12)	(6) = (-23)	(7) = (-13)
<b>9</b>	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1
<b>10</b>	+ 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1
<b>11</b>	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1
<b>12</b>	+ 1	+ 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1
<b>13</b>	- 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1
<b>14</b>	+ 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1
<b>15</b>	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1
<b>16</b>	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	- 1

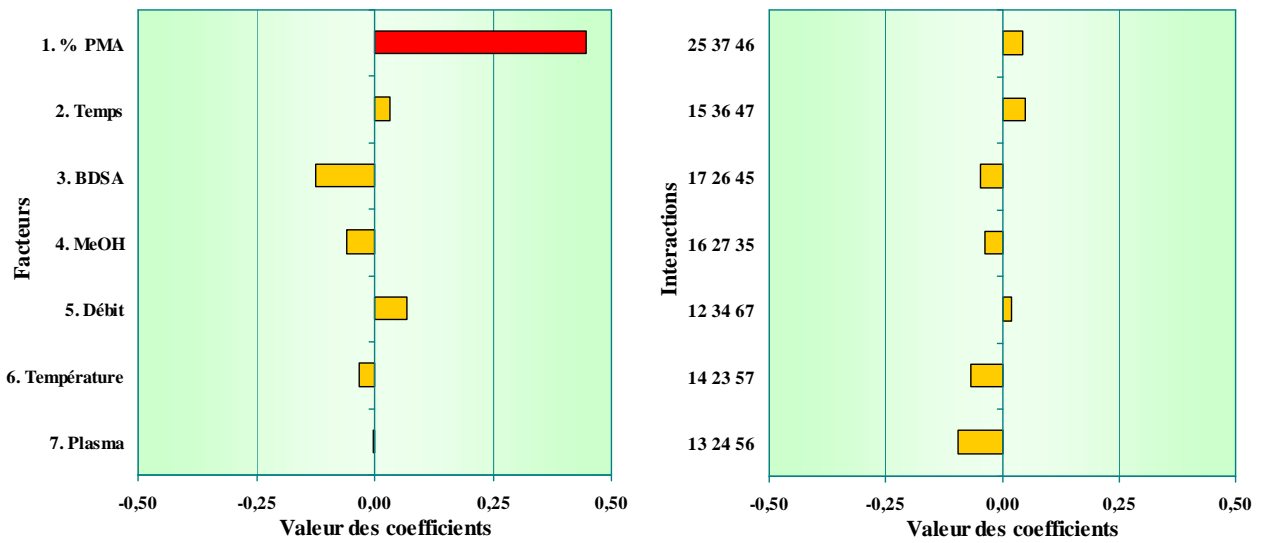
Niveau	Étapes	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
<b>-1</b>	<b>1</b>	95	1,5	0	0	0,9	20	1250
	<b>2</b>	80	6	0	0	0,9	20	1250
	<b>3</b>	0	1	0	0	0,9	20	1250
	<b>4</b>	60	7	0	0	0,9	20	1250
<b>0</b>	<b>1</b>	97,5	2	0,05	0,5	1,2	30	1350
	<b>2</b>	85	7	0,05	0,5	1,2	30	1350
	<b>3</b>	5	2	0,05	0,5	1,2	30	1350
	<b>4</b>	75	8	0,05	0,5	1,2	30	1350
<b>+1</b>	<b>1</b>	100	2,5	0,1	1	1,5	40	1450
	<b>2</b>	90	8	0,1	1	1,5	40	1450
	<b>3</b>	10	3	0,1	1	1,5	40	1450
	<b>4</b>	90	9	0,1	1	1,5	40	1450

(1) Pourcentage de PMA (%), (2) Durée des étapes du programme gradient (min), (3) Concentration en BDSA (mM L<sup>-1</sup>), (4) Concentrations en MeOH (%), (5) Débit des phases mobiles (mL min<sup>-1</sup>), (6) Température de la colonne (°C), (7) Puissance du plasma (W)

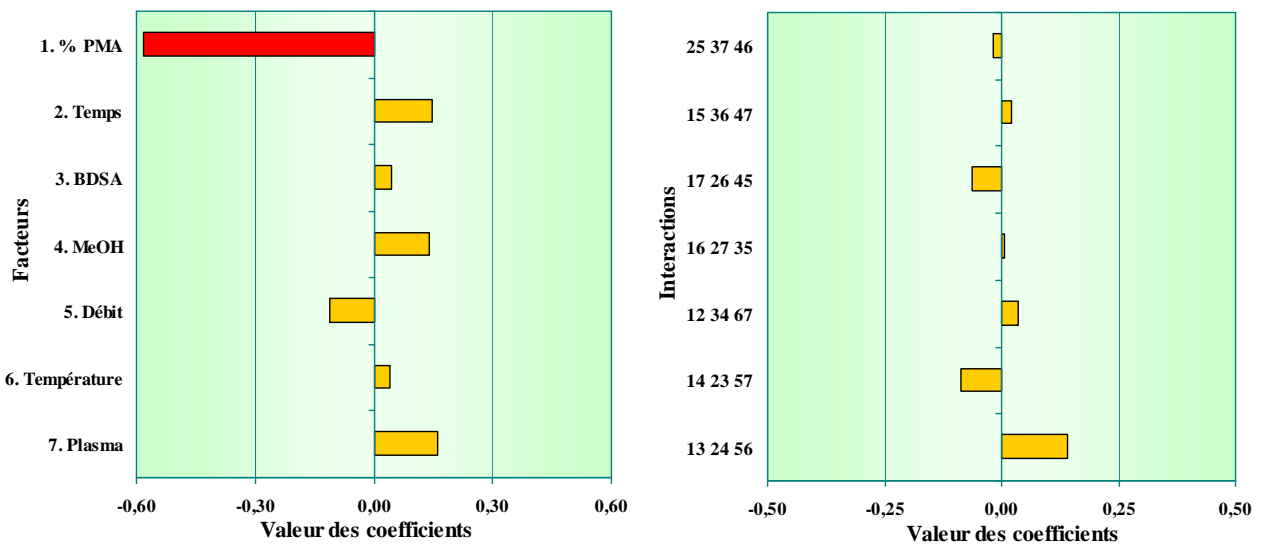


## Résultats plan d'expériences pour la séparation de 9 composés arséniés

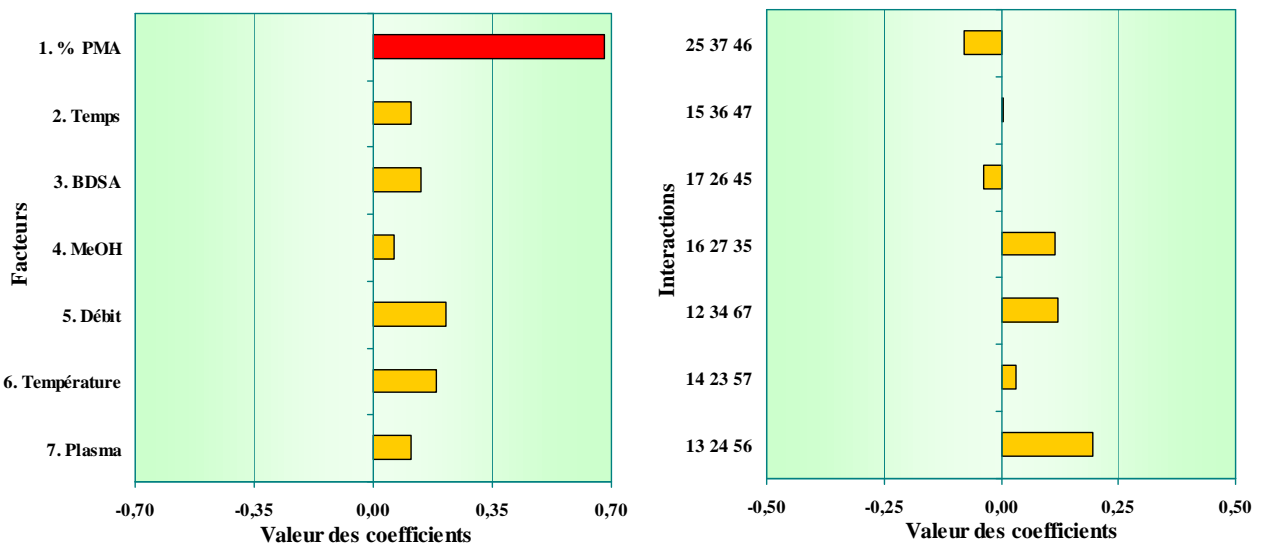
### (R<sub>1</sub>) Résolution As(III)/MA



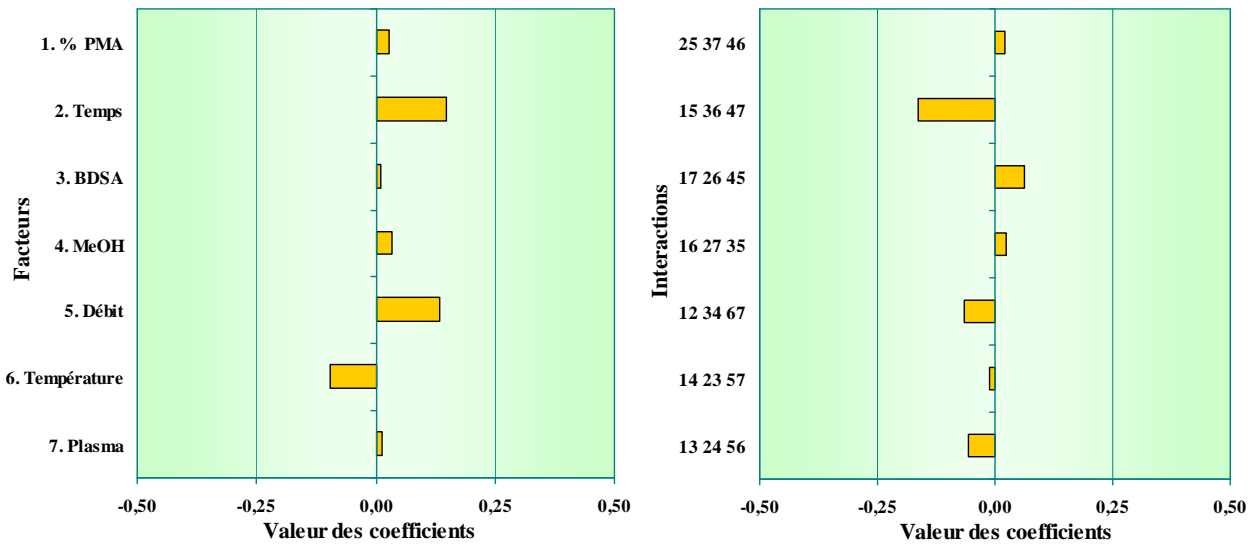
### (R<sub>2</sub>) Résolution MA/DMA



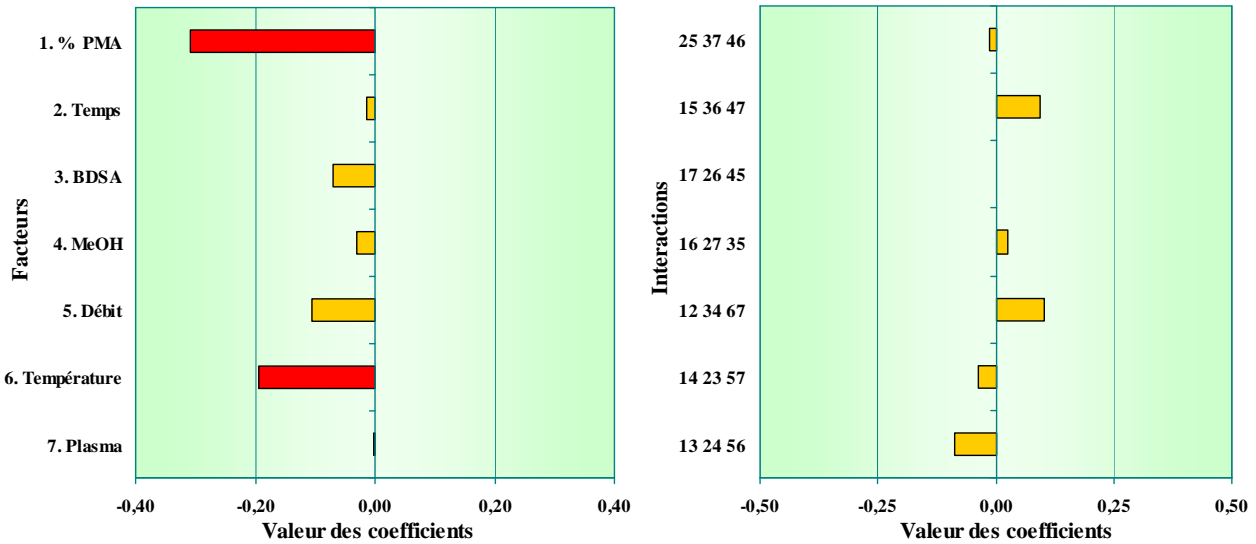
### (R<sub>3</sub>) Résolution DMA/As(V)



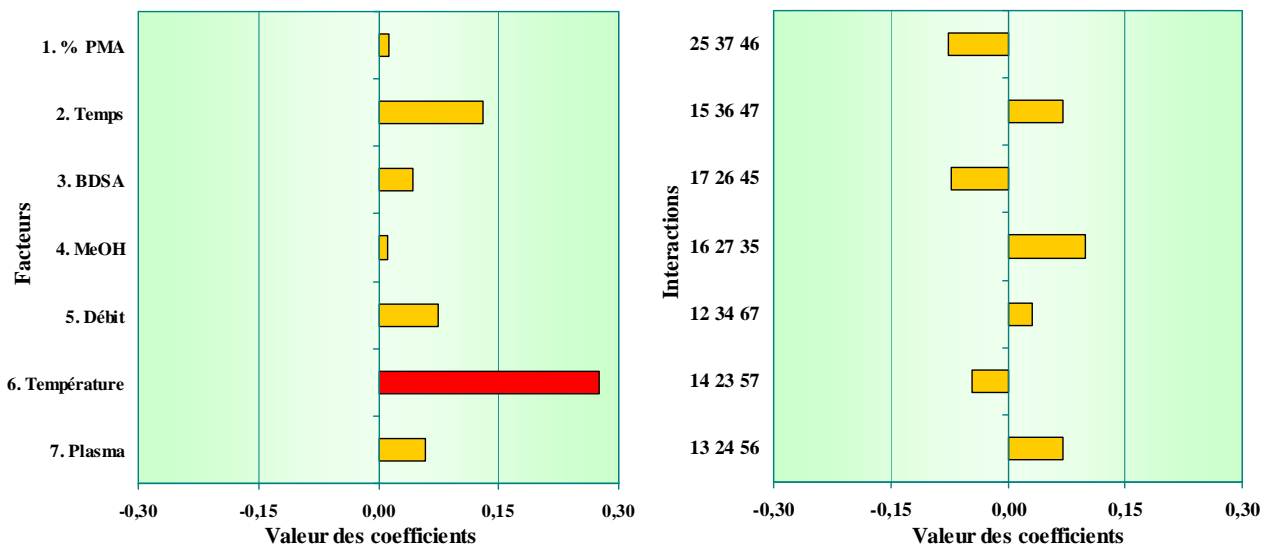
## (R'₄) Résolution As(V)/ROX

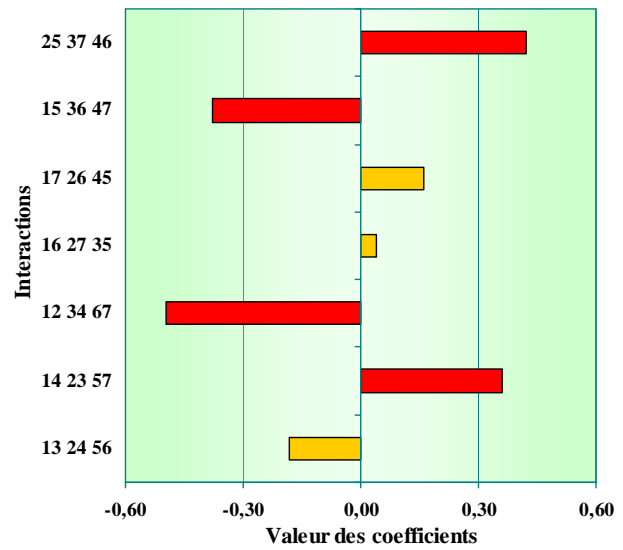
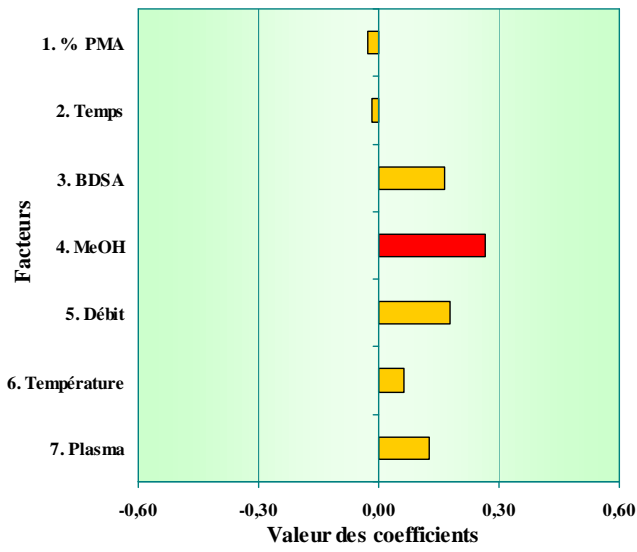
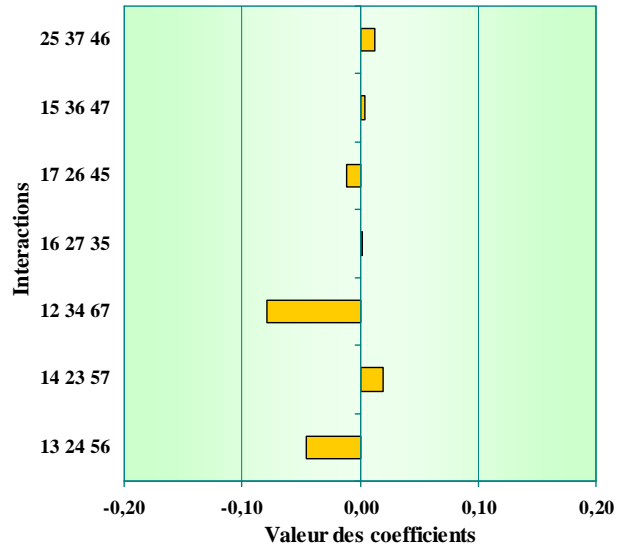
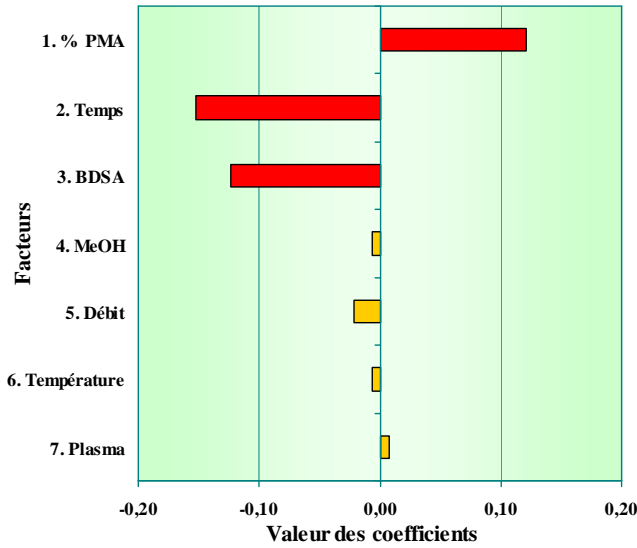


## (R'₅) Résolution ROX/AB

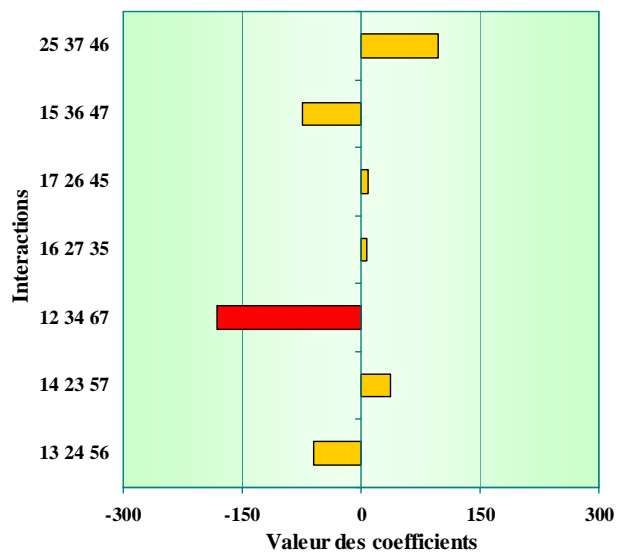
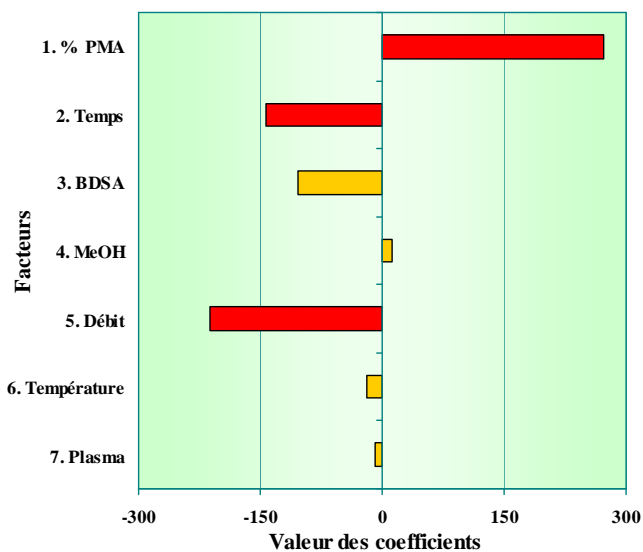


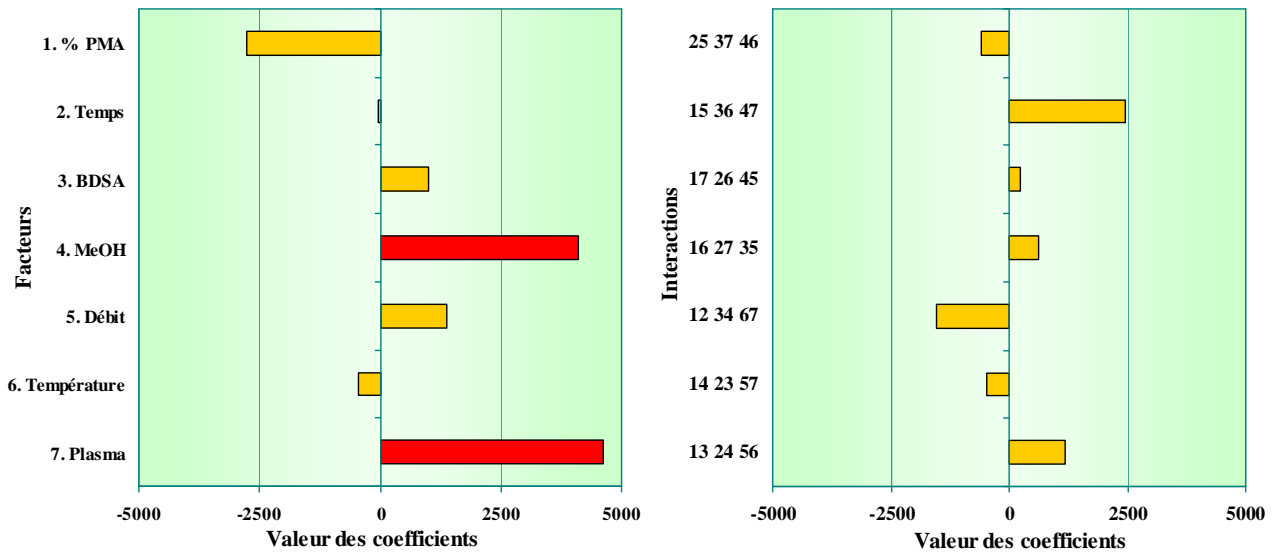
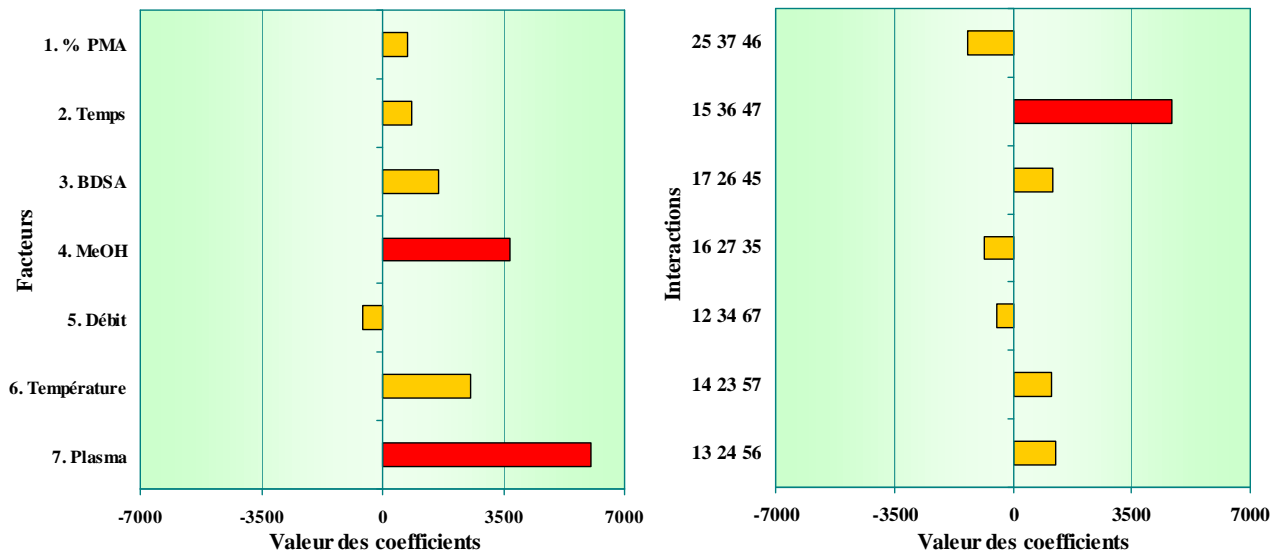
## (R'₆) Résolution AB/p-ASA



(R<sub>7</sub>) Résolution p-ASA/TMAO(R<sub>8</sub>) Résolution TMAO/AC

## (T) Temps d'analyse



(S<sub>1</sub>) Sensibilité As(III)(S<sub>2</sub>) Sensibilité As(V)

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)

# Optimisation and critical evaluation of a collision cell technology ICP-MS system for the determination of arsenic in foodstuffs of animal origin

Vincent Dufailly, Laurent Noël, Thierry Guérin\*

Unité des Contaminants Inorganiques et Minéraux de l'Environnement, AFSSA-LERQAP 23, Avenue du G. de Gaulle, F-94706 Maisons-Alfort Cedex, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 11 September 2007

Received in revised form

8 February 2008

Accepted 9 February 2008

Published on line 16 February 2008

### Keywords:

Inductively coupled plasma mass

spectrometry

Collision cell

Foodstuffs

Arsenic

Interferences

## ABSTRACT

The determination of arsenic ( $^{75}\text{As}$ ) was studied using an ICP-MS equipped with collision cell technology (CCT). Different mixtures of gases ( $\text{He}$  and  $\text{H}_2$ ) were tested using  $\text{HCl}$  conditions and a  $\text{He}$  flow rate of  $4\text{ mL min}^{-1}$  was found to be suitable for the removal of the poly-atomic spectral interference  $[\text{}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$ . Trueness of the optimised method has been evaluated in both standard and CCT modes on six certified reference materials in foodstuffs of animal origin and on three external proficiency testing schemes (FAPAS). The results obtained generally coincided with the certified values, except for CCT mode in some categories of samples (meat, mussels and milk powder), for which a positive bias on results was observed due to the formation of poly-atomic interferences within the collision cell. The main interferences were studied and their contributions estimated.  $[\text{}^{58}\text{Fe}^{16}\text{O}^1\text{H}]^+$  and  $[\text{}^{74}\text{Ge}^1\text{H}]^+$  were the most significant interferences formed in the cell. Finally, different parameters (e.g. hexapole and quadrupole bias voltage, nebuliser gas flow) were optimised to try to attenuate these interferences.

© 2008 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has rapidly become an established method of trace multi-element analysis in various matrices such as biological fluids, food and beverages [1–10]. Yet, like any sensitive analytical techniques, it still has some limitations such as spectral interferences. Most of these interferences are predictable and can be minimised in many cases by the use of alternative isotopes with lower natural abundances and/or by mathematical correction equations. However, not all determinations are straightforward, in particular the determination of elements which undergo major poly-atomic interferences generated by the

plasma gas ( $\text{Ar}$ ), matrix components (e.g.  $\text{O}$ ,  $\text{C}$ ,  $\text{N}$ ,  $\text{Cl}$ ) or solvent-acid ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ) [1].

One of the main poly-atomic ions,  $[\text{}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$ , has nearly the same mass-to-charge ratio ( $m/z$  75) as monoisotopic arsenic ( $\text{As}$ ), and could interfere with its determination in samples with significant amounts of chlorine. The most commonly used technique to reduce the  $[\text{}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$  interference in quadrupole ICP-MS is the well-known mathematical correction equation [2,11–13]. However, this correction formula may introduce errors in the case of a routine method of analysis if sample matrix components vary, and can be particularly unreliable for low concentrations of arsenic [11]. Thus, some recent applications have been optimised on quadrupole ICP-

\* Corresponding author. Tel.: +33 1 49 77 27 11; fax: +33 1 49 77 26 50.

E-mail address: [t.guerin@afssa.fr](mailto:t.guerin@afssa.fr) (T. Guérin).

0003-2670/\$ – see front matter © 2008 Published by Elsevier B.V.

doi:10.1016/j.aca.2008.02.018

MS to reduce this interference [14,15]. Only ICP-MS equipped with a high-resolution mass analyser [16], i.e. a sector field system, would be able to separate these two signals. Such systems are much more expensive, however, and the fact that some commercial sector instruments cannot ensure a complete separation of the  $^{75}\text{As}$  and  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  signal limits interest in such devices [11].

The development of ICP-MS instruments equipped with reaction/collision cells has offered an interesting alternative approach to a high-resolution system for the attenuation of these poly-atomic interferences [17]. This technique has been comprehensively reviewed by Tanner et al. [18] and involves positioning a collision/reaction cell, which is composed of a multipole (quadrupole, hexapole or octopole) usually operated in the radio frequency (rf)-only mode, before the analyser quadrupole. A collision/reaction gas is bled into the cell where, by various ion–molecule collision and reaction mechanisms, poly-atomic interfering ions are converted to harmless non-interfering species. Analyte ions then emerge from the collision cell and are directed towards the quadrupole analyser for normal mass separation [19]. The two types of multipole used and their basic mechanism for rejection of the interferences have been described by Thomas [19]. The experimental conditions used (e.g. selection and pressure of gas) must allow the effective removal of plasma-based interference ions and transmission of analyte ions of interest. But, the effective removal of unwanted new ions produced in the cell of the collision/reaction cell is also required. Several commercial instruments exist and differ in the way that they reject some of the interfering poly-atomic ions possibly formed by secondary reactions in the cell [8–12,14–17,20–34]. The ICP-MS used in this work enables kinetic energy discrimination (KED) where the difference in bias potentials between the quadrupole mass analyser and the hexapole cell ( $V_Q - V_H > 0$ ) is exploited to reject slow cell-formed ions. Indeed, collision-product ions, which have the same energy as the hexapole bias, are discriminated and rejected, while the analyte ions, which have a higher energy than the hexapole bias, are transmitted. However, the optimum setup conditions for  $V_H$  and  $V_Q$  bias are often contradictory in the literature. Even if KED was found to attenuate unwanted  $\text{MO}^+$  and  $\text{MOH}^+$  ions [17,20,21,25,26], several authors did not use KED in their determinations as optimum operational conditions [8,22–24], depending in particular on the cell gases used and the  $m/z$  of the element. According to the literature, the gases typically used for determining As include helium (He) and/or hydrogen ( $\text{H}_2$ ) [11,16,22,23,25,28–31]. The reactive gas  $\text{H}_2$  is used to react with argon ions and neutralise them through charge, proton, electron, or hydrogen atom transfer [17,28]. Thus, ion–molecule reactions are used to chemically remove interferences from the analyte mass. As for the buffer gas He, it is effective for collisional focusing, especially for improving the ion transmission and attenuating the argon chloride interference [18,28,35]. These gases were usually optimised with an arsenic standard prepared in an HCl solution (from 1% to 5%) to simulate the  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  interference [11,16,22,28,30]. The presence of impurities such as water vapour, oxygen and hydrocarbons in the cell could have significantly altered “the cell chemistry” when He was used and could have been considered as reaction partners for most of the observed interference reduction

[36], but also with  $\text{H}_2$  as suggested by Tanner et al. [18]. In contrast, Dexter et al. [37] reported that the presence of adventitious water in the collision cell had no effect when a He/ $\text{H}_2$  mixture was used, since  $\text{H}_2$  masks the effect of reactions with water. However, adding  $\text{H}_2$  to a He buffer gas reduced  $\text{Ar}^+$ ,  $\text{Ar}_2^+$ ,  $\text{ArO}^+$ , and  $\text{ArH}^+$  by orders of magnitude while enhancing  $\text{H}_3^+$ ,  $\text{OH}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}^+$ , and  $\text{H}_3\text{O}^+$  [27]. With regards to disparate results, as acknowledged by Tanner et al. [18], the effectiveness of a specific cell gas will depend on the experimental conditions used and the design of the collision/reaction cells of different ICP-MS instruments, and the cell gas pressure at which they are operated will have a major influence. Consequently, the limited success of a particular cell gas on a particular instrument should not be taken as a reliable indication of the general efficacy of that gas on another instrument.

Despite the fact that  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  was reduced by using a collision cell, many undesirable interfering species, such as  $^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$  [16,28,29],  $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+$  [29], and  $^{74}\text{Ge}^1\text{H}^+$  [30] could have potentially generated a positive bias at  $m/z$  75 [22,29]. However, these studies generally did not estimate the contribution of these interferences. The positive bias on As determination data may nevertheless be due to persistent interferences that may not be eliminated completely by the use of arithmetic corrections or collision/reaction cell strategies, but may be removed by careful optimisation of the nebuliser gas flow [29]. Indeed, low nebuliser gas flow tends to decrease the amounts of oxide and hydroxide species at only a minor sacrifice in sensitivity [38].

The aim of this work is to examine the effectiveness of a collision/reaction cell system in order to estimate the trueness improvement for the determination of arsenic in foodstuffs of animal origin. An estimation of the respective contribution of some new poly-atomic interferences that could be formed inside the collision cell and the possibilities to remove them was studied. Results were compared to those observed with an in-house validated and accredited ICP-MS method using standard mode [2].

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

A VG PlasmaQuad ExCell ICP-MS (Thermo Electron, Courtaboeuf, France) equipped with a hexapole collision cell and stainless steel gas lines (to avoid adventitious ingress of water) [29] was used. The sample solutions were pumped by a peristaltic pump from tubes arranged on an ASX 500 Model 510 autosampler (CETAC, Omaha, Nebraska, USA) and aspirated into the argon plasma. Further details of the instrumental settings are given in Table 1. Sample digestion was carried out using a closed microwave system Multiwave 3000 (Anton-Paar, Courtaboeuf, France) equipped with a rotor for eight sample vessels type X (80 mL quartz tubes; operating pressure 75 bar).

### 2.2. Reagents and gases

All solutions were prepared with analytical reagent grade chemicals and ultra pure water (18 M $\Omega$ -cm) was obtained

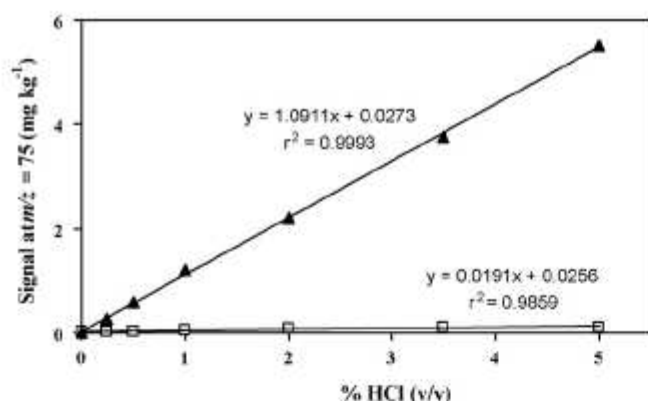


Fig. 1 – Effect on signal at  $m/z$  75 of HCl content (%HCl (v/v)) on a blank solution in standard (▲) and CCT (□) modes.

ference. This study was carried out under the same conditions as the previous one [8].

Fig. 2 shows the effect of  $H_2$  and He gases used alone or mixed, on the SBR at  $m/z$  75 for a standard solution of  $10 \mu\text{g As L}^{-1}$  and a blank solution, both prepared in 2% (v/v) HCl. These figures are area chart seen on top, in the same way that topographic chart, patterns indicate different ranges of SBR values. In order to select the separate or mixed gases that give the best SBR at  $m/z$  75, helium and hydrogen gas flow were evaluated between 0 and  $10 \text{ mL min}^{-1}$  by step of  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ . It should be noted that to achieve the optimum

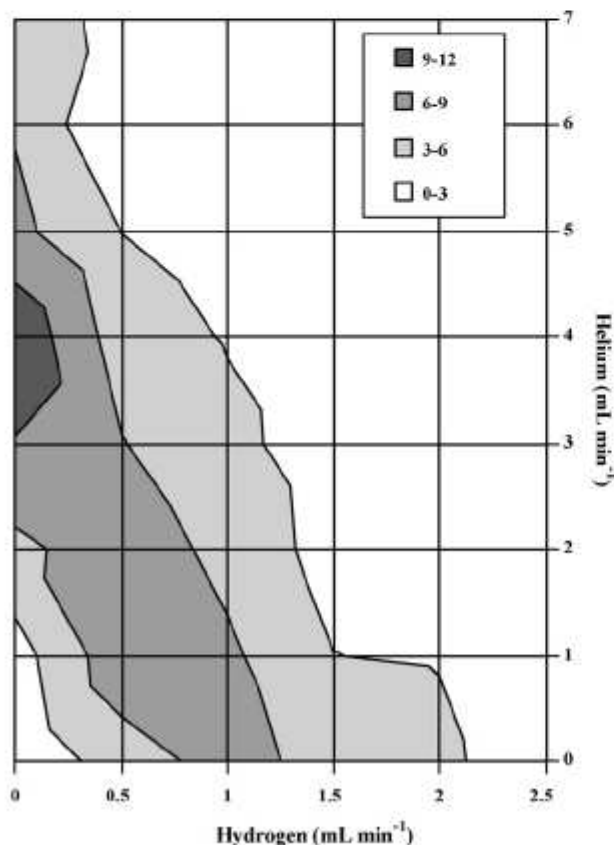


Fig. 2 – Effect on the SBR of hydrogen and helium addition at  $m/z$  75.

balance between sensitivity and maximum ArCl interference suppression, most of the earlier studies using the same ICP-MS model were set in non-KED conditions [22–24], even if KED was found to attenuate unwanted  $\text{MO}^+$  and  $\text{MOH}^+$  ions [21,26,37]. Thus, this study was conducted under similar conditions using a  $V_Q - V_H = -4.8 \text{ V}$ . Using these gases separately, a maximum SBR of 7.2 and 11.3 was achieved for a  $H_2$  flow of  $1 \text{ mL min}^{-1}$  and a He flow of  $4 \text{ mL min}^{-1}$ , respectively. When both these gases were mixed, the SBR promptly decreased to less than 8. Consequently, He used alone seems slightly more effective than  $H_2$  alone or a mixture of both gases in preventing  $[\text{}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$  interference for the determination of arsenic, as previously observed on diluted seawater or urine [31,34]. However, earlier studies have shown that a mixture of He and  $H_2$  gas could also be effective [16,22,28].

In these optimised CCT conditions, the slope is attenuated about 60-fold in comparison to standard mode (Fig. 1), giving a background comparable to the one previously estimated [16].

### 3.2. Analytical performances of the ICP-CCT-MS method

The linearity of the As calibration curve was well within the range  $0\text{--}100 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $r^2 > 0.995$ ). LOQ were established in 2% HCl ( $0.046$  and  $0.566 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and 6%  $\text{HNO}_3$  ( $0.036$  and  $0.047 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in CCT and standard modes, respectively. Thus, in samples with significant amounts of chlorine, LOQ in CCT mode was improved by about one order of magnitude, in comparison to standard mode. This LOQ is comparable to the one estimated without being interfered by  $[\text{}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$ . In addition, the precision under repeatability  $\text{CV}_r$  estimated at 5.3% remains close to that achieved in standard mode (4.4%) [2].

Trueness was estimated on nine reference materials of foodstuffs of animal origin in both standard with (Std1) or without (Std2) mathematical correction equation and CCT modes (Table 2). In Std2 mode, it should be noted that only CRM 627, DORM 2 and CSL-FAPAS round 53 were acceptable. The bias observed on the other CRMs was mainly due to the  $[\text{}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$  interferences which were not mathematically corrected. In Std1 and CCT modes, the results for “fish” matrix (CRM 627, IAEA 407, DORM 2 and CRM 422 and round 53) or crab matrix (round 48) were included in CI. These results were in line with those previously observed in Std1 mode [2]. Furthermore, for all these matrices, Z-scores were considered satisfactory (between  $-2$  and  $+2$ ), even if some variations can be observed in these two modes. For example, the Z-score for fish round test 53 was satisfactory but deteriorated in CCT mode, compared to Std1 mode.

On the contrary, Z-scores for CRM 278 R (mussel tissues), CRM 186 (pig kidney) and milk powder (round 61) were unsatisfactory in CCT mode due to a significant positive bias. In Std1 mode, result for the milk powder sample was also unsatisfactory, whereas Z-scores for CRM 278 R and CRM 186 were satisfactory, as previously observed [2].

Although these results demonstrate that  $[\text{}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$  interference was mainly reduced by using CCT mode, the bias observed may be due to persistent new or poly-atomic interferences such as  $[\text{}^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}]^+$  [16,28,29],  $[\text{}^{59}\text{Co}^{16}\text{O}]^+$  [29],  $[\text{}^{74}\text{Ge}^{1}\text{H}]^+$  [30], but also  $[\text{}^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2]^+$ ,  $[\text{}^{58}\text{Ni}^{16}\text{O}^{1}\text{H}]^+$ ,  $[\text{}^{60}\text{Ni}^{14}\text{N}^{1}\text{H}]^+$ ,  $[\text{}^{58}\text{Fe}^{16}\text{O}^{1}\text{H}]^+$  and  $[\text{}^{63}\text{Cu}^{12}\text{C}]^+$ .

**Table 2 – Results of As contents in CRMs and external PT schemes (CSL-FAPAS) obtained by ICP-MS in standard (with or without mathematical correction equation) and CCT mode ( $\text{mg kg}^{-1}$ ;  $n = 5$ )**

Matrix	CRM	Certified value <sup>a</sup>	Confidence interval	Observed value <sup>b</sup>			Z-score		
				Std1 <sup>c</sup>	Std2 <sup>d</sup>	CCT	Std1	Std2	CCT
Meat	CRM 186	0.063 ± 0.009	0.050–0.076	0.071 ± 0.006	0.099 ± 0.009	0.221 ± 0.020	1.4	6.4	28
Mussels	CRM 278 R	6.07 ± 0.13	4.86–7.28	6.10 ± 0.55	7.23 ± 0.65	7.84 ± 0.70	0.1	2.1	3.3
Fish	CRM 627	4.8 ± 0.3	3.8–5.8	4.9 ± 0.4	5.4 ± 0.5	5.1 ± 0.5	0.2	1.5	0.7
	IAEA 407	12.6 ± 0.3	10.1–15.1	14.9 ± 1.3	16.1 ± 1.3	14.1 ± 1.3	2.0	3.1	1.3
	DORM 2	18.0 ± 1.1	14.4–21.6	17.3 ± 1.5	17.4 ± 1.6	19.2 ± 1.7	–0.4	–0.4	0.7
	CRM 422	21.1 ± 0.5	16.9–25.3	24.9 ± 2.2	25.2 ± 2.3	24.2 ± 2.2	1.9	2.2	1.6
External PT schemes (CSL-FAPAS)									
Fish	Round 53	0.505 ± 0.090	0.404–0.606	0.502 ± 0.045	0.573 ± 0.051	0.581 ± 0.052	–0.1	1.5	1.7
Crab	Round 48	9.83 ± 1.11	7.86–11.8	11.8 ± 1.1	11.9 ± 1.1	10.3 ± 0.9	1.8	2.4	0.5
Milk powder	Round 61	0.054 ± 0.012	0.043–0.064	0.100 ± 0.009	0.173 ± 0.015	1.02 ± 0.09	3.9	25	202

<sup>a</sup> Uncertainty given as 95% confidence interval.  
<sup>b</sup>  $\pm$ Uncertainty =  $2 \times \bar{x}f \times CV_R / (100 \times \sqrt{n})$ .  
<sup>c</sup> Standard mode with mathematical correction equation.  
<sup>d</sup> Standard mode without mathematical correction equation.

### 3.3. Contribution estimation of new or persistent interferences

Adjusting collision cell bias according to analyser quadrupole bias could be important to distinguish the collision-product ions from the analyte ions by kinetic energy discrimination (KED) [17,20,21,25,26]. This is implemented to exclude slow cell-formed ions by setting the quadrupole bias potential  $V_Q$  above that of the hexapole bias potential  $V_H$  of the collision cell [19]. It should be noted that, on this ICP-MS instrument,  $V_H$  is fixed (–4.7 V) and only  $V_Q$  is adjustable in order to improve the ion signals.

As previously observed, the net signal at  $m/z$  75 and 115 ( $^{115}\text{In}$  used for daily instrument optimisation) increases as  $V_Q$  decreases until it reaches a plateau value of approximately –2 V [8]. Using a He/H<sub>2</sub> mixture with different  $V_H$  over a specific interval of  $V_Q$  values previously achieved a similar plateau area [20,25]. Between –2 V and –15 V,  $V_Q$  optimisation has a minor influence on SBR variations while still maintaining oxide levels BaO<sup>+</sup>/Ba<sup>+</sup> below 1%, as observed earlier [8].

The respective contribution of the poly-atomic interferences cited above was estimated at three different  $V_Q - V_H$  values, corresponding to non-KED ( $V_Q < V_H$ ), KED ( $V_Q > V_H$ ) and intermediate ( $V_Q = V_H$ ) conditions.

The effects of the proportioned addition of a standard solution of calcium (Ca) prepared in 3% HCl, nickel (Ni), iron (Fe), germanium (Ge), cobalt (Co) and copper (Cu) prepared in 6% HNO<sub>3</sub> on blank values at  $m/z$  75 have been evaluated in both standard (Std1) and CCT modes (Table 3). Higher concentration ranges for Ca, Ni, Co, Fe and Cu compared with maximum contents previously quantified in foodstuffs were chosen [3,44]. For Ge, a higher concentration range than concentrations estimated in the reference materials studied was selected. In both modes, their respective contribution at  $m/z$  75 increased proportionately to the element added ( $r^2 > 0.995$  except for Cu:  $r^2 = 0.965$  in standard mode and 0.950 in CCT mode). Slopes in CCT mode in non-KED conditions were found to be greater than those obtained in standard mode by a factor of about 1.5 (Ca), 2.1 (Co), 5.6 (Ni), 10 (Cu), 23 (Ge) and 70 for Fe (Table 3). Thus, [<sup>58</sup>Fe<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H]<sup>+</sup> and [<sup>74</sup>Ge<sup>1</sup>H]<sup>+</sup> were the most significant interferences formed in the cell, followed to a lesser extent by [<sup>63</sup>Cu<sup>12</sup>C]<sup>+</sup> and [<sup>58</sup>Ni<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H]<sup>+</sup> + [<sup>60</sup>Ni<sup>14</sup>N<sup>1</sup>H]<sup>+</sup> interferences. Yet, with the same concentration of each element, the contribution of these poly-atomic interferences could be Ni > Co > Ge > Fe > Ca > Cu in decreasing order. However, the true contribution at  $m/z$  75 will be directly linked to the respective content of these elements present in real samples.

**Table 3 – Standard solution addition effect on signal at  $m/z$  75 peak for Ca, Ni, Fe, Ge, Co and Cu in standard and CCT modes**

Mode		Ca <sup>a</sup>	Ni	Fe	Ge	Co	Cu
Concentration range ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Std1 CCT	0–10000	0–50	0–500	0–10	0–10	0–500
	Std1	0.0005	0.0032	0.00002	0.0001	0.0019	0.000002
Slope	A	0.0005	0.016	0.0010	0.0021	0.0025	0.00001
		CCT	0.0005	0.015	0.0010	0.0016	0.0029
	C	0.0007	0.018	0.0014	0.0023	0.0040	0.00002

A =  $V_Q - V_H = 2$ : KED conditions. B =  $V_Q - V_H = 0$ : intermediate conditions. C =  $V_Q - V_H = -4.8$ : non-KED conditions.

<sup>a</sup> In HCl 3%.



Table 3 also indicates that using CCT mode is not effective in diminishing the  $[^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}]^+$  interference bias, as previously described [16,28]. Moreover, a slight contribution at  $m/z$  75 was also observed in CCT mode only with a Ca addition in 6%  $\text{HNO}_3$  (results not presented), probably due to  $[^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2]^+$ . However, for a Ca addition of  $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ , the  $[^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2]^+$  contribution was approximately 14 times less ( $0.51 \text{ mg kg}^{-1}$ ) than that due to the  $[^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}]^+$  interference in HCl condition ( $7 \text{ mg kg}^{-1}$ ). So,  $[^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2]^+$  interference was insignificant in CCT mode.

When setting  $V_Q - V_H$  higher than or equal to zero, it should also be noted that just a slight downward trend of the respective contribution of these interferences was observed to the maximum overestimation at  $m/z$  75, compared to non-KED conditions (Table 3). Accordingly, the contribution of each interference on the basis of three different  $V_Q - V_H$  values was estimated from determined and available certified values of these elements and Table 3 (Table 4). Only the results for Ca, Ni and Fe were presented, as the contributions of Ge, Co and Cu were negligible. However, Z-score bias takes all determined contributions into account. When available, the contribution of an element may also be compared to those estimated using

certified values and the real HCl proportion has been estimated in CRM 186 (0.5% HCl), CRM 278R (5% HCl) and IAEA 407 (3% HCl). So, for these three samples, the  $[^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}]^+$  contribution estimation was calculated with the real proportion of HCl in the matrix and for the others (if there are not enough samples), only an approximation should be made with 3% HCl.

It should be noted that the results presented in Table 4 were based on the wrong hypothesis that the associated poly-atomic ion in the cell is formed by the whole of an element present in the matrix (e.g. that 100% of Fe content in the matrix forms 100%  $[^{58}\text{Fe}^{16}\text{O}^1\text{H}]^+$ ), which probably overestimates the real contribution of these elements at  $m/z$  75. In spite of this, whatever the  $V_Q - V_H$  values tested, Z-score bias generally remains below 1.5, except for CRM 186, Round 61 and CRM 278R. A slight attenuation of these contributions can be observed when setting  $V_Q - V_H$  higher than or equal to zero involving an acceptable Z-score bias for the CRM 278R, but not for the two other CRMs.

For the CRM 278R, the estimated Z-score bias (3.0) corresponding to the high content of Ca ( $1280 \text{ mg kg}^{-1}$ ; estimated value) and Fe ( $112 \text{ mg kg}^{-1}$ ; estimated value) probably explains

**Table 4 – Contribution estimation of the main arsenic poly-atomic interferences in CCT mode calculated from determined ( $\text{mg kg}^{-1}$ ;  $n = 5$ ) and available certified values (in brackets)**

CRM	As certified value	$V_Q - V_H$	$^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}$	$^{58}\text{Ni}^{16}\text{O}^1\text{H} + ^{60}\text{Ni}^{14}\text{N}^1\text{H}$	$^{58}\text{Fe}^{16}\text{O}^1\text{H}$	$\Sigma i^a$	Z-score bias <sup>b</sup>
CRM 186	0.063	A	0.029	0.007	0.285 (0.308)	0.320	57
		B	0.031	0.007	0.282 (0.306)	0.320	57
		C	0.041	0.008	0.375 (0.412)	0.424	75
CRM 627 <sup>*</sup>	4.8	A	0.178	0.0005	0.052	0.230	0.5
		B	0.185	0.0005	0.051	0.237	0.6
		C	0.248	0.001	0.068	0.317	0.7
CRM 278 R	6.07	A	1.028	0.017	0.116	1.161	2.1
		B	1.071	0.016	0.115	1.202	2.2
		C	1.433	0.019	0.153	1.605	3.0
IAEA 407	12.6	A	0.780	0.008 (0.009)	0.157 (0.151)	0.946	0.8
		B	0.814	0.008 (0.009)	0.156 (0.149)	0.978	0.9
		C	1.09	0.009 (0.011)	0.207 (0.201)	1.31	1.2
DORM 2 <sup>*</sup>	18.0	A	0.211	0.194 (0.306)	0.143 (0.146)	0.549	0.3
		B	0.220	0.190 (0.300)	0.142 (0.145)	0.553	0.3
		C	0.294	0.228 (0.359)	0.189 (0.195)	0.712	0.4
CRM 422 <sup>*</sup>	21.1	A	0.159	0.001	0.005 (0.006)	0.165	0.1
		B	0.166	0.001	0.005 (0.006)	0.172	0.1
		C	0.222	0.001	0.007 (0.008)	0.230	0.1
External PT schemes (CSL-FAPAS)							
Round 53 <sup>*</sup>	0.505	A	0.010	0.001	0.010	0.020	0.5
		B	0.010	0.001	0.010	0.021	0.5
		C	0.014	0.001	0.013	0.028	0.6
Round 48 <sup>*</sup>	9.83	A	0.592	0.005	0.037	0.662	0.8
		B	0.617	0.005	0.036	0.690	0.8
		C	0.826	0.006	0.048	0.929	1.1
Round 61 <sup>*</sup>	0.054	A	1.05	0.0002	0.004	1.06	219
		B	1.10	0.0002	0.004	1.10	229
		C	1.47	0.0002	0.005	1.48	306

A =  $V_Q - V_H = 2$ : KED conditions. B =  $V_Q - V_H = 0$ : intermediate conditions. C =  $V_Q - V_H = -4.8$ : non-KED conditions.

<sup>a</sup>  $\Sigma i$  = sum of the interference contributions.

<sup>b</sup> Z-score bias calculated from  $\Sigma i$ .

<sup>\*</sup> Estimated with 3% HCl.

**Table 5 – H<sub>2</sub> gas flow effect on signal at m/z 75 peak for Ca, Ni, Fe, Ge, Co and Cu in CCT mode**

H <sub>2</sub> gas flow (mL min <sup>-1</sup> )	Contribution at m/z 75 (mg kg <sup>-1</sup> )					
	Ca 10000 mg kg <sup>-1</sup>	Ni 50 mg kg <sup>-1</sup>	Fe 500 mg kg <sup>-1</sup>	Ge 10 mg kg <sup>-1</sup>	Co 10 mg kg <sup>-1</sup>	Cu 500 mg kg <sup>-1</sup>
0	7.0	1.2	0.73	0.07	0.07	0.06
0.1	7.2	2.2	0.89	0.58	0.12	0.09
0.2	7.7	2.8	0.96	0.58	0.10	0.07
0.5	9.0	2.9	1.0	1.1	0.11	0.07

the Z-score of 3.3 (Table 2). In the same way, due to the high content of Fe (299 mg kg<sup>-1</sup>) and Ca (295 mg kg<sup>-1</sup>; indicative value) in CRM 186, [<sup>58</sup>Fe<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H]<sup>+</sup> (determined and available certified value contributions were consistent) and [<sup>40</sup>Ca<sup>25</sup>Cl]<sup>+</sup> are the main contributors to the total bias estimated on the arsenic concentration (up to 0.42 mg kg<sup>-1</sup>), whereas the As certified value is 0.063 mg kg<sup>-1</sup>. In the milk sample round 61 (2190 mg Ca kg<sup>-1</sup> estimated), [<sup>40</sup>Ca<sup>25</sup>Cl]<sup>+</sup> was also the main contributor, contributing to a total overestimation of the arsenic content of about 1.1–1.5 mg kg<sup>-1</sup> for an assigned value of 0.054 mg As kg<sup>-1</sup>.

Finally, these results illustrate that using CCT, whatever V<sub>Q</sub> – V<sub>H</sub> values, would drastically increase the contribution of several interferences at m/z 75, in comparison with standard mode.

As the reaction/collision gas flow in the collision cell was optimised without these elements in the arsenic standard solution, Table 5 shows the effect of adding a little H<sub>2</sub> to the optimised He buffer gas (4 mL min<sup>-1</sup>), in non-KED conditions. With the addition of a little H<sub>2</sub>, most of these interferences increased slightly (less than a factor 1.4), while those for [<sup>74</sup>Ge<sup>1</sup>H]<sup>+</sup> and [<sup>58</sup>Ni<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H]<sup>+</sup> + [<sup>60</sup>Ni<sup>14</sup>N<sup>1</sup>H]<sup>+</sup> were enhanced by about a factor 17 and 2.4, respectively (Table 5). So, these

results corroborate that using He gas alone would be preferable to a mixture of both He and H<sub>2</sub>.

### 3.4. Optimisation of the nebuliser gas flow

Brown et al. [29] have recently shown that these persistent interferences may be removed by careful optimisation of the nebuliser gas flow. In both CCT (V<sub>Q</sub> – V<sub>H</sub> = –4.8 V) and standard modes, the effect of the nebuliser gas flow (varied by step of 0.05 between 0.95 and 0.65 L min<sup>-1</sup>) on the arsenic intensity signal and Z-Score is shown in Table 6 (intermediate results not shown as they were not significantly different). The results presented in Table 6 with a gas flow of 0.95 L min<sup>-1</sup> are the same as Table 2. In both modes, the nebuliser gas flow can be decreased up to 0.75 L min<sup>-1</sup>, without significantly affecting the arsenic sensitivity.

In CCT mode, Z-Scores generally improved as the nebuliser gas flow decreased to 0.75 L min<sup>-1</sup>, particularly for the samples most affected by persistent interferences. Unfortunately, whatever the nebuliser gas flow, the results for the CRM 186 and round 61 remain unsatisfactory, because of a major difference between their low arsenic contents and iron or strong calcium plus chloride concentrations, respectively. In

**Table 6 – The effect of the nebuliser gas flow in CCT and standard conditions (mg kg<sup>-1</sup>; n = 2)**

Nebuliser gas flow (L min <sup>-1</sup> )		0.95	0.85	0.75	0.65
CCT	CRM 186	28	14.5	4.0	5.4
	CRM 278 R	3.3	1.2	0.0	0.9
	CRM 627	0.7	1.1	1.2	–
	IAEA 407	1.3	0.7	0.4	–
	DORM 2	0.7	1.2	1.0	–
	CRM 422	1.6	1.2	1.1	–
	Round 53	1.7	1.2	1.3	–
	Round 48	0.5	0.3	0.4	–
	Round 61	202	118	76	–
	Intensity As (counts s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	5000	4000	3700	820
Intensity In (counts s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	120000	111000	78000	5200	
Standard (Std1)	CRM 186	1.4	–1.0	2.6	21.1
	CRM 278 R	0.1	0.1	2.1	2.2
	CRM 627	0.2	1.3	2.2	–
	IAEA 407	2.0	–0.7	–0.7	–
	DORM 2	–0.4	1.3	1.6	–
	CRM 422	1.9	1.2	2.0	–
	Round 53	–0.1	1.3	2.1	–
	Round 48	1.8	0.5	2.6	–
	Round 61	3.9	4.2	6.8	–
	Intensity As (counts s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	6500	5500	4900	2500
Intensity In (counts s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	110000	95000	70000	20000	

<sup>a</sup> For a solution of 1 µg L<sup>-1</sup>.

these CCT conditions, LOQ ( $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and CV<sub>r</sub> (5%) remain similar to those estimated above.

In standard mode, results were more contrasted: Z-Scores were similar or somewhat improved e.g. for IAEA 407 with a gas flow of  $0.85 \text{ L min}^{-1}$ , whereas most of them deteriorated at a lower gas flow (Table 6).

Indeed, the nebuliser gas flow has an influence on the positive bias on arsenic determination due to new or persistent interferences in CCT mode. Nevertheless, it is not sufficient to remove them completely, except for CRM 278R. Moreover, the trueness in the nine foodstuffs of animal origin tested is usually more satisfactory in standard mode than in CCT mode, particularly since the nebuliser gas flow is carefully optimised. Finally, whatever the conditions used, the determination of arsenic contents in milk products with a satisfactory trueness appears difficult.

#### 4. Conclusion and prospects

This work has clearly demonstrated that the introduction of  $4 \text{ mL min}^{-1}$  of He alone in the collision cell (CCT) seems slightly more effective at removing the poly-atomic spectral interference  $[\text{}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$  than  $\text{H}_2$  alone or a mixture of both gases. Unfortunately, some new interferences may be generated in the collision cell, depending on the sample matrix components contained in foodstuffs of animal origin. The contributions of the main interferences have been estimated with equal concentration in the matrix to be in a decreasing order of slopes:  $[\text{}^{58}\text{Ni}^{16}\text{O}^1\text{H}]^+ + [\text{}^{60}\text{Ni}^{14}\text{N}^1\text{H}]^+ > [\text{}^{59}\text{Co}^{16}\text{O}]^+ > [\text{}^{74}\text{Ge}^1\text{H}]^+ > [\text{}^{58}\text{Fe}^{16}\text{O}^1\text{H}]^+ > [\text{}^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}]^+ > [\text{}^{63}\text{Cu}^{12}\text{C}]^+$ . However, the respective content of these elements present in the samples remains essential for the estimation of the real contribution of these interferences. The addition of known concentration of these elements in CRM could also be considered in order to assess the contribution of corresponding interferences at  $m/z$  75 in real samples. Furthermore, the addition of a little  $\text{H}_2$  in He buffer gas increases these contributions. Indeed, as setting  $V_Q - V_H$  higher than or equal to zero slightly attenuated these contributions, this is not sufficient to enable accurate arsenic determination in some foodstuffs of animal origin such as mussels, red meat and milk.

Even if the effect of the nebuliser gas flow to reduce this positive bias seems more significant, some interferences persist, especially if samples contain weak arsenic contents and strong calcium plus chloride and/or iron concentrations.

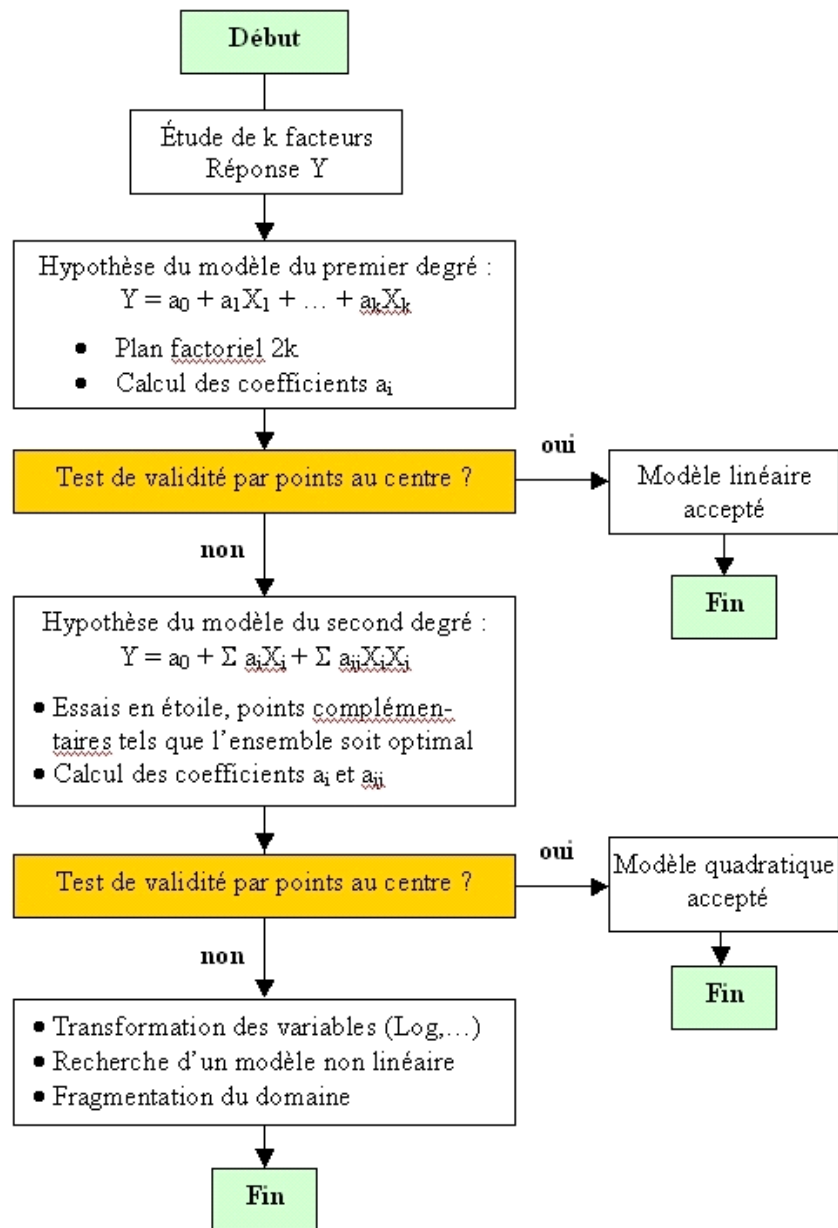
Moreover, a careful optimisation of the nebuliser gas flow in standard mode usually represents an effective and simple method for reducing analytical bias during the measurement of arsenic in foodstuffs of animal origin. Nevertheless, whatever the ICP-MS conditions used, the accurate determination of low arsenic contents in milk (or crabmeat) products remains problematic [45,46]. Further studies will be devoted to application of a new CCT generation in order to take up this challenge.

#### REFERENCES

- [1] R.M. Barnes, *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 115.
- [2] L. Noël, V. Dufailly, N. Lemahieu, C. Vastel, T. Guérin, *J. AOAC Int.* (2005) 1811.
- [3] J.C. Leblanc, T. Guérin, L. Noël, G. Calamassi-Tran, J.-L. Volatier, P. Verger, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 624.
- [4] L. Noël, J.C. Leblanc, T. Guérin, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 44.
- [5] G. Ysart, P. Miller, M. Croasdale, H. Crews, P. Robb, M. Baxter, C. de L'Argy, N. Harrison, *Food Addit. Contam.* 17 (2000) 775.
- [6] H. Zhou, J. Liu, *Atom. Spectrosc.* 18 (1997) 192.
- [7] G. Ysart, P. Miller, *Food Addit. Contam.* 16 (1999) 391.
- [8] V. Dufailly, L. Noël, T. Guérin, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 214.
- [9] J.S. Becker, H.J. Dietze, *Int. J. Mass Spectrom.* 197 (2000) 1.
- [10] C. Wang, S. Jeng, F. Shieh, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 61.
- [11] D.A. Polya, P.R. Lythgoe, F. Abou-Shakra, A.G. Gault, J.R. Brydie, J.G. Webster, K.L. Brown, M.K. Nimfopoulos, K.M. Michailidis, *Mineral. Mag.* 67 (2003) 247.
- [12] M.M. Kershnik, R. Kalamegham, K.O. Ash, D.E. Nixon, E.R. Ashwood, *Clin. Chem.* 38 (1992) 2197.
- [13] J.L.M. de Boer, in: G. Holland, S.D. Tanner (Eds.), *Plasma Source Mass Spectrometry: Developments and Applications*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997, pp. 61-69.
- [14] Z. Hu, S. Gao, S. Hu, H. Yuan, X. Liu, Y. Liu, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 1263.
- [15] J. Entwisle, R. Hearn, *Spectrochim. Acta, Part B* 61 (2006) 438.
- [16] F. Abou-Shakra, D. Churchman, Micromass (UK) Ltd. Application Note 302 (1999) 120.
- [17] J.T. Rowan, R.S. Houk, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 976.
- [18] S.D. Tanner, V.I. Baranov, D.R. Bandura, *Spectrochim. Acta, Part B* 57 (2002) 1361.
- [19] R. Thomas, *Spectroscopy* 17 (2002) 42.
- [20] M.A. Dexter, H.J. Reid, B.L. Sharp, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 676.
- [21] Z. Du, R.S. Houk, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 383.
- [22] M. Niemelä, P. Perämäki, H. Kola, J. Piispanen, *Anal. Chim. Acta* 493 (2003) 3.
- [23] C.P. Ingle, P.K. Appelblad, M.A. Dexter, H.J. Reid, B.L. Sharp, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 1076.
- [24] S. Mazan, N. Gilon, G. Cretier, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 366.
- [25] V. Chrastny, M. Komarek, M. Mihaljevic, J. Stichova, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 962.
- [26] N. Yamada, J. Takahashi, K. Sakata, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1213.
- [27] I. Feldmann, N. Jakubowski, C. Thomas, D. Stuewer, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 365 (1999) 415.
- [28] I. Feldmann, N. Jakubowski, C. Thomas, D. Stuewer, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 365 (1999) 422.
- [29] R.J.C. Brown, R.E. Yardley, A.S. Brown, M.J.T. Milton, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 703.
- [30] J. Darrouzès, M. Bueno, G. Lespes, M. Holeman, M. Potin-Gautier, *Talanta* 71 (2007) 2080.
- [31] P. Leonhard, R. Pepelnik, A. Frange, N. Yamada, T. Yamada, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 189.
- [32] H.T. Liu, S.J. Jiang, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 306.
- [33] M. Iglesias, N. Gilon, E. Poussel, J.M. Mermel, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1240.
- [34] E. Mc Curdy, G. Woods, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 607.
- [35] P. Turner, T. Merren, J. Speakman, C. Haines, in: G. Holland, S.D. Tanner (Eds.), *Plasma Source Mass Spectrometry: Developments and Applications*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997, pp. 28-34.
- [36] S.D. Tanner, V.I. Baranov, U. Vollkopf, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1261.
- [37] M.A. Dexter, P.K. Appelblad, C.P. Ingle, J.H. Batey, H.J. Reid, B.L. Sharp, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 183.
- [38] A. Montaser (Ed.), *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Wiley-VCH, New York, 1998, pp. 526-528.
- [39] European Committee for Standardization, EN 13804, CEN, Brussels, Belgium, 2002.

- [40] European Committee for Standardization, EN 13805, CEN, Brussels, Belgium, 2002.
- [41] Agence Française de Normalisation, FD V03-115 Guidelines, AFNOR, Saint-Denis, France 1996.
- [42] L. Jorhem, J. Engman, T. Schroder, Presenius' J. Anal. Chem. 370 (2001) 178.
- [43] Agence Française de Normalisation, NF V03-110 AFNOR Standard, AFNOR, Saint-Denis, France, 1998.
- [44] M. Lamand, J.-C. Tressol, J. Ireland-Ripert, J.-C. Favier, M. Feinberg, in Répertoire général des aliments: Tome 4 Table de composition minérale, Lavoisier (Ed.), Paris, 1996.
- [45] C. Walker, Metallic contaminant in milk powder, CSL-FAPAS Proficiency test 0761 report, York, U.K. 2005.
- [46] M. Rose, M. Knaggs, L. Owen, M. Baxter, J. Anal. At. Spectrom. 16 (2001) 1101.

## Organigramme d'une modélisation par la méthode des plans d'expériences



**Arsenic speciation by IEC/ICP-MS in seafood samples following microwave-assisted extraction and comparison with bio-accessible data**

Vincent Dutilleul<sup>a</sup>, Laurent Noël<sup>b</sup>, Jean-Marc Freymy<sup>b</sup>, Diane Beauchemin<sup>c</sup> and Thierry Guerin<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup> Unité des Contaminants Inorganiques et Minéraux de l'Environnement, AFSSA-LERQAP, 23, Avenue du Général de Gaulle, F-94706 Maisons-Alfort Cedex, France.

<sup>b</sup> Unité d'Évaluation des Risques Physico-Chimiques, AFSSA-DERNS, 27-31, Avenue du Général Leclerc, F-94701 Maisons-Alfort, France.

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Queen's University, 90 Bader Lane, Kingston, Ontario, K7L 3N6, Canada.

**Keywords:** Microwave Assisted Extraction, ion exchange chromatography, inductively coupled plasma mass spectrometry, seafood, arsenic, speciation, on-line leaching, bio-accessibility

\* Corresponding author's e-mail: t.guerin@afssa.fr

**Abstract**

The determination of several arsenic (As) species in seafood samples was performed by ion exchange chromatography (IEC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) following microwave-assisted extraction (MAE). The effect of five parameters (sample weight, methanol (MeOH) concentration, solvent volume, heating temperature and time) on total As extraction recoveries, was evaluated in seafood certified reference materials (CRMs). The amount of MeOH was found to be the most influent parameter. The amount of total As and of As species with the 2 best extraction conditions (100% H<sub>2</sub>O and 80% MeOH) were generally similar in the 5 seafood CRMs considered. However, it was demonstrated that MeOH co-elutes with As(III) and could overestimated it's determination. So, the 100% H<sub>2</sub>O extraction conditions were selected for real applications of 5 different seafood products and for the validation of the method. In these conditions, limits of quantification (LOQ) ranged from 0.02 to 0.07 mg As kg<sup>-1</sup>, which were generally similar to those previously reported. Total As and As species recoveries were in the range of 84-125%, with accuracy and selectivity considered as acceptable. Moreover, the precision under repeatability (CV<sub>r</sub>) and intermediate precision reproducibility (CV<sub>b</sub>) were in the range of 3.5-7.5% and 7.7-16%, respectively. The validated method was combined to a simple, pragmatic and rapid on-line leaching method to assess the maximum bio-accessibility of As in seafood samples. This work is the first to directly show, by comparison of bio-accessible and extracted data, that inorganic species may be less bio-accessible than other species in seafood samples.

## 1. Introduction

Usually, risk assessment for arsenic (As) taking into consideration exposure through seafood products (identified as important contributors in human exposure to As)<sup>1</sup> is mostly based on their total As content, which does not provide enough information on their safety for human consumption. Indeed, toxicity studies have shown that health risks to humans do not always correlate with the external exposure dose to the elements.<sup>2</sup> Seafood products containing a high level of total arsenic can be declared unsafe, whereas the actual As toxicity depends on its chemical form<sup>3</sup> and also its bio-availability.<sup>2</sup> So, it remains of primary importance to develop robust arsenic speciation methods to precisely identify, quantify and thus evaluate risks for the consumer.

The majority of As speciation methods used high performance liquid chromatography (HPLC) to perform the separation with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).<sup>4</sup> Indeed, this hyphenation combines a rapid, powerful and reproducible separation method with a very efficient detector that is recognised for its high sensitivity and wide linear dynamic range. Over the last decade, several studies based on the work of Londeborough et al.<sup>5</sup> used a Dionex anion-exchange column with a nitric acid (HNO<sub>3</sub>) gradient for a satisfactory separation of both inorganic and organic species in a single chromatographic run.<sup>5,9</sup> It has been applied to various food matrices, such as mushrooms<sup>5</sup> or fish products.<sup>5,9</sup> The major advantage of this column is that the solely HNO<sub>3</sub> eluent avoid any potential clogging problems of the ICP-MS system from phosphate or carbonate solvents.

Prior to the separation and detection of As species, an extraction step is necessary and crucial to preserve the initial As content and species.<sup>10</sup> Different extraction methods were tested and reported in the literature such as classical liquid-solid, sonification, enzymatic or microwave-assisted extractions (MAE). This last method has been increasingly used for arsenic species extraction from various food matrices such as fish products or plants. A low temperature (80-120 °C) and a limited heating time (2-10 min) are generally selected in order to keep intact the carbon-arsenic bonds.<sup>11</sup> Kirby et al.<sup>12</sup> showed that the extraction recovery could be improved with a heating temperature close to the solvents boiling point. Brishin and Caruso<sup>13</sup> compared several total As extraction

methods by applying them to a hepatopancreas lobster certified reference material (CRM) ( TORT 2). They showed that a MAE procedure was the simplest, fastest and most reproducible extraction method, providing similar or better recovery rates than those observed with others methods. Brishin and Caruso<sup>13</sup> have also tested several solvents (H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH mixture or HNO<sub>3</sub>) and heating times (2, 4 and 6 minutes). A second paper has confirmed that these conditions were suitable for the quantification of As species.<sup>14</sup>

A milliq water and methanol (H<sub>2</sub>O/MeOH)<sup>12,20</sup> mixture or only H<sub>2</sub>O<sup>13,15,23</sup> are generally used as solvent (Table 1). Sometimes, others solvents were tested such as tetramethylammonium hydroxide (TMAH),<sup>18,24</sup> HNO<sub>3</sub>,<sup>13,16</sup> alkaline alcohol for inorganic species (quantification of As(III+V) only)<sup>25,26</sup> or a "Suc / 2(N-methylmorpholine)ethanesulphonic acid (MES) / ethylene diamine tetracetic acid (EDTA) / ascorbate" mixture.<sup>24,27</sup> Foster et al.<sup>16</sup> showed that a HNO<sub>3</sub> (2%) solvent (or a MeOH/H<sub>2</sub>O solvent mixture followed by HNO<sub>3</sub> (2%)) improved the extraction of the arsenic from difficult-to-extract materials (plant and animal digestive tissue). However, the total As extraction recoveries reported with HNO<sub>3</sub> in DORM 2 and TORT 2 (102% in both) were similar to those observed with H<sub>2</sub>O/MeOH (1/1 v/v) (98 et 88%, respectively). Moreover, the low HNO<sub>3</sub> pH is likely to disturb the chromatographic separation of arsenic species in extracted samples. Ackley et al.<sup>18</sup> reported that TMAH solvent allowed satisfactory extraction of total As (95%) in DORM 2. Nevertheless, Quaghebeur et al.<sup>24</sup> showed that this reagent induced oxidation of As (III) into As(V) during the extraction process. These works and those of Chen et al.<sup>27</sup> reported satisfactory total As extraction from plants using a modified protein solvent. However, this type of solvent was not used for As extraction from seafood samples.

*In vivo* studies of oral As bio-availability, which typically consist of dosing experimental animals or humans with various concentrations of As and measuring the amount ending up in the blood stream, are generally considered the most reliable approaches of reality,<sup>28</sup> but remain very complex, expensive and time-consuming. However, the bio-availability of an element depends on its bio-accessibility, which is defined as the fraction of the external dose that is released from the environmental matrices in the gastrointestinal tract and becomes available for absorption.<sup>28,29</sup>

3

4

Several *in vitro* models, reviewed by Imawongse and Dean<sup>29</sup>, have been developed to assess the bio-accessibility of As and, so, to approach the predictive availability of this element for humans. Generally, the methods used are batch gastrointestinal models, which mimic the real processes that occur through the human digestive tract by sequentially exposing samples to simulated digestive fluid conditions. However, many studies limited themselves to simulated gastric and intestinal juices and did not include a reaction with saliva.<sup>30-34</sup> Besides, the majority has been applied to soil samples, a few in seaweeds<sup>30-32</sup> and only one in seafood<sup>30</sup> or in rice.<sup>35</sup> Moreover, the comparison of 5 different *in vitro* gastrointestinal models showed a wide range of bio-accessibility values.<sup>34</sup> In contrast to the usual batch method, the rapid and pragmatic on-line leaching approach, developed previously,<sup>9,35</sup> allows the continuous monitoring in real time of the progressive release of As by saliva, gastric and intestinal juices in order to assess bio-accessibility of total As in seafood products. In addition, the combination of this on-line approach and ion exchange chromatography (IEC) coupled to ICP-MS also allows the speciation of bio-accessible As in order to precisely identify and quantify the different As species involved in the gastro-intestinal tract processes for a better risk assessment to the consumer. Results showed that the totality of bio-accessible total As was released by saliva in a few minutes. However, the amount of bio-accessible As species reported remained to be compared with the initial amounts of these As species in the samples.

The aims of this work were: (1) to optimise conditions of the MAE procedure for the extraction of total As and As species in seafood samples and quantification by IEC/ICP-MS developed in a previous work,<sup>8</sup> (2) to evaluate figures of merit such as linearity, limits of quantification, accuracy, specificity and precision for each As species in order to validate the method; (3) to compare the MAE values to those obtained by combining this method to the on-line leaching method, previously developed,<sup>9</sup> for the measurement of bio-accessible As species from seafood products in each collected leachate.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

An X Series<sup>II</sup> ICP-MS instrument (Thermo Electron, Courtaboeuf, France) was used for quantification of total As and As species. An ASX 520 autosampler (CETAC, Nebraska, USA) supplied the sample solutions to the peristaltic pump of the ICP-MS instrument. Aerosol carrier, auxiliary and plasma gas flow rates were set to 0.9, 0.8 and 15 L min<sup>-1</sup>, respectively. The ICP-MS operating conditions were selected as described previously.<sup>8</sup>

The Ultimate 3000 chromatographic system, an injection valve with a 100- $\mu$ L injection loop, an IonPac AG7 guard column, and an IonPac AS7 (250 x 4 mm,  $\varnothing$ 10 mm particles) anion-exchange column (all Dionex, Voisins Le Bretonneux, France) were used for the separation of As species. The analytical column was connected to the nebuliser of the ICP-MS instrument using a 50-cm long PEEK tubing ( $\varnothing$ 0.17 mm i.d.). The operating conditions used were reported previously.<sup>8</sup>

For continuous leaching and arsenic species quantification, data acquisition was carried out in time-resolved analysis (TRA) mode, with one scan per replicate and a dwell time of 500 ms.  $m/z = 52$  (<sup>40</sup>Ar<sup>35</sup>Cl) (to check the carbon content of samples),  $m/z = 75$  (<sup>75</sup>As) and <sup>40</sup>Ar<sup>37</sup>Cl),  $m/z = 77$  (<sup>77</sup>Se), <sup>40</sup>Ar<sup>37</sup>Cl) and  $m/z = 82$  (<sup>82</sup>Se) were monitored. The chromatographic software (Plasmalab) of the ICP-MS instrument was used for peak area calculations. Continuous nebulisation was used for total As quantification in extracted samples and for checking the mass balance. Data acquisition was then performed in the steady-state mode. The following mathematical correction equation was used:

$$a_{\text{As}}(I^{75}_{\text{As}}) = I^{75}_{\text{As}} - 3.127 \times \left[ \frac{I^{77}_{\text{Se}}}{I^{77}_{\text{Se}}} - 0.826 \times \frac{I^{82}_{\text{Se}}}{I^{82}_{\text{Se}}} \right]$$

(with  $3.127 = \frac{I^{75}_{\text{As}}}{I^{77}_{\text{As}}} - \frac{I^{77}_{\text{Se}}}{I^{77}_{\text{Se}}}$  and  $0.826 = \frac{I^{82}_{\text{Se}}}{I^{82}_{\text{Se}}}$  abundance ratio).

Sample extraction was carried out using a Multihware (Anton-Paar, Courtaboeuf, France) closed-vessel microwave digestion system equipped with a rotor for 6 sample vessels (50-mL type-X quartz tubes, 75-bar operating pressure). A Universal 320 centrifuge (Hettich, Tuttingen, Germany) operated at 3500 rpm for 10 min was used as needed to separate the supernatant from undissolved material after extractions. Nylon disposable syringe filters of 0.45  $\mu$ m (Nalge Nunc International Corporation, Rochester, NY, USA) were used for sample filtration.



## 2.2. Reagents

Total As standard solutions were prepared in each reagent matrix using 1000 mg As L<sup>-1</sup> solution (Fisher Scientific, Elancourt, France) along with purified water (18 MΩ cm) from a Milli-Q® Advantage A10® system (Millipore S.A., St Quentin en Yvelines, France). HNO<sub>3</sub> (Suprapur, 65%, Merck, Darmstadt, Germany) was used for the digestion of residues. Some 1000 mg As L<sup>-1</sup> standard stock solutions of As compounds were prepared from the following reagents: sodium (meta) arsenite (As(III)) (≥ 99.0%), sodium arsenate dibasic heptahydrate (As(V)) (≥ 98.5%), disodium methyl arsenate (MA) (≥ 98.4%), cacodylic acid (DMA) (≥ 99.0%) (all Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), arsenobetaine (AB), arsenocholine (AC), trimethylarsine oxide (TMAO) (all Argus Chemicals, Vernio, Italy) as well as tetramethylarsonium (TETRA) and trimethylarsinopropionate (TMAP) kindly provided by Prof. K.A. Francesconi (Institute of chemistry, University Graz, Austria). Stock solutions of each As compound were stored at 4 °C in the dark. The stability of these standards in terms of total As content and purity of the species was checked by ICP-MS. Each stock solution was further diluted to 1 mg As L<sup>-1</sup>, out of which multi-compound calibration standards were prepared daily. MeOH (Uchrosolv, 99.9%, Merck) and HNO<sub>3</sub> (Suprapur, 65%, Merck) were used for the eluents. Artificial saliva, gastric juice and intestinal juice were prepared in compliance with USP XXIII.<sup>36</sup> Artificial saliva was prepared by diluting 6.8 g of potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) monobasic (ACS reagent, ≥ 99.0%, Sigma Aldrich) and 77 mL of 0.2 M sodium hydroxide (NaOH) (AnalaR Normapur, 32%, VWR, Fontenay-sous-bois, France) to 1 L using Milli-Q water, and by adjusting the pH to 6.5, using 0.2 M NaOH. For the artificial gastric juice, 2.0 g of sodium chloride (NaCl) (ACS Reagent, 99.0%, Sigma Aldrich), 3.2 g of pepsin (from porcine stomach mucosa, Sigma Aldrich) and 7.0 mL of concentrated hydrochloric acid (HCl) (Suprapur, 30%, Merck) were diluted to 1 L (pH 1.2) using Milli-Q water. Artificial intestinal juice was prepared by diluting 6.8 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 g of pancreatin (from porcine pancreas, Sigma Aldrich) and 77 mL of 0.2 M NaOH to 1 L with Milli-Q water, and by adjusting the pH to 6.8, using 0.2 M NaOH.

7

## 2.3. Seafood reference and real samples

TORT-2 (Lobster Hepatopancreas), DORM-2 (Dogfish muscle), DOLT-3 (Dogfish liver), DORM-3 (Fish protein) and CRM 627 (Tuna fish) CRMs were purchased from Promochem (Molsheim, France). 5 lyophilised real seafood samples prepared and used for a previous study (mussels, sea-bream, winkles, mackerel and canned mackerel) were also tested.<sup>37</sup> All samples were used as provided without further grinding.

## 2.4. On-line continuous leaching procedure

The continuous leaching procedure was as described previously.<sup>9,35</sup> The mini-column was prepared by loosely packing (to minimize back-pressure) about 200-mg aliquots of solid sample wrapped into a Isopore membrane (0.4 µm, 47-mm id) filter (Millipore) placed in a PTFE tubing (8-cm long, 3/16-in od, 1/8-in id) between two quartz wool plugs. It was connected to the ICP-MS nebuliser by a PTFE tubing (35-cm long, 0.8 mm id). Each reagent (artificial saliva, gastric juice and intestinal juice) was pumped by a peristaltic pump into the mini-column. Both the reagents and the mini-column were maintained at 37 °C in a thermostated water bath. Leaching times were selected according to human physiology: 5 min for saliva, 1 hour each for gastric and intestinal juices, which was then cut back to 20 min. Quantification for the continuous leaching procedure was performed by external calibration, by repeated injection of standards solutions, which were prepared daily in each reagent, through a 100-µL injection loop mounted on a universal manual actuator (All Interchim, Montluçon, France). A blank consisting of leaching a mini-column containing only a filter and quartz wool plugs was also analysed.

## 2.5. Mass balance

The residue remaining, following the leaching with the 3 reagents, was collected and digested in a mixture of 6 mL H<sub>2</sub>O/HNO<sub>3</sub> (1/1 v/v). The microwave digestion procedure used was described previously.<sup>38</sup>

8

## 2.6. Microwave assisted extraction procedure

The extraction procedure tested in this study was based on the method reported by Brishin and Caruso.<sup>15</sup> Samples of 0.150 g were accurately weighed into 50-mL quartz vessel and 10 mL of a mixture of MeOH and MilliQ H<sub>2</sub>O (v/v) was added. The quartz vessels (6 at a time) were then assembled and placed into the microwave system. The samples were heated and maintained at 80 °C for 4 minutes. They were cooled to 30 °C before opening the extraction vessels. They were then removed, centrifuged, filtered through a 0.45 µm nylon disposable syringe filter before analysis.

## 2.7. Arsenic species determination procedure

Arsenic species in extracted samples or saliva leachates were analysed by a previously developed (ECC/ICP-MS) speciation method.<sup>8</sup> A HNO<sub>3</sub> gradient (pH 3.3-1.3), with 1% of MeOH in the mobile phase, was used to separate arsenic species in a single chromatographic run. For the bio-accessibility application, the saliva leachates were collected and at least 10-fold diluted (in order to reduce the effect of salts on the chromatographic separation) before analysis. A 5-point external calibration (0-60 and 0-20 µg As L<sup>-1</sup> for AB and other species, respectively) was carried out with the respective standard compounds that were prepared daily in the same matrices as the extracted samples or saliva leachates. Londersborough et al.,<sup>5</sup> and Simon et al.<sup>7</sup> reported that the MA peak, for some real samples, split into a large broad peak co-eluting closer to As(III) and a sharper one. This phenomenon, due to the fact that, at mobile phase pH (3.3), protonated and non-protonated MA forms are equally abundant,<sup>7</sup> could explain the difficulties encountered previously in saliva for TORT 2 and CRM 627.<sup>9</sup> In the present work, the phenomenon was observed for real matrices, but the resolution between arsenite and the first peak of MA still permitted the quantification.

## 2.8. Total arsenic determination procedure

The total arsenic concentration in extracted samples or residues was determined by a previously reported ICP-MS method.<sup>38</sup> A 5-point external calibration was carried out with the respective standard compounds that were prepared daily in the same matrices as the extracted samples or residues.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimisation of MAE procedure

#### 3.1.1. Preliminary study

The aim of this preliminary part was to determine factors that could have a significant effect on the total As extraction recovery from seafood samples. Five factors were selected for the study: (1) sample weight (0.05-0.20 g by step of 0.05 g), (2) heating time (2, 4, 6 min), (3) MeOH concentration in solvent (0-100%, by step of 20%), (4) solvent volume (10-20 mL) and (5) heating temperature (80, 100, 120 °C). Initially, the As total extraction recovery (R) from DORM 2 and CRM 627 (certified in total As: 18.0 and 4.8 mg kg<sup>-1</sup>, respectively) were selected as the responses to optimise, which were calculated as follow:  $R = (X_r / X_s) \times 100$  (with  $X_r$  and  $X_s$  defined as, respectively, found and certified total arsenic value). Results of this preliminary study (data not shown) indicate that the MeOH concentration in the solvent had the most effect on the 2 responses and that the best total As extraction recoveries were obtained with 100% H<sub>2</sub>O or MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v). As shown in Table 1, these results agree with those of Brishin and Caruso<sup>15</sup> (95-106%) for TORT 2, Ackley et al.<sup>18</sup> (104-114%) and Wang et al.<sup>17</sup> (99%) for DORM 2 who reported the best total As extraction recovery with MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v). Moreover, the extraction recovery observed in 100% H<sub>2</sub>O in TORT 2 by Brishin and Caruso<sup>15</sup> (89-93%) was also satisfactory, as well as results obtained by Nankawa et al.<sup>22</sup> in rice (97-106%). Even if Hirata et al.<sup>20</sup> reported slightly better total As extraction recovery in DORM 2 with a mixture of 50% MeOH/H<sub>2</sub>O, only H<sub>2</sub>O was used for the extraction of others seafood matrices. Finally, total As extraction recoveries observed by Karthikeyan and al.<sup>19</sup> in shrimps and Karthikeyan et al.<sup>21</sup> in seafood samples after H<sub>2</sub>O extraction

were in the range of 84-87 and 85-105%, respectively, whereas those reported by Karthikeyan<sup>15</sup> using a H<sub>2</sub>O/MeOH (1/1, v/v) mixture ranged from 48 to 105%.

To a lesser extent, sample weight had a significant effect on total As extraction recoveries. The other 3 parameters appeared to have no significant effect on extraction recoveries. They were fixed as reported by Britshin and Caruso<sup>13</sup> (i.e. (1) sample weight (0.15 g), (2) heating time (4 min), (4) volume of solvent (10 mL), (5) heating temperature (80 °C)) in order to compare 100% H<sub>2</sub>O and MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v) extraction conditions for both total As and As species extraction recoveries from several seafood CRMs.

### 3.1.2. Comparison of 100% H<sub>2</sub>O and MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v) extraction conditions

Figure 1 shows the extraction recovery for certified total As (A) and As species (B) in 5 CRMs. All observed values were in good agreement with certified values (100%,  $k = 2$ ). No significant difference was noticed between both extraction conditions, except for AB in CRM 627 after 100% H<sub>2</sub>O extraction, which resulted in a slightly over-estimated (125%) extraction recovery.

Total As extraction recoveries observed in TORT 2 (95-103%) were higher than the value of Hirata et al.<sup>29</sup> (76%) and close to those reported by Kirby et al.<sup>12</sup> (92%), Britshin and Caruso<sup>13</sup> (89-106%), Karthikeyan<sup>15</sup> (92 %) and Foster et al.<sup>16</sup> (88-102%). Moreover, values in DORM 2 (99-109%) were similar to the results reported by Kirby et al.<sup>12</sup> (103%), Karthikeyan<sup>15</sup> (101%), Foster et al.<sup>16</sup> (98-102%) and Wang et al.<sup>17</sup> (99%), and slightly better than those of Ackley et al.<sup>18</sup> (76-114%) and Hirata et al.<sup>29</sup> (86-98%). The total As extraction recovery observed with CRM 627 (108%) in H<sub>2</sub>O conditions was slightly higher than that reported by Nakazato et al.<sup>23</sup> (88%).

Table 2 compares the results obtained using both sets of extraction conditions for the 5 seafood CRMs. The sum of TMAO and TMAP values are shown because these 2 species co-eluted under the chromatographic conditions used.<sup>9</sup> In general, the sum of As species agreed with certified total As values for both extraction conditions (except in TORT 2) and were slightly better for 100% H<sub>2</sub>O. The difference observed in TORT 2 may be partially explained by the concentration of several unknown peaks (identified as OH-arsenothiose and PO<sub>4</sub>-arsenothiose (0.35 and 0.56 mg kg<sup>-1</sup>) by

Foster et al.<sup>16</sup>) estimated at about 0.8 mg kg<sup>-1</sup> under both sets of extraction conditions (using the AB standards). The observed values for As(V), AB, TMAO + TMAP, AC, DMA (except in TORT 2) and TETRA after 100% H<sub>2</sub>O extraction were generally close to those observed after MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v) extraction, for all CRMs studied. On the other hand, As(III+V) values were systematically higher with MeOH extraction. As reported by Kohmeyer et al.<sup>6</sup>  $m/z = 52$  and 75 signals acquisition for solutions containing various MeOH concentrations (data not shown) indicated that MeOH elutes at the very beginning of the chromatogram in conjunction with As(III). So, the signal enhancement observed for As (III), which was proportional to the amount of MeOH explains the over-estimation observed.

Results for the 5 seafood CRMs studied showed that the 2 extraction conditions investigated gave generally similar total As and As species values. Moreover, accuracy for total As and As certified species seems acceptable. However, it appears that MeOH induces higher As(III) values. Consequently, in order to avoid the possible over-estimation of As (III), and also to simplify the extraction procedure, the H<sub>2</sub>O-only extraction conditions were selected for the remainder of this work. These conditions are also the most compatible with the long-term stability of ICP-MS detection. Fig 2 shows a chromatogram observed for DORM 3 after H<sub>2</sub>O MAE.

Table 3 shows total As extraction recoveries observed for various real seafood samples<sup>7</sup> after H<sub>2</sub>O MAE. The extraction recoveries were satisfactory and ranged from 87 to 95%. Moreover, the sum of As species separated and quantified in these HPLC/ICPMS conditions were generally similar to the total As values observed after MAE and HNO<sub>3</sub> digestion, except in winkles. This difference could be explained by the presence of an unknown peak between As(V) and AB, estimated at about 5 mg kg<sup>-1</sup> (using the AB standards).

Table 4 compares As species and total As values obtained for DORM 2, TORT 2 and CRM 627 in this work with those reported in the literature over the last decade. To the best knowledge of the authors, no study reported As species values for DOLT 3 and DORM 3. The values for DMA, AB, TMAO + TMAP, AC and TETRA for the 3 CRMs were generally in good agreement with the majority of mean values reported previously.

11

12

As discussed by Sloth et al.,<sup>49</sup> a large variability exists between the reported values obtained by different extraction and separation methods; hence, no consensus value for inorganic arsenic could be established in any of these CRMs. This is even more obvious in the case of As(V) values observed in DORM 2 where 6 values are higher than 0.280 mg As kg<sup>-1</sup> (including one higher than 1 mg kg<sup>-1</sup>) whereas 8 values are lower than 0.05 mg As kg<sup>-1</sup> (including 5 similar to the value of this work). Moreover, a relevant comparison of As(III+V) and MA values remains difficult, as they were very seldom investigated in the past, even more so in TORT 2 and CRM 627 (Table 4). In DORM 2, these values are generally comparable or slightly lower than those found in the literature whereas those in TORT 2 are largely higher. The possible overestimation of these species could be due to coelution with unknown peaks or transformation of certain species during the extraction process. These aspects remain unclear and will be the subject of further investigations by the scientific community.

### 3.2. In-house validation of the method

The optimised extraction and separation conditions for arsenic speciation in seafood samples were used to validate the method, whose figures of merit are presented in Table 5. The linearity of the calibration curves was considered satisfactory in the defined range (0-60 and 0-20 µg As L<sup>-1</sup> for AB and for other species, respectively) with a correlation coefficient  $r^2 > 0.995$  in all cases while retention times and peak area varied by less than 7 and 15%, respectively (n = 10 on different days). The limits of quantification (LOQ) were defined as 6 times the standard deviation (SD) of values from blank samples (n = 10) after correction for sample weight and dilutions. Then, the LOQ accuracy was checked by analyzing a solution doped with an amount of each species corresponding to the LOQ values (n = 5).<sup>58</sup> The means of the resulting values were in good agreement with the target value in all cases (confidence interval = ± 30% of target value). The LOQ values estimated were generally slightly better than or similar to most of those previously reported.<sup>54,41,7,20,23,49,55-57</sup> Accuracy, calculated as percentage of the certified values of the 5 CRMs, was 103, 102, 125 and 84-108% for DMA, AB and total As, respectively. As no certified value was available for several

species, method accuracy was demonstrated by spiking low, medium and high concentrations (2, 5 and 10 µg As L<sup>-1</sup>, respectively) of As species standard (6, 15, 30 µg As L<sup>-1</sup> for AB) into various real seafood samples before the extraction. Recoveries are shown in Table 5. The mean for the 15 spikes ranged between 93 and 109%.

The regression line was also tested against a unity line (slope = 1, intercept = 0) by simultaneously testing the hypotheses of slope different from 1 and intercept different from 0, using Student's t-test.<sup>59</sup> Selectivity of the method was considered as acceptable since  $t_{observed} < t_{critical}$  values for all As species, i.e. the slope and intercept of this regression line were not different from 1 and 0, respectively.

For each species, the precision under repeatability  $CV_r = 100 \times \sqrt{\frac{s^2_r}{\bar{Y}}}$ , where  $\bar{Y}$  is the mean of observed values and  $s^2_r$  is the repeatability variance, was investigated by analysing different seafood samples at different levels in the defined linear range ( $p = 8$ ;  $n = 5$ ). Estimated  $CV_r$  ranged between 3.5% and 7.5% for all the As species (Table 5). The very limited data for AC did not make it possible to estimate its  $CV_r$ . A verification of the precision stability was also checked by a Cochran test,<sup>59</sup> which showed that the variances of the various samples were homogeneous for the As species studied with  $\max(s)^2$  or  $\log \max(s)^2 < \text{critical value}$ . The precision results also showed acceptable repeatability (within-test variance) for all species.

For each species, the precision under reproducibility  $CV_R$  was investigated by analysing various seafood samples (p = 10) on 3 different days. The intermediate precision reproducibility was estimated as  $CV_R = (100 \times \sqrt{\frac{s^2_L + s^2_D}{\bar{Y}}})$ , where  $\bar{Y}$  is the mean of observed values,  $s^2_L$  is the variance that measures sample variations and  $s^2_D$  is the repeatability variance.  $CV_R$  ranged between 7.7 and 15.8% (Table 5). Once again, the very limited data for AC did not make it possible to estimate its  $CV_R$ . These last results were used for the calculations of uncertainty given as 95% confident interval (k = 2) as follows: uncertainty =  $(k \times X_j \times CV_R) / (100 \times \sqrt{n})$ . Uncertainties ranged between 16 and 32% for arsenic species.

### 3.3. Application: total As and As species bio-accessibility

The validated method was then applied to assess bio-accessible total As and As species after on-line leaching in TORT 2, DORM 3 and CRM 627 (n = 5) (Table 6). Bio-accessible total As results were very close to those reported previously with another ICP-MS instrument.<sup>9</sup> All bio-accessible total As were released by saliva in less than 5 minutes and the mean of values in these 3 CRMs was about 50%. With IEC/ICP-MS used in the present work, no change in chromatographic conditions was necessary, contrary to previous reported work.<sup>9</sup> Only an (at least) 10-fold dilution was necessary to reduce the effect of saliva salts on the separation and obtain a good compromise between peaks resolution and sensitivity. The sum of As species and residue values are in good agreement with certified total As value for the 3 CRMs. Moreover, bio-accessible As species values were also generally very close to those reported in previous work, except As(III + V) bio-accessible values discussed previously in TORT 2 and CRM 627.<sup>9</sup> Indeed, these values were over-estimated in previous work with a less sensitive ICP-MS instrument. The better LOQ and resolution between As(III) and MA of the present IEC/ICP-MS system could explain the lower and probably more accurate results obtained in this work.

Table 6 also shows the ratio between bio-accessible As species and total As values and the amounts extracted by the MAE method for the 3 CRMs. First, this ratio could be very different for As species depending on the matrix tested even if the total As ratios were very similar for the 3 CRMs (about 50%). Means of 3 CRMs ratios for MA and DMA (46 and 50%, respectively) were very close to that for total As (52%) whereas AB and TMAO ratios (63 and 61%, respectively) appeared slightly higher. Finally, even if some differences were observed between CRMs, the mean inorganic species ratios accounted for only about 30% of total As extracted value. So, the most toxic forms, As(III) and As(V), seem to be slightly less bio-accessible than other As species in seafood samples. Unfortunately, the bio-availability and bio-accessibility of As in seafood has not been systematically investigated in the past, and works in literature were focused on soil matrices.<sup>2,29</sup> Moreover, to the best knowledge of the authors, comparison of bio-accessible of several inorganic

and organic As species in seafood samples was never carried out before. Nevertheless, these results confirmed works of Koch et al.<sup>30</sup> that indirectly demonstrated that different total As bio-accessibilities were observed in clams according to the amount of inorganic arsenic in samples. Indeed, total As in clams with high inorganic As species concentration appeared less bio-accessible than that in clams with high organic As species. In the same way, some studies showed that bio-accessibility of total As in seaweeds was high (62-79% for Koch et al.,<sup>30</sup> 38-87% for Almeida et al.<sup>31</sup> and 32-67% for Laparra et al.<sup>32</sup>), whereas amounts of inorganic As were low in these matrices. These tendencies will have to be confirmed by testing a larger number of seafood matrices.

#### 4. Conclusions

Microwave assisted extraction with 100% H<sub>2</sub>O provided a satisfactory recovery of all As species in the 5 seafood CRMs considered. The method was validated and will be used as a reference method for the determination of arsenic compounds in seafood. This method can also be used to evaluate the exposure of the French population within the framework of the second French Total Diet Study (FTDS 2).

The on-line continuous leaching method provides a simple, pragmatic and rapid approach to assess the maximum bio-accessibility of total As and As species in seafood products, and could be used for screening prior to a longer and more expensive *in vivo* study to assess bio-availability.

Moreover, for an evaluation more precise of the risks, it would be necessary to study the influence of food cooking and culinary preparation on bio-accessibility of total As and As species in seafood, as previously reported in seaweed and rice.<sup>22,23</sup> In addition, a comparison of our continuous leaching method with the European batch method "BARGE" (or BioAvailability Research Group Europe),<sup>24</sup> which aims to establish a harmonized methodology for a more realistic evaluation of the oral bio-availability of the elements traces, could also be investigated.

#### References

- [1] U. Ballin, R. Kruse, H.S. Russel, Fresenius' J. Anal. Chem. 350 (1994) 54.
- [2] D. Caussy, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 56 (2003) 164.
- [3] B.K. Mandal, K.T. Suzuki, *Talanta* 58 (2002) 201.
- [4] K.A. Francesconi, D. Kuehnle, *Analyst* 129 (2004) 373.
- [5] S. Londešborough, J. Matusch, R. Wennrich, Fresenius' J. Anal. Chem. 365 (1999) 577.
- [6] U. Kohlmeier, J. Kuballa, E. Jantzen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 965.
- [7] S. Simon, H. Tran, F. Pannier, M. Poit-Gautier, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 105.
- [8] V. Dufrailly, L. Noel, J.M. Fremy, D. Beauchemin, T. Guérin, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 1168.
- [9] V. Dufrailly, T. Guérin, L. Noel, J.M. Fremy, D. Beauchemin, *J. Anal. At. Spectrom.* 23(9) (2008) 1263.
- [10] Z. Gong, X. Lu, M. Ma, C. Watt, X.C. Le, *Talanta* 58 (2002) 77.
- [11] C. BHymer, J.A. Caruso, *J. Chromatogr. A* 1045(1-2) (2004) 1.
- [12] W.J. Kirby, W. Maher, *J. Anal. At. Spectrom.* 17(8) (2002) 838.
- [13] J.A. Britshin, J.A. Caruso, *Analyst* 127 (2002) 921.
- [14] J.A. Britshin, C. BHymer, J.A. Caruso, *Talanta* 58 (2002) 133.
- [15] S.H. Karlnikayan, S. Hirata, *Appl. Organomet. Chem.* 18 (2004) 323.
- [16] S. Foster, W. Maher, F. Krzkova, S. Apte, *Talanta* 71(2) (2007) 537.
- [17] R.-Y. Wang, Y.-L. Hsu, L.-F. Chang, S.-J. Jiang, *Anal. Chim. Acta* 590 (2007) 239.
- [18] K.L. Ackley, C. BHymer, K.L. Sutton, J.A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 845.
- [19] S.H. Karlnikayan, K. Honda, O. Shikino, S. Hirata, *Atom. Spectrosc.* 24(3) (2003) 79.
- [20] S. Hirata, H. Toshimitsu, M. Ahara, *Anal. Sci.* 22 (2006) 39.
- [21] S.H. Karlnikayan, S. Hirata, C.S.P. Iyer, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84(8) (2004) 573.
- [22] T. Narukawa, K. Inagaki, T. Kuroiwa, K. Chiba, *Talanta* 77(1) (2008) 427.
- [23] T. Nakazato, T. Taniguchi, H. Tao, M. Tomimaga, A. Miyazaki, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1546.

- [24] M. Quanghebeur, Z. Rengel, M. Smitk, J. Anal. At. Spectrom. 18(2) (2003) 128
- [25] E.H. Larsen, J. Engman, J.J. Stoth, M. Hansen, L. Jorhem, Anal. Bioanal. Chem. 381(2) (2005) 339
- [26] J.J. Stoth, E.H. Larsen, K. Julshamn, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 6011.
- [27] Z.L. Chen, K.F. Akter, M.M. Rahman, R. Naidu, Microchem. J. 89(1) (2008) 20
- [28] M. Robson, Ecotoxicol. Environ. Safety 56 (2003) 104.
- [29] M. Intawongse, J.R. Dean, Trends Anal. Chem. 25(9) (2006) 876.
- [30] I. Koch, K. McPherson, P. Smith, L. Easton, K.G. Doe, K. Reimer, J. Mar. Pollut. Bull. 54 (2007) 586
- [31] C. Almeida, J.M. Laparra, D. Véléz, R. Barbera, R. Farré, R. Montoro, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 7344
- [32] J.M. Laparra, D. Véléz, R. Montoro, R. Barbera, R. Farré, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 6080
- [33] J.M. Laparra, D. Véléz, R. Barbera, R. Farré, R. Montoro, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 8829
- [34] A.G. Oomen, A. Hack, M. Mirekus, E. Zeijlner, G. Schoeters, W. Verstraete, T.V.D. Wiele, J. Wrage, C.J.M. Rompelberg, A.J.A.M. Sips, J.H.V. Wijnen, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 3326.
- [35] M. Chu, D. Beauclerm, Can. J. Anal. Sci. Spectrosc. 50(5) (2005) 289
- [36] USP US Pharmacopeia XXIII, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 1995.
- [37] T. Guerin, V. Siroc, J-L. Volatier, J-C. Leblanc, Sci. Total Environ. 388 (2007) 66.
- [38] L. Noel, V. Dufailly, N. Lemahieu, C. Vassel, T. Guerin, J.A.O.A.C. Int. 88 (2005) 1811.
- [39] V. Dufailly, L. Noel, T. Guerin, Anal. Chim. Acta 611 (2008) 134.
- [40] S. Hirata, H. Toshimitsu, Anal. Bioanal. Chem. 383(3) (2005) 454.
- [41] J. Matusch, R. Wemrich, Anal. Chem. 70 (1998) 3649.
- [42] W. Goessler, D. Kuehnelt, C. Schlagenhauten, Z. Slejkovec, K. J. Irgolic, J. Anal. At. Spectrom. 13 (1998) 183.
- [43] O. Muñoz, O. Véléz, R. Montoro, Analyst 24 (1999) 601.
- [44] K. Falk, H. Emms, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 643.
- [45] D. Kuehnelt, K.J. Irgolic, W. Goessler, Appl. Organomet. Chem. 15(6) (2001) 445.
- [46] M.A. Sauer, V. Devesa, O. Muñoz, D. Véléz, R. Montoro, J. Anal. At. Spectrom. 16 (2001) 390.
- [47] K. Wrobel, B. Parker, S.S. Kannankumarath, J.A. Caruso, Talanta 58 (2002) 899.
- [48] R. Kubota, T. Kumio, S. Tanabe, Mar. Pollut. Bull. 45 (2002) 218.
- [49] J.J. Stoth, E.H. Larsen, K. Julshamn, J. Anal. At. Spectrom. 18 (2003) 452.
- [50] I. Pizarro, M. Gomez, C. Camara, M.A. Palacios, Anal. Chim. Acta 495(1-2) (2003) 85.
- [51] J.W. McKernan, J.T. Creed, C.A. Brockhov, J.A. Caruso, R.M. Lorenzana, J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999) 607.
- [52] R. Wahlén, S. McSheehy, C. Scrivner, Z. Mester, J. Anal. At. Spectrom. 19 (2004) 876.
- [53] M.J. Mato-Fernandez, J.R. Otero-Rey, J. Moreda-Pineiro, E. Alonso-Rodríguez, P. Lopez-Mahia, S. Munitegui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Talanta 71 (2007) 515.
- [54] S. Fitzpatrick, L. Ebdon, M. Foulkes, Int. J. Environ. An. Ch. 82 (2002) 835.
- [55] X. Cao, C. Hao, G. Wang, H. Yang, D. Chen, X. Wang, Food Chem. 113(2) (2009) 720.
- [56] J.L. Gomez-Artza, D. Sanchez-Rodas, I. Giraldez, E. Morales, Analyst 3 (2000) 401.
- [57] E. Sanz, R. Muñoz-Olivas, C.J. Camara, Chromatogr. A 1097 (2005) 1.
- [58] Agence Française de Normalisation, NF XPT 90-210 AFNOR Standard, AFNOR: Saint-Denis, France, 1999.
- [59] Agence Française de Normalisation, NF V03-110 AFNOR Standard, AFNOR: Saint-Denis, France, 1998.

Table 1. Total As extraction recoveries after MAE process in literature

Solvent composition	Samples	Total As Extraction recoveries (%)	Ref
<b>H<sub>2</sub>O</b>	CRM 627	88	23
	DORM 2	76-82	18
	DORM 2	86	20
	TORT 2	76	20
	TORT 2	89-93	13
	Shrimp <sup>a</sup>	84-87	19
	seafood matrices	85-105	21
	seafood matrices <sup>a</sup>	53-112	20
	ricea	97-106	22
	<b>H<sub>2</sub>O/McOH (1/1, v/v)</b>	DORM 2	103
DORM 2		98	20
DORM 2		98	16
DORM 2		101	15
TORT 2		92	12
TORT 2		88	16
TORT 2		92	15
seafood matrices <sup>a</sup>		48-105	15
seafood matrices <sup>a</sup>		58-88	12
marine plants <sup>a</sup>		30-81	16
Shrimp <sup>a</sup>	87-88	19	
<b>H<sub>2</sub>O/McOH (1/4, v/v)</b>	DORM 2	104-114	18
	DORM 2	99	17
	TORT 2	95-106	13
<b>HNO<sub>3</sub> (2%)</b>	DORM 2	102	16
	TORT 2	102	16
	TORT 2	87-91	13
	marine plants <sup>a</sup>	44-107	16
<b>H<sub>2</sub>O/McOH (1/1, v/v) + HNO<sub>3</sub> (2%)</b>	DORM 2	101	16
	TORT 2	91	16
	marine plants <sup>a</sup>	51-92	16
<b>TMAH (5%)</b>	DORM 2	95	18
	plants <sup>a</sup>	95	24
<b>Modified protein</b>	plants <sup>a</sup>	97-130	24
	seafood samples <sup>a</sup>	84-101	27
<b>alkaline alcohol</b>	seafood samples <sup>a</sup>	-	25
	seafood samples <sup>a</sup>	-	26

a : freeze-dried or lyophilised samples, 0 : fresh samples defatted or not defatted

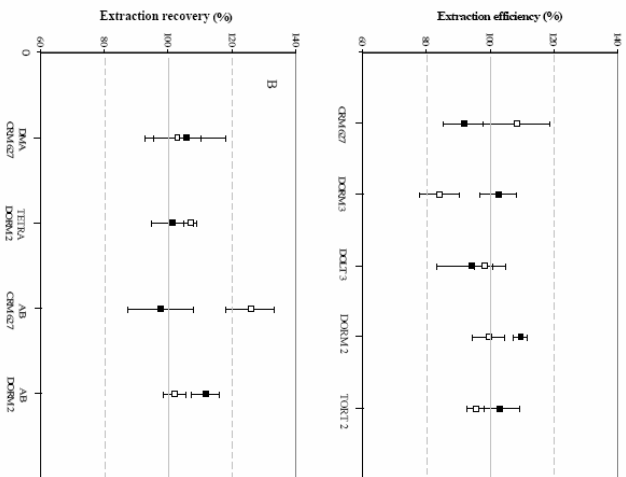


Fig. 1 Total As (A) and As species (B) extraction recovery observed after 100% H<sub>2</sub>O (blank) and McOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v) (black) extraction of 5 seafood CRMs. For both figures, grey full and dotted lines correspond to certified values and confidence intervals ( $k = 2, 10\%$ ), respectively. Errors bars correspond to observed values mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).



Table 2. As species and total As values for both extraction conditions in 5 seafood CRMs (n = 5)

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO+TMAP	AC	TETRA	Σ As Species	Total As extracted	Certified
TORT 2	A	0.408 ± 0.095*	0.460 ± 0.060	1.27 ± 0.14	0.725 ± 0.017	13.0 ± 1.8	1.41 ± 0.11	< 0.070	< 0.070	17.3 ± 2.2	20.6 ± 0.6
	B	0.588 ± 0.113	0.364 ± 0.150	0.711 ± 0.150	0.645 ± 0.099	12.2 ± 0.6	1.25 ± 0.18	< 0.070	< 0.070	15.8 ± 1.3	22.2 ± 1.4
DORM 2	A	0.031 ± 0.014	0.061 ± 0.008	0.359 ± 0.032	0.029 ± 0.018	16.7 ± 0.6	0.201 ± 0.016	< 0.070	0.265 ± 0.005	17.6 ± 0.7	17.9 ± 0.9
	B	0.064 ± 0.011	0.033 ± 0.024	0.314 ± 0.029	0.026 ± 0.002	18.3 ± 0.7	0.200 ± 0.041	< 0.070	0.251 ± 0.016	19.2 ± 0.8	19.7 ± 0.4
DOLT 3	A	0.074 ± 0.011	0.047 ± 0.008	0.480 ± 0.032	0.073 ± 0.007	8.11 ± 0.65	0.357 ± 0.093	< 0.070	< 0.070	9.1 ± 0.8	10.0 ± 0.3
	B	0.136 ± 0.004	< 0.015	0.417 ± 0.024	< 0.015	7.56 ± 0.20	0.452 ± 0.048	0.081 ± 0.022	< 0.070	8.6 ± 0.3	9.6 ± 1.1
DORM 3	A	0.085 ± 0.014	0.091 ± 0.028	0.459 ± 0.007	0.243 ± 0.023	4.69 ± 0.16	0.221 ± 0.028	< 0.070	< 0.070	5.8 ± 0.3	5.8 ± 0.4
	B	0.129 ± 0.018	0.066 ± 0.024	0.495 ± 0.054	0.276 ± 0.036	5.24 ± 0.26	0.188 ± 0.064	< 0.070	< 0.070	6.4 ± 0.5	7.1 ± 0.4
CRM 627	A	0.054 ± 0.014	0.063 ± 0.010	0.154 ± 0.011	< 0.015	4.86 ± 0.3	0.051 ± 0.010	< 0.070	< 0.070	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.5
	B	0.172 ± 0.071	< 0.015	0.158 ± 0.019	< 0.015	3.82 ± 0.4	0.099 ± 0.044	< 0.070	< 0.070	4.2 ± 0.5	4.4 ± 0.3

A and B: 100% H<sub>2</sub>O and MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1 v/v) extraction, \* ± SD (n = 5), \*\* Limit of quantification (see Table 5)

23

24

Samples	Σ As species <sup>a</sup>		Total As		Total As		Extraction recovery (%) <sup>d</sup>
	(H <sub>2</sub> O)	(MAE) <sup>b</sup>	(H <sub>2</sub> O)	(MAE) <sup>b</sup>	(HNO <sub>3</sub> digestion) <sup>c</sup>	(MAE) <sup>b</sup>	
Mussels	9.47 ± 0.57 <sup>a</sup>	11.1 ± 0.5	9.51 ± 0.32	10.4 ± 0.5	12.2 ± 0.5	10.4 ± 0.5	91
Seabream	10.4 ± 1.8	13.3 ± 1.3	19.7 ± 1.8	21.5 ± 1.3	9.67 ± 0.43	9.67 ± 0.43	92
Wahles	13.3 ± 1.3	19.7 ± 1.8	9.16 ± 0.17	2.21 ± 0.10	2.21 ± 0.10	2.21 ± 0.10	95
Mackerel	8.78 ± 0.36	1.91 ± 0.12	1.91 ± 0.12	2.21 ± 0.10	2.21 ± 0.10	2.21 ± 0.10	87
Canned mackerel	1.25 ± 0.08	1.91 ± 0.12	1.91 ± 0.12	2.21 ± 0.10	2.21 ± 0.10	2.21 ± 0.10	87

<sup>a</sup> Sum of As species values; <sup>b</sup> Total As values after MAE extraction; <sup>c</sup> Total As values after HNO<sub>3</sub> microwave digestion; <sup>d</sup> with a validated and accredited method (see ref 38, 39).  
<sup>d</sup> Extraction recovery =  $\frac{\text{Total As}}{\text{Total As}} \times 100$ ; \* ± SD

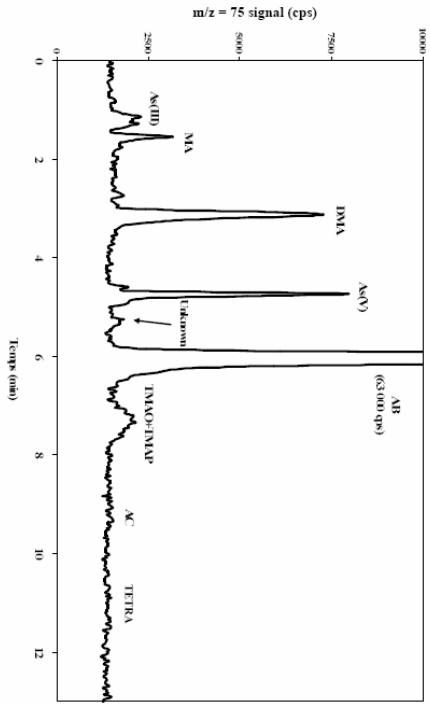


Fig. 2 Chromatogram observed for DORM 3 after H<sub>2</sub>O MAE process

Table 4. As species values observed in literature for DORM 2, TORT 2 and CRM 627.

	AC(III)	MA	DMA	AC(V)	AB	TMAO	AC	TETRA	Total As	Ref.
<b>DORM 2</b>	0.031	0.061	0.359	0.029	16.7	< 0.07*	0.265	17.9	This work	
	0.075	nd	0.281	0.024	16.4	0.207	0.280	18.0	Certified	
	nd	nd	0.280	nd	18.5	0.152	nd	18.8	A	
	nd	nd	0.280	0.160	16.8	0.170	0.023	18.5	A	
	0.110	0.310	0.250	0.160	16.0	0.340	nd	21	A	
	0.200	nd	0.160	1.90	16.5	nd	0.360	18.2	A	
	nd	0.070	0.320	0.020	17.1	0.010	nd	40	A	
	nd	0.050	0.340	0.020	16.2	0.160	0.430	15.0	20	A
	0.080	nd	0.280	0.480	17.5	0.160	0.270	18.4	16	A
	< 0.030	< 0.030	0.300	< 0.030	16.0	0.400	0.010	17.4	16	A
	0.100	nd	0.280	0.400	13.5	0.400	0.020	17.7	41	B
					17.2			17.7	42	B
					16.4	0.240	< 0.050	0.260	43	B
					15.9	< 0.001	0.110	0.250	44	B
	0.050	0.140	0.290	0.050	16.1	0.300	nd	17.4	46	B
	nd	nd	0.250	0.050	16.0	< 0.04	0.280	17.8	48	B
	0.300	0.300	0.660	15.8	0.181	0.010	0.260	17.8	49	B
	nd	0.018	0.280	0.280	17.0	0.270	nd	17.4	50	B
	nd	0.015	0.230	0.006	17.6	0.154	0.024	19.6	51	C
					15.6			17.2	52	C
								17.2	53	C
<b>TORT 2</b>	0.408	0.460	1.27	0.725	13.0	1.41	< 0.07	20.6	This work	
	nd	0.200	1.03	0.410	13.1	1.20	nd	21.6	Certified	
	0.187	1.33	0.684	13.6	19.9	0.055	16.2	14	A	
		1.06	0.470	12.8	21	14	21	14	A	
	0.500	1.10	0.500	12.2	0.80	nd	15.1	26	A	
	nd	1.04	0.320	13.9	1.20	0.040	0.050	19.0	16	A
	nd	1.70	0.780	14.4	1.40	0.060	0.050	22.0	16	A
	nd	0.030	0.97	0.581	13.8	0.150***	< 0.003	22.3	43	B
	nd	0.093	1.39	1.08	13.0	0.024	0.055	46	B	
	nd	0.093	0.84	0.093	14.3	0.84	0.044	19.7	49	B
	0.093	0.093	0.84	0.093	17.5			22.6	54	D
					14.2	0.024		21.6	55	E
<b>CRM 627</b>	0.054	0.063	0.154	< 0.015	4.9	0.051	< 0.07	5.2	This work	
	0.076	< 0.016	0.157	< 0.024	3.9	0.037	< 0.042	4.8	Certified	
	0.002	0.010	0.154	0.005	4.1	< 0.002		4.4	8	A
	nd	nd	0.159	0.015**	3.8			4.2	23	A
					3.7	0.043	0.012	4.1	26	B
	< 0.003	0.163	0.140	4.1	< 0.001	< 0.003	< 0.003	4.9	49	B
	nd	nd	0.140	0.010	5.3	nd		5.8	53	C
					3.6			3.8	57	E

nd: not detected; \* Limit of quantification (see Table 5); \*\* As(III)+As(V) values; \*\*\* only TMAO

A: MAE; B: Liquid/Soild; C: ASE; D: Enzymatic; E: Sonication

Table 5. Figures of merit

		As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +TMAP	AC	TETRA	Total As**
<b>Linearity</b>	$r^2$ (n = 10)	0.999	1.000	1.000	0.998	0.999	1.000	0.998	0.998	0.999
<b>LOQ</b>	(mg As kg <sup>-1</sup> )*	0.020	0.015	0.030	0.015	0.015	0.050	0.070	0.070	0.060
<b>Stability</b> (n = 10, ± SD)	Retention time (min)	1.13 ± 0.02	2.19 ± 0.05	3.22 ± 0.11	4.79 ± 0.09	6.18 ± 0.10	8.37 ± 0.58	10.1 ± 0.7	-	-
	Peak area (10 <sup>5</sup> )	2.91 ± 0.29	3.34 ± 0.22	3.25 ± 0.30	3.26 ± 0.37	8.27 ± 0.51	2.11 ± 0.32	1.91 ± 0.25	-	-
<b>Accuracy</b>	Certified values recovery (%)	-	-	103	-	102-125	-	-	107	84-108
	Spiked recovery (%)									
	Low (2 µg L <sup>-1</sup> ; n = 9)	100	109	102	106	100	98	99	-	-
	Med (5 µg L <sup>-1</sup> ; n = 5)	91	110	102	114	109	83	101	-	-
	High (10 µg L <sup>-1</sup> ; n = 1)	82	102	98	109	105	104	105	-	-
	Means	93	107	101	109	104	96	101	-	-
<b>Selectivity</b>	T <sub>critical value</sub>	3.012	3.012	3.012	3.012	3.012	3.012	3.012	-	-
	T <sub>observed</sub> (slope = 1)	2.213	1.205	0.739	2.658	0.488	0.724	1.849	-	-
	T <sub>observed</sub> (intercept = 0)	0.954	1.100	1.013	0.413	0.866	0.588	1.275	-	-
<b>Repeatability</b>	CVr (%) (p = 8; n = 5)	7.5	6.6	5.9	6.3	3.5	5.0	-	-	4.3
<b>Reproducibility</b>	CVs (%) (p = 10; n = 3)	15.8	13.3	7.7	13.9	8.3	13.3	-	-	9.2

\* Sample weight of 0.15 g and volume dilution of 50 mL, \*\* See reference 38

27

Table 6. Bio-accessible total As and As species values in 3 CRMs (n = 5; mg As kg<sup>-1</sup>) and ratio between bio-accessible and extracted values (%)

		As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO +TMAP	AC	Residue	Σ**	Certified Value	Bio-accessible total As
Bio-accessible values	A	0.169 ± 0.072*	0.239 ± 0.089	0.368 ± 0.124	0.319 ± 0.163	8.88 ± 1.73	0.832 ± 0.237	< LOQ	9.4 ± 2.8	20.2 ± 1.9	21.6 ± 1.8	10.0 ± 2.6
	B	0.013 ± 0.002	0.030 ± 0.014	0.309 ± 0.020	0.043 ± 0.105	3.42 ± 0.18	0.132 ± 0.013	< LOQ	3.1 ± 0.9	7.1 ± 0.5	6.9 ± 0.3	4.0 ± 0.4
	C	0.019 ± 0.003	0.034 ± 0.013	0.083 ± 0.007	< LOQ	2.35 ± 0.24	0.033 ± 0.010	< LOQ	2.3 ± 0.4	4.7 ± 0.5	4.8 ± 0.3	2.5 ± 0.4
<b>LOQ***</b>		<b>0.010</b>	<b>0.030</b>	<b>0.020</b>	<b>0.030</b>	<b>0.040</b>	<b>0.030</b>	<b>0.050</b>				
Ratio (%)	A	41	52	29	44	69	59	-				46
	B	12	32	67	17	73	60	-				59
	C	36	54	54	-	48	65	-				52
	<b>Mean</b>	<b>30</b>	<b>46</b>	<b>50</b>	<b>31</b>	<b>63</b>	<b>61</b>	<b>-</b>				<b>52</b>

A: TORT 2, B: DORM 3, C: CRM 627, \* ± SD (n = 5), \*\* Sum of residue and As species values, \*\*\* Sample weight of 0.2 g, volume dilution of 7 mL and 10-fold dilution (See reference 9)

28

**Speciation of arsenic in seafood samples  
by HPLC-ICP-MS coupling after microwaves assisted extraction (MAE).  
Contribution to the evaluation of risks by assessment of its bioaccessibility.**

Discipline : Analytical chemistry

Vincent Dufailly

**Abstract :**

The government agencies generally evaluate the food risks related to the presence of arsenic in seafood samples by analyzing only total arsenic, without considering the various involved forms nor their bioavailability. The main objective of this study was to develop and validate a method allowing the French Food Safety Agency (AFSSA) to propose with its supervisions a better evaluation of the risks incurred by the consumer by determining the speciation and the bioaccessibility of the various arsenic forms in the seafood samples.

The first part of this work was to develop a method of separation of the principal arsenic species usually found in the seafood samples by coupling separation by ions exchange chromatography (IEC) and detection by ICP-MS. The experimental designs methodology used in this work, allowed, in a minimum of experiments, on the one hand to evaluate the influence of the various factors and their possible interactions on the separation from 7 to 9 arsenic species and on the other hand, to determine the optimal analytical conditions while minimizing the time of analysis (less than 15 minutes), preserving satisfactory resolutions and improving the sensitivities of the compounds considered.

The second part of this work related to the development of the method to extract the arsenic species in seafood samples by microwaves assisted extraction (MAE). The optimisation of the conditions of extraction in various certified reference materials showed clearly that a solvent only composed of water was sufficient to obtain satisfactory total arsenic and arsenic species recoveries. The evaluation of the analytical criteria showed that the method was practically validated for arsenic speciation in seafood samples, even if internal reproducibility will have to necessarily be refined by evaluating it later on. Then, the validated method could be applied to the speciation of arsenic in aqueous samples, and also to the certification of a dogfish liver samples organized by the Canadian NRC.

The last part of this work related to the development of a fast and pragmatic *in vitro* method of evaluation of the maximum total arsenic and arsenic species bioaccessibility in seafood samples, by combining a continuous leaching method (for measurement in real-time by ICP-MS of the arsenic portion released by artificial gastrointestinal fluids) and the validated speciation method. The results show that the bioaccessible arsenic (approximately 50% of the total arsenic in the samples) is released very quickly (in less than 5 min) by saliva with nothing else is then released by gastrointestinal juices. In addition, this work highlighted that the inorganic arsenic species bioaccessibility appears less important than that of the organic species in seafood samples.

**Key words :** Arsenic ; bioaccessibility ; microwaves assisted extraction; ICP-MS ; IEC ; leaching method ; experimental designs seafood samples ; speciation ; validation.

**Spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche  
par couplage HPLC-ICP-MS après extraction assistée par micro-ondes (MAE).  
Contribution à l'évaluation des risques par l'estimation de sa bioaccessibilité**

Discipline : Physico-chimie analytique

Vincent Dufailly

**Résumé :**

Les agences gouvernementales évaluent généralement les risques alimentaires liés à la présence d'arsenic dans les produits de la pêche en analysant uniquement l'arsenic élémentaire, sans prendre en compte les différentes formes en présence ni leur biodisponibilité. Le principal objectif de cette étude a été de développer et de valider une méthode permettant à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) de proposer à ses tutelles une meilleure évaluation des risques encourus par le consommateur en déterminant la spéciation et la bioaccessibilité des différentes formes arséniées présentes dans les produits de la pêche.

La première partie de ce travail a porté sur la mise au point d'une méthode de séparation des principales espèces arséniées couramment retrouvées dans les produits de la pêche par couplage entre la chromatographie d'échanges d'ions (IEC) et la détection par ICP-MS. La méthodologie des plans d'expériences utilisée dans ces travaux, a permis, en un minimum d'essais, d'une part d'évaluer l'influence des différents facteurs et de leurs interactions éventuelles sur la séparation de 7 à 9 espèces arséniées et d'autre part, de déterminer les conditions analytiques optimales tout en minimisant le temps d'analyse (moins de 15 minutes), en conservant des résolutions satisfaisantes et en améliorant les sensibilités des composés considérés.

La deuxième partie de ces travaux a concerné le développement de la mise en solution des espèces arséniées dans les produits de la pêche par extraction assistée par micro-ondes (MAE). L'optimisation des conditions d'extraction sur différents matériaux de référence certifiés a montré clairement qu'un solvant uniquement composé d'eau était suffisant pour obtenir des taux de récupération satisfaisants en As total et en spéciation. L'évaluation des critères analytiques a démontré que la méthode était pratiquement validée pour la spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche, même si la reproductibilité interne devra nécessairement être affinée en l'évaluant à plus long terme. La méthode validée a pu ensuite être appliquée à la spéciation de l'As dans des échantillons aqueux, ainsi qu'à la certification d'un échantillon de foie d'aiguillat organisée par le NRC canadien.

La dernière partie de ces travaux a concerné le développement d'une méthode *in vitro* rapide et pragmatique d'évaluation de la bioaccessibilité maximale de l'arsenic et des formes arséniées dans les produits de la pêche, en combinant une méthode de lixiviation en continu (pour la mesure en temps réel par ICP-MS de la part d'As libérée par des fluides gastrointestinaux artificiels) et la méthode de spéciation validée. Les résultats montrent que la totalité de l'As bioaccessible (environ 50 % de l'As total présent dans les échantillons) est libérée très rapidement (en moins de 5 min) par la salive sans que rien d'autre ne soit ensuite libéré par les sucs gastrointestinaux. D'autre part, ces travaux ont mis en évidence que la bioaccessibilité des espèces arséniées inorganiques apparaît moins importante que celle des espèces organiques dans les produits de la pêche.

**Mots clefs :** Arsenic ; bioaccessibilité ; extraction assistée par micro-ondes ; ICP-MS ; IEC ; lixiviation ; plans d'expériences ; produits de la pêche ; spéciation ; validation.